



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН
ФАКУЛТЕТ ФАРМАЦИЯ
Катедра „Химия и Биохимия“

Д-р Галя Борисова Георгиева

**Ролята на snp rs1799889 и rs5918 за активиране на
тромбоцити в тромбоцитни концентрати (in vitro)
и при тромботични заболявания**

АВТОРЕФЕРАТ
НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА НАУЧНАТА СТЕПЕН
ОНС "ДОКТОР"

Научни ръководители:
Проф. Регина Семьоновна Комса-Пенкова, д.б.н
Доц. Светла Желязкова Тодинова, д.б.

Плевен 2021

Докторантурата е написана на 131 стандартни машинописни страници и е онагледена с 15 таблици и 36 фигури. Използвани са 251 литературни източника.

Докторантът работи като асистент в катедра „Химия и биохимия“ към сектор „Биохимия“ на МУ-Плевен.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на заседание на Катедрен съвет към катедра „Химия и биохимия“, МУ –Плевен, състоял се на 24.03.2021г.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на Факултет по Медицина, МУ –Плевен и на сайта на университета –<http://www.mu-pleven.bg>

Научно жури –външни членове: Проф. Диана Георгиева Иванова, д.б.н., МУ –Варна,

Проф. д-р Татяна Иванова Влайкова, д.б., Тракийски университет гр. Стара Загора

Доц. Милка Аспарухова Нашар, д.ф., МУ –Варна,

Научно жури –вътрешни членове: Проф. Регина Семъонова Комса-Пенкова, д.б.н.-МУ Плевен,

Доц. д-р Емилияна Илиева Конова, д.м.–МУ Плевен,

Резервни членове: Проф. Бистра Цанева Калчева, д.ф.–МУ Варна

Доц. д-р Мария Николаева Симеонова, д.м.–МУ Плевен,

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ	1
II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	3
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	4
1. Материали	4
2. Методи	5
2.1 Клинични методи	5
2.2 Лабораторни методи	5
2.2.1. ДНК анализ	5
2.2.1.1. Определяне носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa	5
2.2.1.2. Определяне носителството на 4G/5G полиморфизъм в гена на плазменоген активатор инхибитор тип 1 (PAI-1) (rs1799889(-))	6
2.3. Получаване на тромбоцитни концентрати от стандартна единица цялостна кръв	7
2.4. Флоуцитометрия	7
2.5. АСМ (Атомно-силова микроскопия)	9
2.6. Епидемиологично ретроспективно проучване	10
2.7. Статистически методи	10
IV. РЕЗУЛТАТИ	9
1. Клинични и антропометрични параметри при здрави контроли, дарители пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода носители	9
2. Изследване на промените в морфологичните и наномеханичните свойства на тромбоцитите, чрез АСМ при здрави контроли, дарители, пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa.	10
3. Модул на Young на тромбоцитите при здрави контроли и пациенти с ДВТ, носители и неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa.	16
4. Флоуцитометрично изследване на активността на тромбоцитите на здрави контроли, дарители, пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода носители при полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa	19
5. Носителство на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa при здрави контроли, дарители, пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода носители	24

6. Резултати показващи риск от инцидент на дълбока венозна тромбоза при носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa 26
7. Повтарящи се тромботични инциденти при носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa 28
8. Обсъждане на значението на носителство на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa за промени в наномеханичните свойства и активирането на тромбоцитите. 29
9. Значение на генетичен полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa при жени с ранни загуби на плода 32
10. Изводи за промените в тромбоцитите при здрави контроли, дарители пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa 33
11. Изследване на морфологичните и наномеханичните особености на тромбоцитите, чрез АСМ при здрави контроли, дарители пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) 34
12. Модул на Young на тромбоцити здрави контроли и пациенти с ДВТ, носители и неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa. 37
13. Флоуцитометрично изследване на активността на тромбоцитите на здрави контроли, дарители, пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода носители при полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) 37
14. Носителството на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) при здрави контроли, дарители, пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода 44
15. Обсъждане на значението на носителство на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) за промени в наномеханичните свойства и активирането на тромбоцитите. 47
16. Значение на носителството на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) жени с ранни загуби на плода 49
17. Изводи от за промените в тромбоцитите при здрави контроли, дарители пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889). 50
18. Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати върху реципиенти със съдово заболяване без данни за носителството, добити от донори носители на полиморфизмите 50

полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa и полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889)	
18.1. Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати, върху реципиенти без данни за носителството, добити от донори носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa.	51
18.1.1 Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати, върху реципиенти със съдово заболяване без данни за носителството, добити от донори носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa.	51
18.1.2. Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати, върху реципиенти без носителство със хематологично заболяване, добити от донори носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa.	51
18.1.3. Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати, върху реципиенти без носителство претърпели хирургична интервенция, добити от донори носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa.	52
18.2. Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати, върху реципиенти без данни за носителството, добити от донори носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889)	52
18.2.1. Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати, върху реципиенти със съдово заболяване без данни за носителството, добити от донори носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889)	52
18.2.2. Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати, върху реципиенти без носителство със хематологично заболяване, добити от донори носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889).	53
18.2.3. Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати, върху реципиенти без носителство претърпели хирургична интервенция, добити от донори носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889)	53
V.ИЗВОДИ	54
VI. Приноси на дисертационния труд	57
Благодарности	58
Списък на публикации приложени към дисертационен труд	59
Участия в научни форуми с темата на дисертацията	59

Съкращения:

Съкращения на латиница:

1691 G>A - еднонуклеотидна замяна 1691 G>A
677 C>T – генетичен вариант (еднонуклеотидна замяна) 677 C>T
AFM – atomic force microscopy
AP – активатор на протеин
APC - активиран протеин C
APC-resistance – Резистентност към активен протеин C
Bp – base pair (базова двойка)
BSA - говежди серумен албумин
DAG – диацил глицерол
EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF – ендотелен растежен фактор
ELISA - ензим свързан имуносорбентен анализ
FFA – свободни мастни киселини
FVL - фактор V Leiden,
GP IIb/IIIa - тромбоцитен гликопротеин IIb/IIIa
IP 3 – инозитол 1, 4, 5 трифосфат
ITGB3 – интегрин В3, субединица на - GPIIb IIIa - гликопротеин IIb/IIIa
LRP – LDL-рецептор свързан протеин
MAb – моноклонални антитела
MFI - средна интензивност на флуоресценцията
MP – микрочастици
MTHFR - метилентетрахидрофолат редуктаза
OR – относителен риск
PAI-1 - плазминоген активатор инхибитор тип 1
PAI-1 4G/5G (rs1799889(-) - полиморфизъм в гена на плазминоген активатор инхибитор тип 1
PAR – протеиназа – активиран рецептор
PBS буфер – фосфатен буфер
PCR –полимеразна верижната реакция)
PIP2 – фосфатидил инозитол 4,5 бифосфат
PKC – протеин киназа C
PLA1/A2 , (rs5918ITGB3) - полиморфизъм в гена за GPIIb / IIIa -гликопротеин IIb/IIIa

PLC 2 – фосфолипаза C2
PMF – тромбоцитни микрочастици
RAP – рецептор свързан протеин
RGD – аргинил-глицил-аспартат
RIAM – RapI взаимодействаща молекула
SMC – съдови ендотелни и гладкомускулни клетки
SNP - единичен нуклеотиден полиморфизъм
TAFI – тромбин-активируем фибринолитичен инхибитор
TGF –трансформиращ растежен фактор
TNF- α – тумор некротизиращ фактор α
t-PA – тъканен плазминоген активатор
TXA2- тромбоксан A2
uPA– урокиназен плазминоген активатор
VLDL – липопротеини с много ниска плътност
VN – витронектин
vWF - фактор на Вилебранд

Съкращения на кирилица:

АГЕ – агарозната гел електрофореза
АДФ – аденозин дифосфат
АСМ – атомно силова микроскопия
ВТЕ – венозен тромбоемболизъм
дАТФ – дезоксиаденин трифосфат
дГТФ – дезоксигуанин трифосфат
дТТФ – дезокситимин трифосфат
дЦТФ – дезоксицитозин трифосфат
дНТФ – дезоксинуклеотид трифосфати
ДВТ – дълбока венозна тромбоза
ЕЦМ – екстрацелуларен матрикс
ИБС – исхемична болест на сърцето
МИ – инфаркт на миокарда
МоАт – моноклонални антитела
РНК – рибонуклеинова киселина
ССЗ – сърдечно-съдови заболявания

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Интравазалното активиране на тромбоцитите е сложна многофакторна и бърза поредица от процеси и освобождаване на биоактивни молекули, които осъществяват хемостаза. Този процес опосредства възпалението и повлиява положително репаративните и регенеративните процеси. Патологичното активиране на тромбоцитите води до неконтролирано образуване на тромбоцитен тромб (тромбоза), съдова оклузия и исхемична некроза на тъканите, които са симптоми характерни за редица заболявания (напр. атеросклероза, инсулт, миокарден инфаркт, дълбока венозна тромбоза). Основна роля при процеса на активиране на тромбоцитите играе гликопротеин $\alpha\text{IIb}\beta_3$ като при свързването си с фибриногена той улеснява необратимата адхезия на тромбоцитите към съдовата стена и дава възможност за кръстосана агрегация между съседни тромбоцити. Откриването на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa при пациент с остър миокарден инфаркт става причина за изследвания, чиято цел е да се разполага с подходящ маркер като рисков фактор за артериална тромбоза.

Плазминоген активатор инхибитор-1 (PAI-1), е проинфламаторен и протромботичен маркер. PAI-1 се смята за един от ключовите фактори при тромботичните състояния, но също има разнообразни функции извън хемостазата; той участва в регулацията на клетъчната адхезия, миграцията, инвазията, ангиогенезата, процеса на метастазиране и други.

След активирането си тромбоцитите освобождават голямо количество PAI-1 на мястото на образувалия се тромб, с цел да се предотврати бързото му разграждане.

Публикуваните в последните години задълбочени изследвания и констатациите сочат връзка между полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) и тромботични случаи. Според проучванията високите нива на PAI-1 както и носителството на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) са свързани с повишен сърдечно-съдов риск от атеротромбоза, дислипидемия, хипертония, диабет тип 2, рак, атеросклероза, бъбречна и белодробна фиброза.

В клиничната практика за коригиране на заболявания, при които има нарушена хемостаза и сериозен риск от кървене, както и периперативно, се трансфузират тромбоцитни концентрати. Тези тромбоцитни концентрати се добиват в кръвните центрове от цяла кръв или чрез афереза.

Основна цел на проучването е да разгледа полиморфизмите при тези два фактора (гликопротеин $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ и PAI-1) и да проследи как те повлияват активността на тромбоцитите, промените в наномеханичните и топографичните им характеристики, връзката им с тромботични заболявания и как тромбоцитни концентрати добити от донори носители на полиморфизмите повлияват трансфузияния реципиент.

Прилагайки интердисциплинарен подход, а именно - комбинирайки генетични и биофизични методи за оценка на тромбоцитите ще се опита да изследваме активирането на тромбоцити при носители на полиморфизмите в гена на GP Ib/IIIa и PAI-1.

Очакваме да установим типични топографски и наномеханични характеристики на активираните тромбоцити в зависимост от носителството на полиморфизмите, които да могат да послужат за оценка на риска от тромбози и образуване на фибринови коагулуми в тромбоцитния концентрат. Получените данни биха могли да се използват за по-екзактна бъдеща оценка за приложението им в диагностиката и допълнителни терапевтични подходи.

II. ЦЕЛ и ЗАДАЧИ

Целта на изследването е анализ на приноса на носителството на тромбофилични полиморфизми: полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa и 4G/5G (rs1799889(-) в гена на PAI-1 върху активирането на тромбоцити и свързаните с тях топологични и наномеханичните свойства на тромбоцитите, в здрави контроли, дарители и пациенти с ДВТ и други съдови инциденти, и при жени с ранни загуби на плода, както и значението на тези промени в активитането на тромбоцитите при трансфузирани реципиенти с тромбоцитни концентрати добити от дарители носители на тези полиморфизми.

ЗАДАЧИ

1. Да се определи честотата на носителството на генните полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa и 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), в селектирана група контроли, дарители, пациенти с венозна и артериална тромбоза и при жени с ранни загуби на плода.
2. Да се определи значимостта на носителство на генетични варианти полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa и полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) и да се анализира участието им в процеса на тромбообразуване чрез флоуцитометрични характеристики на активирането на тромбоцити при контроли и пациенти с тромбози и при жени с ранни загуби на плода.
3. Да се проучи приноса на носителството на генетичните фактори полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa, полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), за промени в топологични и наномеханичните свойства при активиране на тромбоцити изолирани от контроли, дарители, пациенти с тромбози и при жени с ранни загуби на плода.
4. Да се проучи приноса на носителството на генетичните фактори полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa, полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) за

активирането на тромбоцити в тромбоцитни концентрати и влиянието им върху реципиенти.

5. Да се изследват промените в наномеханичните характеристики на тромбоцитните микрочастици, изолирани от контроли, дарители, пациенти с тромбози и при жени с ранни загуби на плода след инцидента, при носители на генетични фактори полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa, полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) и анализ на участието им в процеса на тромбообразуване.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

В проучването са включени 146 здрави контроли (70 мъже и 76 жени), 172 пациентата (84 мъже и 88 жени) с данни за тромбоза, от тях само 14 са с артериална тромбоза (9 мъже и 5 жени) останалите са с дълбока венозна тромбоза. Пациентите са от Трета клиника по хирургия –Клиника Съдова хирургия при УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Клиника по Кардиология и Ревматология при УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ ЕАД.

Жените със загуба на плода до 9 г.с. са 46 и са от Медицински център „Клиничен институт за репродуктивна медицина“ ЕООД гр. Плевен.

Дарителите на цялостна единица кръв са 50, дарили кръв в РЦТХ Плевен, от която са приготвени стандартни тромбоцитни концентрати.

Те са разпределени в 3 основни групи:

- **Група 1** - контролна група
- **Група 2** – здрави дарители
- **Група 3** - включва пациенти с ДВТ или артериална тромбоза и жени със загуби на плода

Включващи критерии за контроли и дарители

1. Всички контроли и дарители са здрави, не са приемали медикаменти, съдържащи ацетилсалицилова киселина, през последните 5 дни преди даряването.
2. Всички дарители са с тегло над 50 кг, Нв ≥ 125 g/l за жени и Нв ≥ 135 g/l за мъже. Брой тромбоцити в кръвта на донора $\geq 150 \times 10^9/l$ често кръводаряващи (интервалът между две

последователни вземания на кръв е не по-малък от 60 дни).

Включващи критерии за пациенти

1. Да са пациенти с доказана артериална и/или венозна тромбоза с един или повече инциденти на дълбока венозна тромбоза (ДВТ). Инцидентите на ДВТ са диагностицирани от съдов хирург и отговарят на критериите, установени от клинични практики за поставяне на тази диагноза. Включват се пациенти с ДВТ на вена поплитеа, вена феморалис и такива с илио-феморална венозна тромбоза.
2. Жените да са със загуба на плода до 20 г.с. В изследването са включени жени без живородени деца - първичен инфетилитет а също така и вторичен. Основните статистически анализи са направени само с пациенти със загуби на плода.

Исключващи критерии за донори и контроли

Контроли и донори с тенденция на абнормно кървене и анамнеза за наследствени коагулопатии и ДВТ.

Исключващи критерии за жени със загуба на плода

Исключват се пациентки с много акушерски и ендокринни нарушения, които също могат да доведат до ранна загуба на плода: възпалителни изменения във вътрешните полови органи, носителство на балансиран мутации – неприявили се в ранен срок на бременността, ендокринни смущения.

Пациентите с тромбози, жените със загуби на плода, контроли и дарители са подписали декларации за използване на личните им данни включително и здравословно състояние.

2. Методи:

2.1 Клиничен метод - включва анамнестична част, физикален статус, наличие или липса на данни за абнормно кървене. Данните са снемани в РЦТХ- Плевен.

2.2 Лабораторен метод

2.2.1. ДНК анализ

2.2.1.1. Определяне носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa

Замяната на Т с С на 1565 позиция в гена на тромбоцитения гликопротеин IIb/IIIa води до създаване на рестрикционно място на ензима Msp I. След инкубирането на

амплификационни продукти от изследвания ДНК регион с Msp I, алелите съдържащи мутацията се хидролизират от ензима и остават с по-малка дължина, сравнено с тези ДНК фрагменти несъдържащи мутацията. Визуализацията на резултата се извършва след електрофоретично разделяне на ДНК фрагментите върху 3,5% агарозен гел.

2.2.1.2. Определяне носителството на 4G/5G полиморфизъм в гена на плазменоген активатор инхибитор тип 1 (PAI-1) (rs1799889(-))

Полиморфизмът 4G/5G в гена на PAI-1 представлява делеция на един нуклеотид (675 място) в последователността на промотора на гена на PAI-1. При носителство на 4G алел има GGGG повтореност, а при носителство на 5G има GGGGG повтореност. Установяването на носителство на единия (4G) или другия (5G) алел се осъществява чрез използването на високо специфична двойка праймери. Всеки един от двата праймера е синтезиран да разпознава или само 4G, или само 5G последователността. Заедно със специфичната двойка праймери в реакцията се добавя и двойка конституитивни праймери, които са показател за качество на PCR. Конституитивната 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 генетичния статус на индивида. Липсата на съответен алел води до отсъствие на амплификационен продукт. За всеки изследван индивид се осъществяват две PCR – една с 4G и друга с 5G праймера, като и в двете реакции присъстват конституитивните праймери. Визуализацията на резултата се извършва след електрофоретично разделяне на ДНК фрагментите върху 3 % агарозен гел и паралелно разглеждане на двете PCR на всеки индивид.

2.3. Получаване на тромбоцитни концентрати от стандартна единица цялостна кръв

Стандартната единица цялостна кръв отстоява на плато, система при която единицата се охлажда до стайна температура 22°C. За приготвяне на тромбоцитни концентрати може да се използва единица цялостна кръв, ако е преседяла на плато, не по-късно от 12 час след кръвовземане.

Стандартната единица цялостна кръв чрез центрофугиране на 3000 оборота при 22⁰С за 10 минути в центрофуга Crifuge 8500 след което се отлива на еритроцитен концентрат и плазма богата на тромбоцити. С последващо центрофугиране при 3500 оборота при 22⁰С за 15 минути в центрофуга Crifuge 8500 и се отлива на двата компонента плазма бедна на тромбоцити и тромбоцитен концентрат. Тромбоцитните концентрати престояват върху термо плот за 1 час на стайна температура, след което се поставят в тромбомиксер при 22⁰С.

Срокът на годност е до 5 дни от деня на кръвовземането. Тромбоцити за изследването се отделят чрез стирилно селиране на шлауха на сака в който се съдържа тромбоцитният концентрат. Проследяват се промените във физикохимичните и морфологичните им характеристики.

2.4. Флоуцитометрия

Флоуцитометрията наречена още имунофенотипизация е технология едновременно измерваща много характеристики на различни микрочастици или клетки преминаващи с висока скорост в поток през фокусиран лазерен лъч. Скоростта може да се хиляди клетки за секунда. Измерването се прави в зависимост от разсеяната и излъчината от частиците светлина. Методът позволява да се изследват експресията на тромбоцитните гликопротеини и активността на циркулиращи тромбоцити; реактивност на тромбоцитите, както и капацитетът им за активиране и секреция на прокоагулантни медиатори под въздействие на физиологичен агонист.

Всички флоуцитометрични изследвания са направени в Институтът по микробиология “Стефан Ангелов” към БАН

2.5. АСМ (Атомно-силова микроскопия)

Атомно-силова микроскопия от английски: (*AFM — atomic-force microscope*) е микроскоп с висока разделителна способност, основан на взаимодействието на сонда (тънко острие) с повърхността на изследвания обект. Това взаимодействие се изразява в привличане или отблъскване на сондата от повърхността на обекта, дължащо се на Ван дер Ваалсовите сили. Чрез използването на специални остриета могат да бъдат изучавани електрическите и магнитните свойства на повърхностите.

АСМ е много полезен инструмент за наблюдение на топографията на биологичните структури, за изследване на архитектурата на цитоскелета и промените в тромбоцитите по време на активиране

Върху стъкло могат да се наблюдават промени във формата и размера на неактивни и активирани тромбоцити, както и тяхното агрегиране с фибриноген.

АСМ събирането на данни за изобразяване и картографиране на сила на здрави и патогенни тромбоцити се извършва с помощта на система NanoScope V (Bruker Inc, САЩ), съчетана с оптичен микроскоп, свързан с CCD камера за микроскопско наблюдение на клетките върху повърхността на пробата. Получените топографски изображения за сравняване на морфологията на клетките, са на база на клетките изолирани от кръвта на контролната група. Морфологичното изследване на тромбоцитите се извършва в режим на контакт. Измерванията на еластичност бяха извършени върху тромбоцити, изолирани от пациенти и контроли. За изчисляване на модула на Йънг бяха използвани криви сила-разстояние, записани в централната зона на всеки тромбоцит

Всички изследвания с АСМ са извършени в - Институт по биофизика и биомедицинско инженерство към БАН.

2.6. Епидемиологично ретроспективно проучване

Използва се базата данни на РЦГХ-Плевен съхранена в софтуерната програма BIMS, от която се черпи информация за реципиента на единица тромбоцитен концентрат.

Използва се базата данни на УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ за да се проследи здравословното състояние и наличието или липсата на нежеланни тромботични инциденти при трансфузирани пациенти с тромбоцитен концентрат добит от дарителска кръв. Информацията която се използва е от 2010 до 2019г.

2.7. Статистически методи

За обработка на данните са използвани методите за описателни статистики на извадки от данните и за изследване и представяне на получените резултати – методи за визуализация и интерпретация.

За обработка на данните от проучването, се използвани следните статистически пакети, приложни програми и офис-приложения:

1. Обработка на данните с **електронни таблици (MS Excel 2007)** – за изготвяне на описателни статистики.
2. Пакет от приложни програми за **статистически анализи, интерпретиране и представяне на данните SPSS (SPSS Inc., IBM SPSS Statistics)**

IV. Резултати

1. Клинични и антропометрични параметри при здрави контроли, дарители пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода носители

Клиничните и антропометричните параметри на пациенти с ДВТ, контроли и дарители на цялостна кръв са представени в Таблица 1., разделени по пол. Данните за жените с ранни загуби на плода са описани в текста.

В проучването са включени 173 пациента с доказана дълбока венозна тромбоза, 88 жени и 85 мъже съответно 50.86% от пациентите са жени и 49.14% са мъже. Средната възраст на пациентите е 54.78 години, като за жените тя е 54.5 години, а за мъжете 55 години. При пациентите първият тромботичен инцидент се появява на средна възраст 53 години, като при жените този инцидент е на 52 години, а при мъжете е на 54 години. При пациентите е определен и ВМІ, 28.35 е средната стойност, като той е по-висок за жените 29.11 в сравнение с мъжете 27.89.

Контролите съответно са общо 146, от които 76 жени (52.05%) и 70 мъже (47.94%). Дарителите на цяла единица кръв са общо 50, от които 15 жени (30.00%) и 35 мъже (70.00%). В България дарителите на цялостна единица кръв са по-често мъже.

Средната възраст на контролите от женски пол е 46 години, а при мъжете е 48 години.

ВМІ изчислен за жените от контролната група е 26.02, при мъжете е по-висок 27.04.

При дарителите съответно средната възраст за жените е 48 години, докато при мъжете е 45 години. По-често кръводаряват млади мъже.

Стойностите на ВМІ при жени дарителки е по-нисък 24.86, в сравнение с мъжете дарители за които е 26.25.

Жените с ранни загуби на плода (до 10 г.с) включени в проучването са общо 46. Със средна възраст 32.46 ± 6.635 . Средната стойност на изчисленият за тях BMI е 29.32.

Таблица 1. Клинични и антропологични параметри в зависимост от пола (женски и мъжки) (в скоби са представени процентите).

Клинични параметри и Антропометрични фактори	Общо Пациенти	Пациенти жени	Пациенти мъже	Общо Контроли	Контроли жени	Контроли мъже	Общо Дарители	Дарители жени	Дарители мъже
Брой бр. (%)	173	88 (50.86%)	85 (49.14%)	146	76 (52.05%)	70 (47.94%)	50	15 (30.00%)	35 (70.00%)
Възраст (години)	54.7 ± 13.59	54.5 ± 15.73	55.08 ± 11.02	47.14 ± 11.25	46.27 ± 12.57	48.01 ± 11.62	46.12 ± 10.83	48.00 ± 10.26	45.31 ± 11.35
Възраст на първи тромботичен инцидент	52.9 ± 13.67	51.75 ± 15.84	54.25 ± 10.89						
BMI kg/m ²	28.35	29.11	27.89	26.45	26.02	27.04	25.73	24.86	26.25

2. Изследване на промените в морфологичните и наномеханичните свойства на тромбоцитите, чрез АСМ при здрави контроли, дарители, пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa.

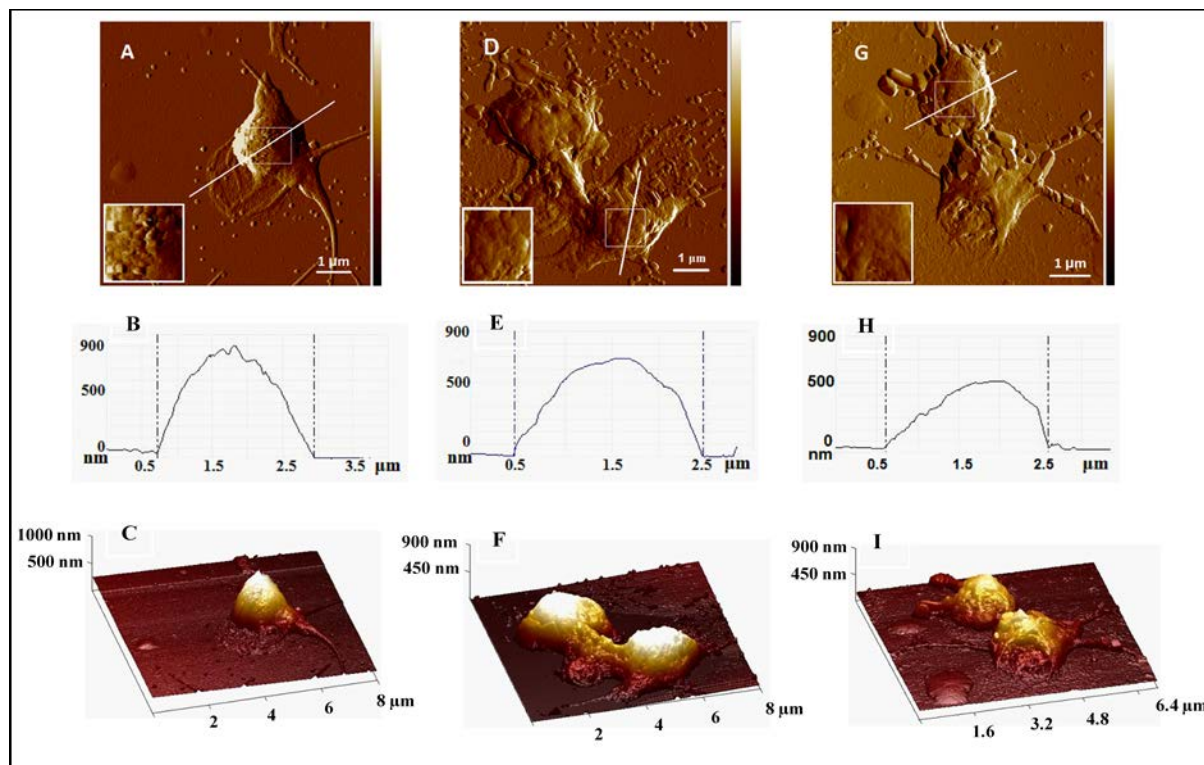
Различни фактори обуславят тромбоцитната морфология както и физиологичните активности в самите тромбоцити. Промените на някои от тези фактори могат да доведат до изменение в тромбоцитната биомеханика. Повърхността на тромбоцитите е най-богата на гликопротеинови IIb/IIIa рецептори за свързване с фибриноген и фактор на фон Вилебранд. Полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa е сред рисковите фактори за развитие на артериални и венозни тромбози.

Топографските параметри (височина на тромбоцитите (h), площ и „грапавостта“ на тромбоцити (Ra), получени от АСМ при сканиране на 117 тромбоцита от здрави контроли (65 тромбоцита при носители и 52 при не-носители) и 136 тромбоцита от пациенти с ДВТ (58 тромбоцита при носители и 78 при неносители) се определят на етап поставяне на тромбоцитите по повърхността на стъклото, когато по-голяма част от тромбоцитите се

активират, след като влязат в контакт с покривното стъкло. Следователно, статистическият анализ се отнася единствено за активираните тромбоцити. Тромбоцитите при пациенти с ДВТ, носители и неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa имат значително по-ниска височина на мембраната в сравнение с контролите, също така и другите трмбоцитни параметри са с по-ниски средни стойности при носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa (Таблица 2). Топографските параметри на тромбоцитите са представени на Фигури 4-6.

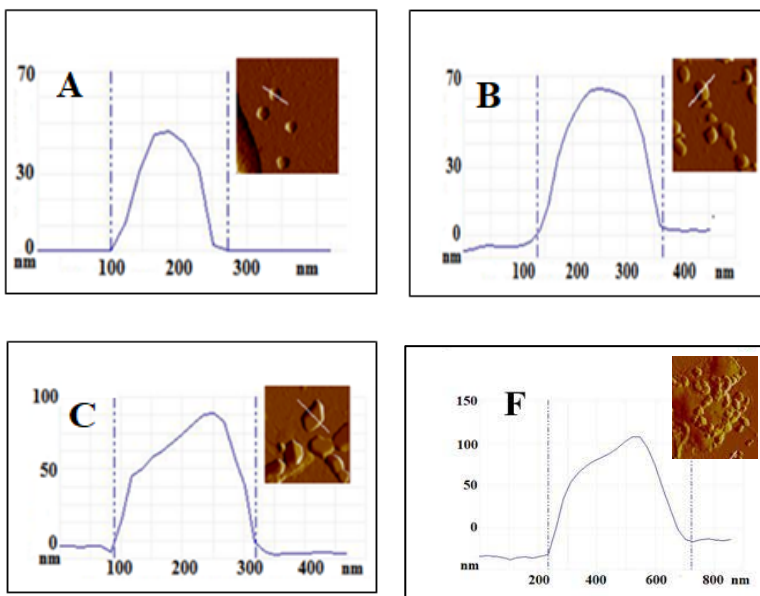
Типични изображения на АСМ на тромбоцитите, изолирани от контроли носители и неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa, пациенти с ДВТ, носители и неносители на на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa са представени на Фигура 1. Очевидно е, че тромбоцитите са леко активирани, в следствие от процедурата на изолиране и контакта с покривното стъкло, тъй като филоподиите са ясно видими. При активиране на тромбоцитите настъпва серия от морфологични изменения, които включват мембранни издатини, образувани в резултат на натрупване на гранули в центъра на клетка и видими на повърхността филоподии и ламелоподии (Фиг. 1).

Върху мембраната на тромбоцитите при здрави хора (контроли и дарители), неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa (Фиг. 1A), се появяват леки гънки в начален етап на активиране. Тромбоцитът губи своята дисковидна форма и формира филоподии (Фиг. 1C). Активираните тромбоцити изолирани от здрави индивиди и пациенти с ДВТ носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa, са с по-малка височина в сравнение с тези на контролите неносители фиг.1E и 1H. Често тромбоцитите се слепват един с друг, както се вижда на фигурата 1 F и 1 I. Хиалоплазмата на тромбоцитите на пациенти с дълбока венозна тромбоза е разлята и могат да бъдат разграничени няколко частици с диаметър малко над 1 микрон, вероятно отделени от хиалоплазмата (Фиг. 1 I). Ясно се вижда освобождаването на малки обекти около активираните тромбоцити, които най-вероятно представляват тромбоцитни микрочастици (РМР) и/или гранули.



Фигура 1. АСМ изображения на тромбоцити, получени от здрав индивид не-носител на rs5918 (С) полиморфизъм (А) и носител на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa (D), и ДВТ пациент носител на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa (G). Тромбоцитите са фиксирани с 2.5% глутаралдехид върху покривно стъкло. Скалата е посочено във всеки панел. АСМ-2D профил (A, D, G) получен при сканиране XY площ 8x8 μm², Z = 900nm. В рамките са представени уголемени снимки на централната зона. Напречно сечение (B, E, H), съответства на белите линии в изображенията A, D и G. АСМ-3D топографски снимки (C, F, I) на съответните тромбоцитите в изображения A, D и G. Изображенията бяха направени на въздух при стайна температура.

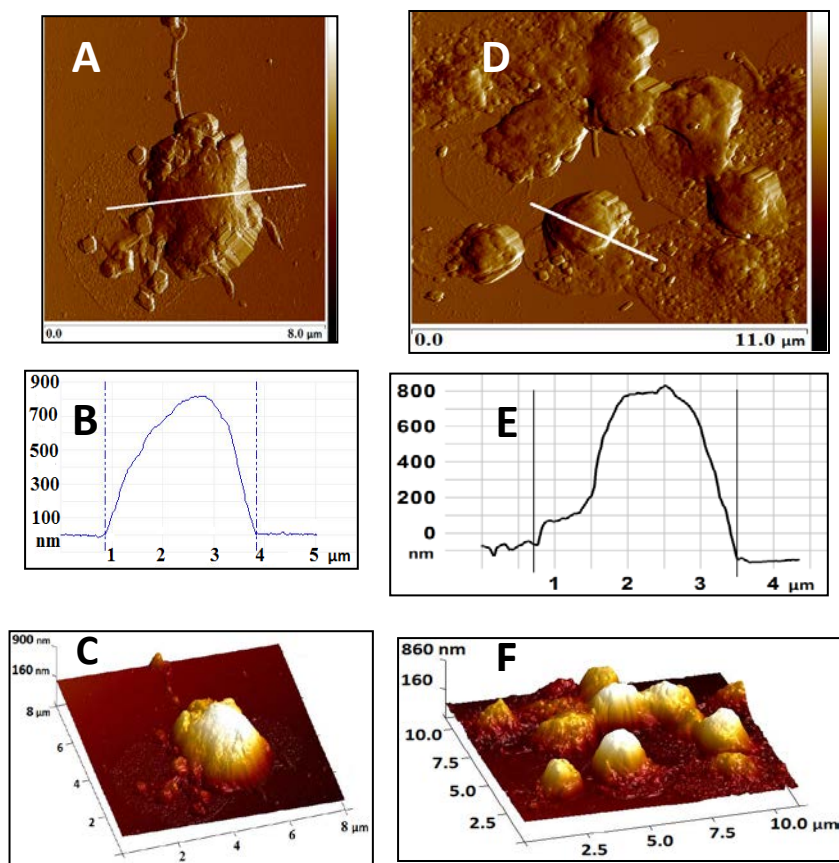
Съществена разлика се открива между морфологията и броя на частиците, отделяни от тромбоцитите при здрави индивиди, носители и неносители на на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa, както и при пациенти с ДВТ (Фиг 2). Формата на микрочастици при здрави контроли е сферична (Фиг. 2 А, В) с диаметър 110-170 nm за неносители на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa, при носители на полиморфизма диааметъра е по-голям 200-400 nm. При пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода носители на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa се наблюдават полигонално оформени микрочастици, чиито размери варират в по-широк интервал от 100 nm до 1100 nm. (Фиг. 2 С, F).



Фиг. 2 АСМ изображения на микрочастиците (от Фиг. 14), отделени от тромбоцитите на здрави носители (А), здрави носители (В) и ДВТ пациенти носители на PLA2 (С) и жена с ранни загуби на плода (F) и съответните профили.

При жените с ранна загуба на плода до 10 г.с, от АСМ се наблюдава по-напреднал

стадий на активиране на тромбоцитите (Фиг. 3D, E, F). На всички АСМ прозорци се вижда тенденция на изразено „прилепване“ на тромбоцитите към подложката „тип пържено яйце“ и разливане на хиалоплазмата в тънък слой плътно около централно събрани клетъчни органи (Фиг. 3D). Топографските параметри (височина и площ) при жените носителки на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa са значително по-ниски в сравнение с контролните не носителки на полиморфизма (Табл.2). Броят на образуваните микрочастици от тромбоцитите при жени с ранни загуби на плода носителки на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa са много повече (около 4 пъти) в сравнение с микрочастиците образувани от тромбоцитите на контролната група бременни жени. Цялата мембрана на тромбоцитите е плътно покрита с микрочастици с размери между 100 и 300 nm. Тези частици имат елипсоидна или сферична форма. Обемът им е $0.004\mu\text{m}^3$. Пространството в близост до тромбоцитите е също плътно покрито с частици, чийто размери обаче са под 80 nm. (Фиг. 3 F) Счита се, че частици с такива размери са екзозоми. При контролите те се откъсват изцяло от филоподиите, което е по всяка вероятност определя техният контур и мембраната е гладка с $Ra=29$ nm, за жени с ранни загуби на плода носителка на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa тази величина е почти двойно по-висока. Вероятно тази увеличена стойност се дължи не толкова на нагъването на самата мембрана, а на факта, че тя е плътно покрита с тромбоцитни микрочастици, което увеличава почти два пъти грапавостта.



Фиг. 3 АСМ изображения на тромбоцити, получени от жени носители на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa. (А, В и С) бременна в 8 г.с. носител и на MTHFR. Панел (D E и F) е на жена със загуба на плода през 10г.с., носител на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa. Тромбоцитите са фиксирани с 2.5% глутаралдехид върху стъкло. Напречното сечение (В, Е) съответства на белите линии в изображенията А, D. АСМ-3D топографски снимки (С, F) са съответно на тромбоцити А, D в АСМ-2D.

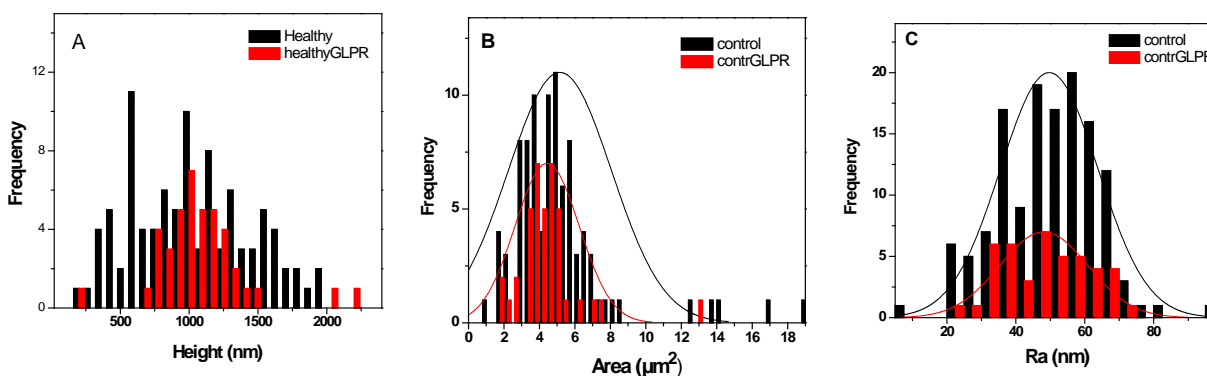
Незначителна разлика е установена между разпределението на повърхността при разстилане на тромбоцитите и размера на тромбоцитите при здрави индивиди и пациенти с ДВТ. Средната площ на тромбоцитите, изолирани от здрави индивиди е $5.2 \pm 2.6 \mu\text{m}^2$ за носители на rs5918(T) и $4.4 \pm 1.8 \mu\text{m}^2$ за носители на rs5918 (C+T), и съответно $5.0 \pm 2.4 \mu\text{m}^2$ и $4.2 \pm 1.7 \mu\text{m}^2$ за пациенти с ДВТ носители на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa. Площта на тромбоцитите е малко по-ниска при пациенти с ДВТ и здрави индивиди, носители на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa, в сравнение с неносителите. (Таблица 2, Фиг.4В,5В,6В).

Таблица 2. Средни стойности и стандартни отклонения височината (H), площ, грапавостта (Ra) и Young модул (E) на тромбоцитите изолирани от носители и неносители на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa при здрави индивиди и пациенти с ДВТ

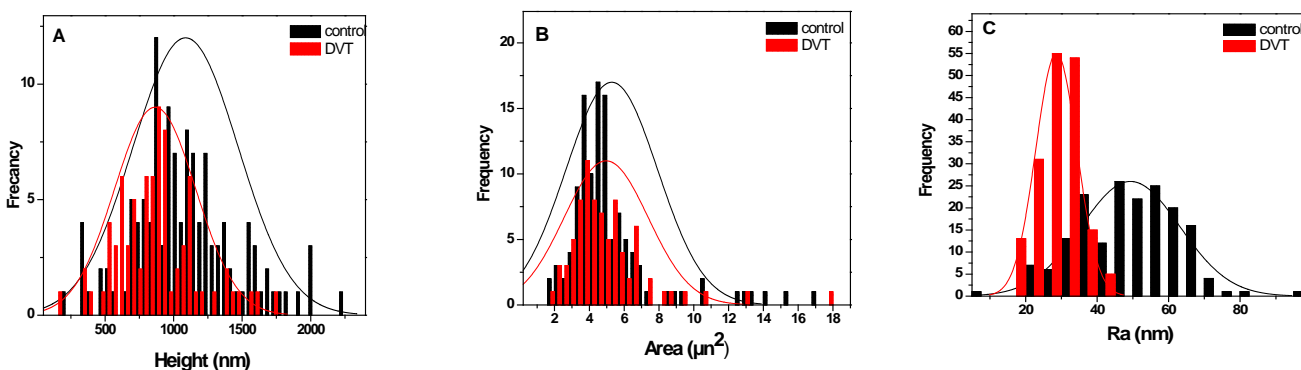
Изследвани индивиди	Носителство rs5918	h (nm)	Тромбоцити Площ (mm ²)	Ra (nm)b

Контроли	rs5918(T)	1021 + 433	5.2 + 2.6	49.7 + 14
	rs5918 (C+T)	1072 + 338	4.4 + 1.8	48.1 + 12
Пациенти с ДВТ	rs5918 (T)	865 + 290	5.0 + 2.4	28.6 + 6
	rs5918 (C+T)	766 + 182	4.2 + 1.7	30.2 + 6
Здрави бремени	rs5918 (T)	1035 ± 177	6.78 ± 1.5	29.4 ± 6.0
Пациенти с репродуктивни неудачи	rs5918 (C+T)	623 ± 121	4.78 ± 1.0	42.2 ± 9.5

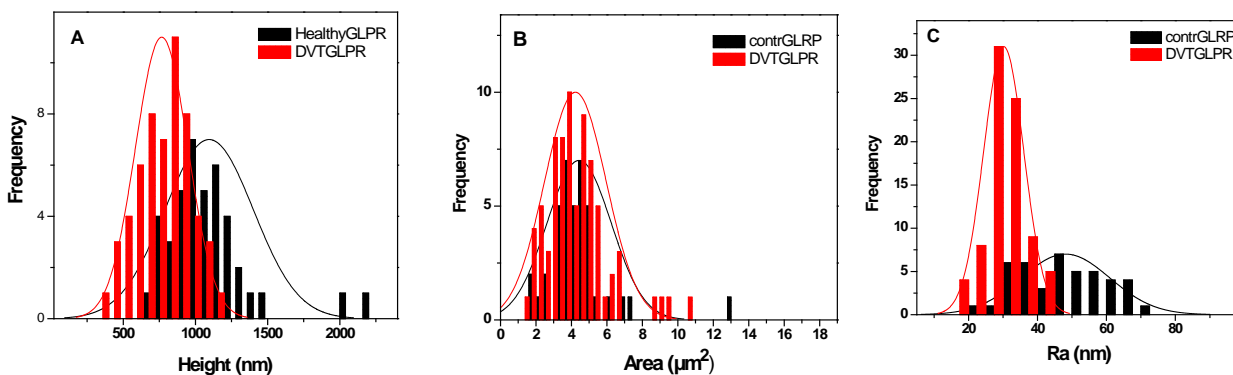
Стойностите на грапавостта определени за централната част на тромбоцитите (на площ от 0.9 x 0.9 nm) са значително по-високи, за тромбоцитите изолирани от пациенти с ДВТ ($Ra = 28.6 - 30.2$ nm) от тези на контролите ($Ra = 48.1 - 49.7$ nm), както за носители на rs5918 (T), така и носители на rs5918 (C+T) (Таблица 2, Фиг.4С,5С,6С).



Фиг. 4 Хистограми на разпределението по размер: височина – (панел А), площ (панел В) и грапавост – (панел С) на тромбоцити, изолирани от здрави индивиди носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP Пб/Ша полиморфизъм (в черно) и здрави индивиди носители на rs5918 (C) полиморфизъм (в червено). Гаусовото разпределение е очертано съответно с черни и червени линии.



Фиг. 5 Хистограми на разпределението по размер: височина – (панел А), площ (панел В) и грапавост – (панел С) на тромбоцити, изолирани от здрави индивиди (в черно) и пациенти с ДВТ (в червено). Гаусовото разпределение е очертано съответно с черни и червени линии.



Фиг. 6 Хистограми на разпределението по размер на тромбоцити, изолирани от здрави индивиди (в черно) и пациенти с ДВТ (в червено) носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa. Гаусовото разпределение е очертано съответно с черни и червени линии.

3. Модул на Young на тромбоцитите при здрави контроли и пациенти с ДВТ, носители и неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa.

Модула на Young за тромбоцитите беше определен с помощта на уравнение 1 (Материали и методи) чрез напасване на всяка крива „сила-разстояние“. Тъй като еластичността на човешките тромбоцити варира в широки граници в различните части на клетката, за изчисляването на модула на Young (измерванията) бяха записани от централната част на тромбоцитите (около 12 за всеки тромбоцит).

Фигури 7 и 8 илюстрират профилите на разпределение на модула на Young, получени от тромбоцити на здрави индивиди и пациенти с ДВТ, носители и неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa. Профилите на модула на Young при носителите на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa спрямо неносителите са много различни за групите на здрави индивиди и пациенти с ДВТ. Тромбоцитите при здрави индивиди (контролната група и дарители), изолирани от носители и неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa, показват относително нормални модели на разпределението в централната част на средните стойности на модула на Young (Таблица 3), докато при пациентите с ДВТ е на лице по-неравномерна схема на разпределение.

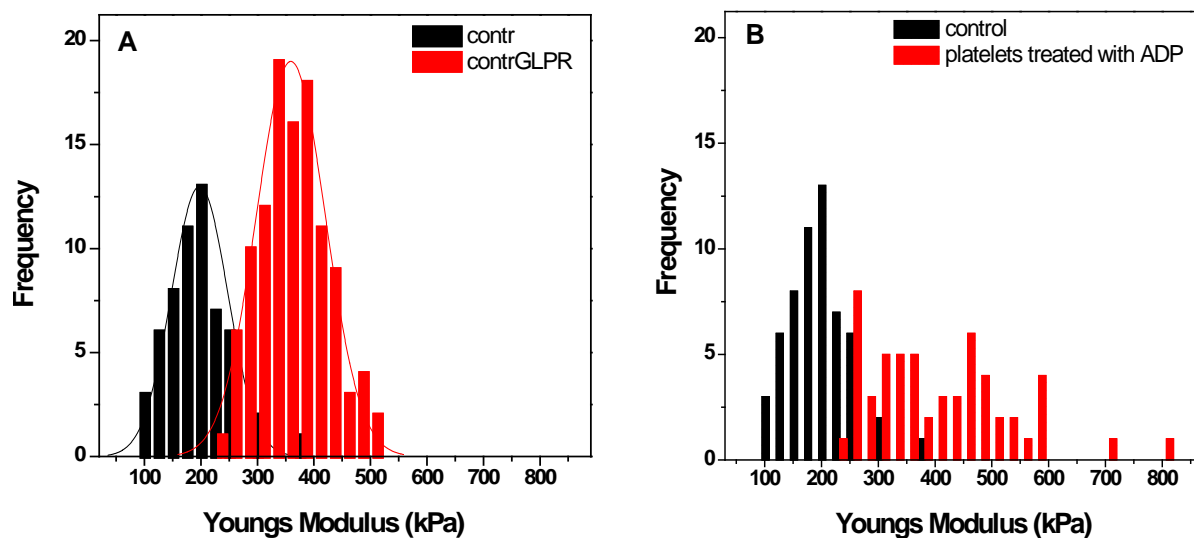
Стойностите на модула на Young за здрави контроли са 359 ± 61 кПа и 198 ± 50 кПа, съответно за носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa и неносители. По този начин, носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена

за GP IIb/IIIa допринася за по-силна промяна в еластичността на мембраните на тромбоцитите и следователно до приблизително два пъти по-голяма твърдост на мембраните на тромбоцитите при здрави индивиди, носители на този полиморфизъм. За пациенти с ДВТ носители на г полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa), модулът на еластичността на мембраните на тромбоцитите е много по-висок ($E = 341 \pm 102$ кПа), отколкото при контролите ($E = 198 \pm 50$ кПа), при пациенти с ДВТ носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa стойността е малко по-ниска ($E = 327 \pm 85$ кПа), в сравнение с тази при контролите носители ($E = 359 \pm 61$ кПа) (Таблица 3).

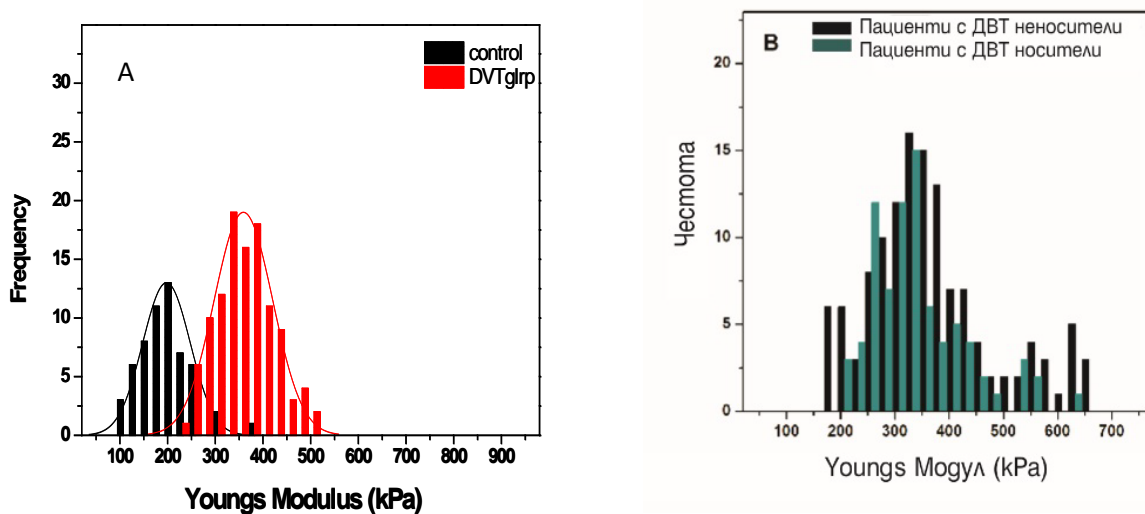
Таблица 3. Средни стойности и стандартни отклонения на Young модул (E) на тромбоцитите изолирани от носители и неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa при здрави индивиди и пациенти с ДВТ

Изследвани индивиди	Носителство rs5918	E (кПа) ^b
Контроли	rs5918 (T)	198 + 50
	rs5918 (C +T)	359 + 61
Пациенти с ДВТ	rs5918 (T)	341 + 102
	rs5918 (C+T)	327+33

За да се анализира влиянието на степента на активиране на тромбоцитите, върху механичните им свойства, тромбоцитите изолирани от здрави индивиди (неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa) бяха предварително третирани с АДФ (Фиг. 7). АДФ е молекула която е отговорна за активирането на тромбоцитите, секретира се на местата на съдовото увреждане от тромбоцитните гранули, от увредени еритроцити и ендотелни клетки. Предварително активираните тромбоцити стават два пъти по-твърди от неактивираните; хистограмата показва неравномерно разпределение в обхвата от 243 до 700 кПа, съответно, и модула на Young от 402 ± 123 кПа (Фиг 7B). По отношение на промененото разпределение на модула на Young, профилът на предварително активираните с АДФ тромбоцити от здрави индивиди, наподобява тези на пациентите с ДВТ (Фиг. 7 и 8). При активиране, тромбоцитите секретират допълнително количество АДФ, който от своя страна усилва активирането на близко намиращи се неактивни тромбоцити.



Фиг. 7 Хистограми на Young модули измерени за тромбоцити, изолирани от здрави контроли носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa (червено А) и носители (черно А и В) на полиморфизъм и предварително активирани с ADP тромбоцити от същата здрава контрола носители (червено, В).

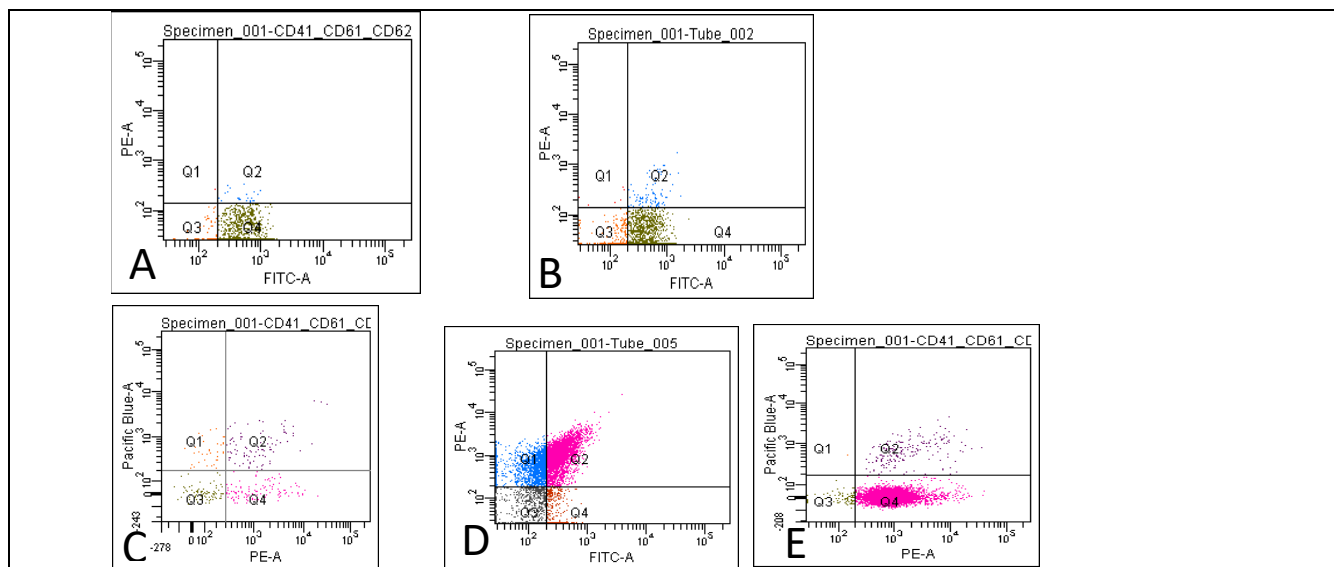


Фиг. 8 Хистограма на Young модули измерени за тромбоцити, изолирани от здрави контроли носител (черно-А) и пациент с ДВТ носител на rs5918 (С) полиморфизъм (червено-А), изолирани от пациент с ДВТ носител на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa (зелено -В) пациент с ДВТ носител (черно-В).

4.Флуцитометрично изследване на активността на тромбоцитите на здрави контроли, дарители, пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода носители при полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa

Тромбоцитите изолирани от пациенти с ДВТ са изследвани с флуцитометричен анализ.Пробите съдържат смес от активирани тромбоцити и такива в покой. За измерване на активирането на тромбоцитите, те са белязани с анти-човешки CD41 с FITC HIP8; Анти-човешки CD61 с APC (V); Анти-човешки CD62P с PE (K-4).

Двойната положителна популация CD41 / CD62P (Q2) се характеризира с активирани тромбоцити по MFI (средна интензивност на флуоресценция) и с Q2 - показател за активирани тромбоцити на двойната положителна популация CD41/ CD62P



Фиг.9 Скатер диаграма на флуцитометрично изследване показваща нивото на активиране на тромбоцитите, изолирани от здрави носители (A); здрав носител на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa - (B); пациент с венозна тромбоза носител на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa –(C), пациент с артериална тромбоза (МИ) хомозиготен носител на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa – (D), жена с ранни загуби на плода носител на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa - (E). За измерване на активирането,тромбоцитите са белязани с анти-човешки CD41, FITC HIP8; Анти-човешки CD61 (Интегрин бета 3) APC (V); Анти-човешки CD62P PE (K-4).

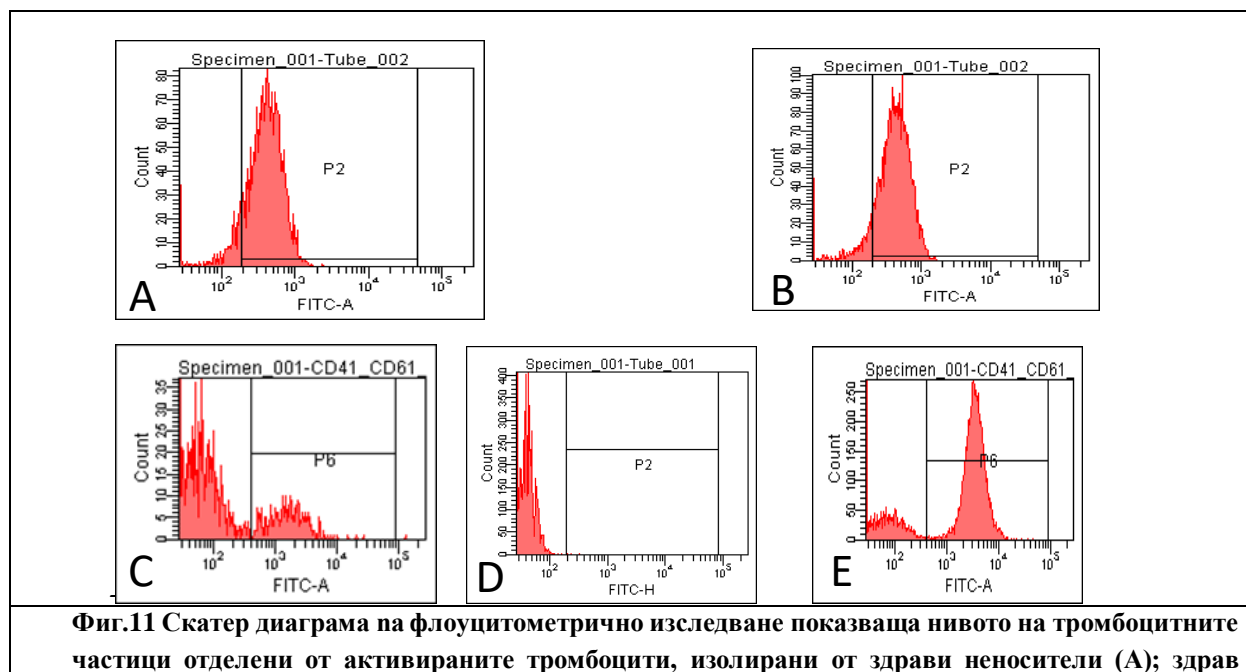
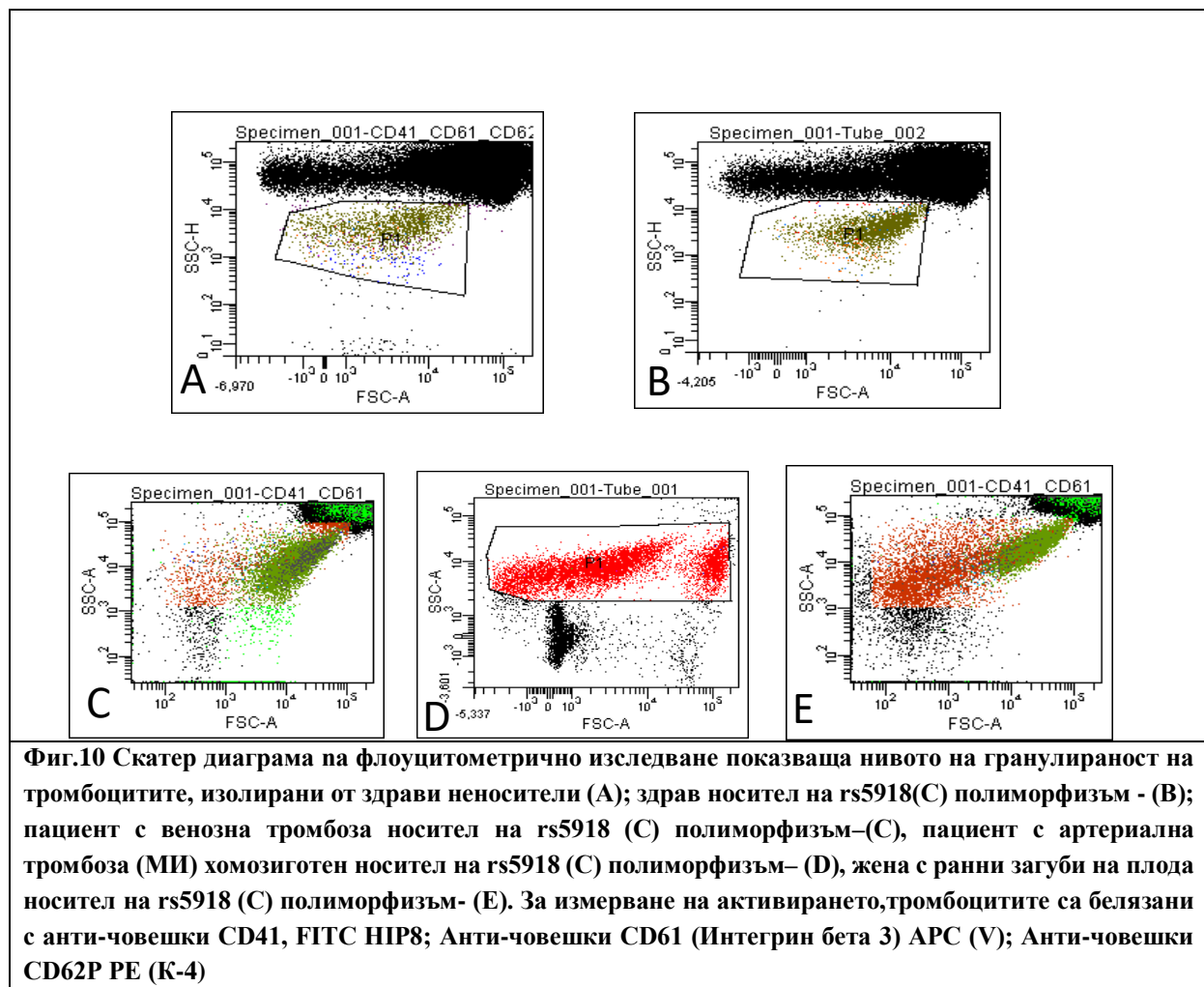
От скатер диаграмите се вижда че най-голям процент активирани тромбоцити - 51,3% се наблюдават при пациенти с артериална тромбоза (МИ) с хомозиготно носителство на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa (Фиг. 9 D) следвани от пациенти с венозна тромбоза (ДВТ) носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP

Пb/Ша 27,4% (Фиг. 9 С). При жени с ранни загуби на плода носителки на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP Пb/Ша 2,6% (Фиг. 9 Е), процент активирани тромбоцити е съпоставим с този при здрави носители 3,6% (Фиг. 9 В) и при здрави неносители- 1,3% (Фиг. 9 А).

Процента на активирани тромбоцити на носители на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP Пb/Ша е нисък при здрави, пациенти с ДВТ и при жени с ранни загуби на плода. В сравнение с тях пациент с миокарден инфаркт и хомозиготно носителство на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP Пb/Ша е с много висок процент на активиране на тромбоцитите на двойната положителна популация CD41 / CD62P.

P1 е показател за гранулираността на тромбоцитите, той е с по-високи стойности при пациенти с артериална тромбоза (МИ) 66,6% (Фиг. 10 D), при пациенти с венозна тромбоза (ДВТ) стойностите на P1 са ниски 5,7% (Фиг. 10 С), както и при жени с ранни загуби на плода също стойностите на P1 са ниски 5,6% (Фиг. 10 Е). При пациенти с ДВТ и при жени с ранни загуби на плода стойностите на P1 са 5,0%, като при здрави носители (Фиг. 10 В) и са 5,8% при здрави неносители (Фиг. 10 А). Пациенти с артериална тромбоза хомозиготни по полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP Пb/Ша показват високи стойности на P1 образуване на гранули от тромбоцитите, маркер за тяхното активиране.

P6 % е показател за броя на образуваните тромбоцитните частици определен на базата на процента CD41 позитивни клетки. Най-висок процент на този маркер на тромбоцитните частици P6 , се наблюдава при пациенти с артериална тромбоза хомозиготни носители на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP Пb/Ша 66,8% (Фиг. 11D) също и при жени с ранни загуби на плода носители на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP Пb/Ша 62,6% (Фиг. 11Е), докато при пациенти с венозна тромбоза (ДВТ) носители на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP Пb/Ша стойностите на P6 са по-ниски 27,4% (Фиг. 11С), но на фона на силно активирани тромбоцити. За сравнение при здрави носители на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP Пb/Ша стойностите на P6 са 2,8% (Фиг. 11В), а при неносители 5,6% (Фиг. 11А).



носител на rs5918(C) полиморфизъм - (B); пациент с венозна тромбоза носител на rs5918 (C) полиморфизъм-(C), пациент с артериална тромбоза (МИ) хомозиготен носител на rs5918 (C) полиморфизъм- (D), жена с ранни загуби на плода носител на rs5918 (C) полиморфизъм- (E). За измерване на активирането,тромбоцитите са белязани с анти-човешки CD41, FITC HIP8; Анти-човешки CD61 (Интегрин бета 3) APC (V); Анти-човешки CD62P PE (K-4)

Можем да заключим, че при пациенти с миокарден инфаркт с хомозиготно носителство на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa, както и при пациенти с репродуктивни неудачи хетерозиготно носителство на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa, тромбоцитите им образуват голям брой тромбоцитни частици, докато при пациенти с венозна тромбоза носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa, процента на тромбоцитните частици е по-нисък за сметка на високият процент активирани тромбоцити 68,6%.

Таблица 4. Средни стойности на % CD41/CD62/CD62p, MFI CD41/CD62/CD62p,% ANX V при пациенти с ДВТ, артериална тромбоза, жени с ранни загуби на плода, носители на полиморфизъм rs5918(C) и контроли

Средни стойности	Средни стойности на % CD41/CD62/CD62p	Fisher test (p)	Средни стойности на MFI* CD41/CD62/CD62p	Fisher test (p)	Средни стойност и на % ANX V	Fisher test (p)
Пациенти с ДВТ носители на полиморфизъм rs5918(C)	69,627	0,0717	1483,555	0,0456	18,45	0,0452
Пациенти с МИ носители на полиморфизъм rs5918(C)	92,3	0.015	1046,5	0.082	23.7	0.0335
Жени с ранни ЗП носители на полиморфизъм rs5918(C)	75,42	0,0099	1192,090	0,0522	4,94	0,09143
Контроли	6,8	0.093	220,33	0.0630	1.93	0.0148

*MFI средна интензивност на флуоресценция

От таблица 4 проличава, че най-голям процент на активирани тромбоцити се наблюдава при пациенти с ДВТ носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa- **1483,555**, следвани от жени с ранни загуби на плода носителки на този полиморфизъм.

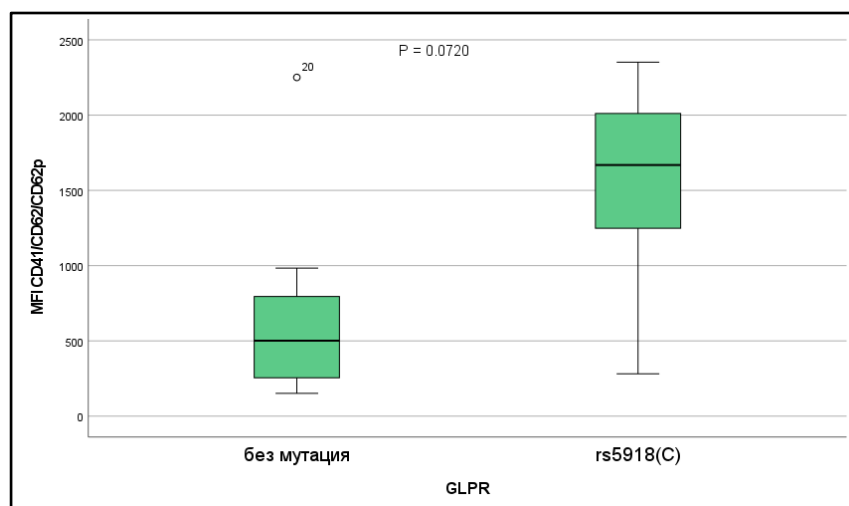
Най- голямото количество микрочастици обрзуват пациенти с артериални тромбози носители на носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa.

Докато при пациентите с артериална тромбоза носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa процента на образуваните микро частици е най-висок **23,7** (Средни стойности на % ANX V)

Данните за здрави носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa и донори на цялостна кръв съвпадат, затова резултатите са представени обобщено.

Съвпадение има и при здрави донори не носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa и здрави контроли не носители на този полиморфизъм.

Експресията на маркерите за активиране и екстернализация на основния тромбоцитен гликопротеин CD41 и CD62p изразена чрез MFI (средна интензивност на флуоресценцията) при пациенти с ДВТ носители и неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa е представена като диаграмана Фиг. 12. Ясно личи, че активността на тромбоцитите при пациенти с ДВТ носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa е двойно по – висока в сравнение с тази при пациенти с ДВТ неносители на полиморфизъм ($P=0,0720$), което доказва връзката между носителството на полиморфизъм и високата степен на активиране на тромбоцитите.



Фиг. 12 Активността на тромбоцитите, изолирани от пациенти с ДВТ носители и неносители на полиморфизъм rs5918 (C) в ITGB3, представена като средна интензивност на флуоресценцията (MFI) CD41/CD61/CD62p

5. Носителство на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa при здрави контроли, дарители, пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода носители

Полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa бе изследван при 146 здрави контроли (70 мъже и 76 жени) и 172 пациенти с дълбока венозна тромбоза (84 мъже и 88 жени). Честотата на носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa полиморфизъм бе изчислена като сума от на хомозиготното rs5918(T) PLA1 и rs5918(C) PLA2 и хетерозиготно носителство на rs5918 (C/T) / PLA1/PLA2 при здрави контроли от кавказка раса и при здрави дарители от ромски произход. Хомозиготното носителството на rs5918(T) е доста рядко в общата популация (около 1%) и не бе намерено намерено при контролите и здрави дарители, а при общо пациентите бе 2.33% (Таблица 5). Алелната честота съгласно Hardy-Weinberg бе изчислена както следва: за контролите съответно: за жени контроли за алел [rs5918 (C)/PLA₂] 28.95% и за алел [rs5918 (T)/PLA₁] 71.05%; за мъже контроли за алел [rs5918 (C)/PLA₂] 18.57% и за алел [rs5918(T)/PLA₁]; 81.43%. За пациентите от женски пол 44.32% за алел [rs5918 (C)/PLA₂] и е 52.27% за алел [rs5918(T)/PLA₁], като при тази група има и хомозиготно носителство на [rs5918 (CC)/PLA₂ /A₂] 3.41%; за пациенти от мъжки пол алелната честота е 27.38% за алел [rs5918 (C)/PLA₂] и 71.43% за алел [rs5918 (T)/PLA₁] и хомозиготно носителство на [rs5918 (CC)/PLA₂ /A₂] 1.19%. (Таблица 5).

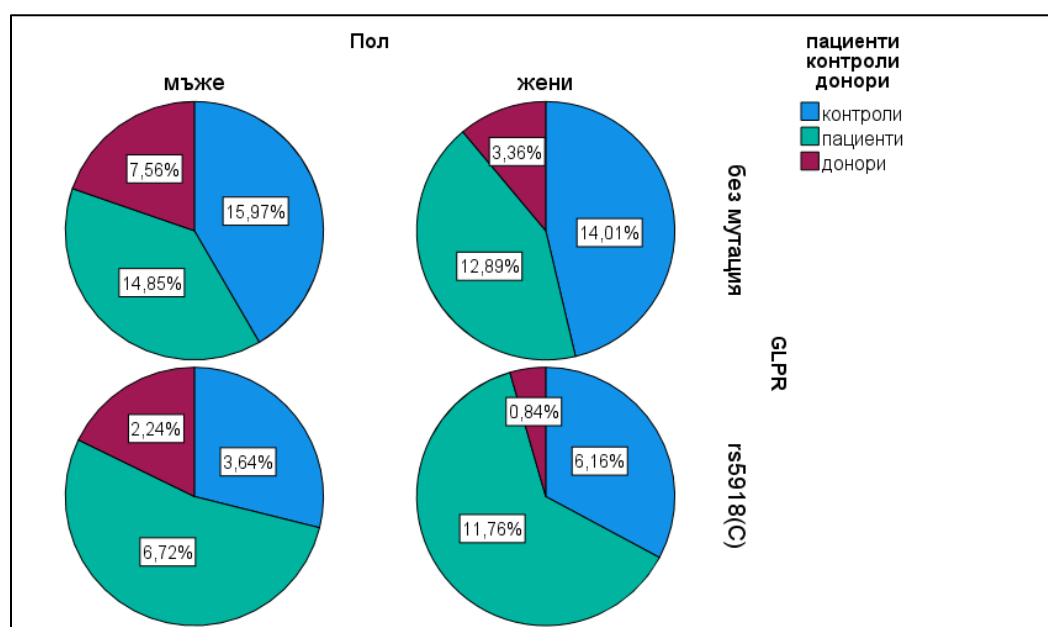
Честотата на носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa при дарителите бе намерена съответно при жените 20.00% за [rs5918 (C)/PLA₂], 80.00% за алел [rs5918 (T)/PLA₁], а при мъжете 17.14% за [rs5918 (C)/PLA₂], и 82.86% за алел [rs5918 (T)/PLA₁]. При дарителите липсва хомозиготно носителство на [rs5918 (CC)/PLA₂ /A₂] (Таблица 5).

Таблица 5. Генни честоти на (PLA1 / A2) полиморфизъм при контроли, дарители и ДВТ пациенти.

Генни честоти (%)	(PLA1/A2)		
	(PLA2/A2) rs5918 CC	(PLA1/A2) rs5918 TC	(PLA1/A1) rs5918 TT
Контроли жени	0 (0%)	22 (28.95%)	54 (71.05%)
Контроли мъже	0 (0.0%)	13 (18.57%)	57 (81.43%)
Общо контроли	0 (0.0%)	35 (23.97%)	111 (76.03%)

Дарители мъже	0 (0.0%)	6 (17.14%)	29 (82.86%)
Дарители жени	0 (0.0%)	3 (20.00%)	12 (80.00%)
Общо дарители	0 (0.0%)	9 (18.00%)	41 (82.00%)
Жени с ДВТ	3 (3.41%)	39 (44.32%)	46 (52.27%)
Мъже с ДВТ	1 (1.19%)	23 (27.38%)	60 (71.43%)
Общо ДВТ	4 (2.33%)	62 (36.05%)	106 (61.63%)

От Фиг. 13 се вижда, че при пациентите с ДВТ от женски пол носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa се среща по-често (11.76%), докато при пациентите с ДВТ мъже това носителство е двойно по-нисъко (6.72%). Затова потърсихме зависимост между женският пол, възраст, носителство на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa и развитие на ДВТ



Фиг. 13 Разпределение по пол на полиморфизъм rs5918 (C) при пациенти с ДВТ контроли и донори на цялостна кръв

Таблица 6. Алелни честоти на (PLA1 / A2) полиморфизъм при контроли, дарители и ДВТ пациенти.

Алелни честоти	rs5918 (C)/PLA2	rs5918(T)/PLA1	p
Контроли жени	18 (23.64%)	58 (76.31%)	0.2386
Жени с ДВТ	31 (35.22%)	57 (64.77%)	0.4788

Контроли мъже	12(17.14%)	58 (82.85%)	0.4331
Мъже с ДВТ	25 (29.76%)	59 (70.23%)	0.2961
Общо контроли	35 (24.6%)	107 (75.4%)	0.1633
Общо пациенти	66 (40.00%)	99 (60.00%)	0.2459
Общо дарители	11 (22.00%)	39 (78.00%)	0.1794

Честотата на носителството на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa бе намерена значително по-висока при пациенти с ДВТ от женски пол ($\chi^2 = 7.565$ $p=0.008$) и в общата група пациенти ($\chi^2 = 9.266$ $p = 0.002$), в сравнение с контролите, при пациенти с ДВТ от мъжки пол честотата на носителството на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa е 28.4% ($\chi^2 = 2.541$ $p = 0.156$). (Таблица 7)

Таблица 7. Носителство на rs5918 (C) (PLA2), Pearson Chi-Squared, точен тест на Фишер, относителен риск и 95% конфиденциален интервал CI за носителството на rs5918(C) полиморфизъм в ITGB3 при пациенти от мъжки и женски пол в сравнение с контролите.

Статистически стойности	Носителство при пациенти %	Носителство при контроли %	Pearson χ^2	Fisher test (p)	OR	95% Конфиденциален интервал
Жени с ДВТ	36.7	20.20	7.565	0.008*	2.289	1.260–4.160
Мъже с ДВТ	28.4	18.1	2.541	0.156	1.804	0.869–3.745
Общо пациенти	32.8	19.30	9.266	0.002*	2.032	1.282–3.280

6. Резултати показващи риск от инцидент на дълбока венозна тромбоза при носители на полиморфизъм А1/А2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa

Изчисленият риск от инцидент на дълбока венозна тромбоза бе по- висок при млади жени, носители на полиморфизъм (OR = 3.117, $\chi^2= 7.393$, $p = 0.011$), но не и при мъжете от същата възрастова група. (Таблица 8)

Значителна разлика бе намерена между средните стойностите за преживяемостта до инцидент на ДВТ при млади пациенти под 45 години обща група, носители и неносители на PLA2 (37.87 години срещу 34,93 години; $\chi^2 = 6.424$, $p=0.011$). (Таблица 9)

Таблица 8. Носителство на PLA2, Pearson Chi-Squared, точен тест на Фишер, относителен риск и 95% конфиденциален интервал CI за носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за ГРПb/Ша при млади пациенти от мъжки и женски пол в сравнение с контролите.

Статистически стойности	Носителство при пациенти %	Носителство при контроли %	Pearson χ^2	Fisher test (p)	OR	95% Конфиденциален интервал
Жени <45 г.	37.3	17.6	7.393	0.011*	3.117	1.348–7.211
Мъже <45 г.	22.0	16.0	0.898	0.456	1.598	0.603–4.234
Общо пациенти <45г.	29.1	16.8	6.391	0.016*	2.231	1.188–4.190

Намерена бе значителна разлика и между средните стойностите за преживяемостта до инцидент на ДВТ при млади жени под 45 години, носители и неносители на PLA2 (39.36 години срещу 34.5 години; χ^2 7.027, $p=0.008$) (Таблица 9).

Не бяха открити значителни разлики за преживяемостта до инцидент на ДВТ в група пациентите от мъжки пол, носители и неносители на rs5918 полиморфизъм в ITGB3. При пациентите над 45 години не бе открита значителна разлика във вероятността за по-ранен инцидент на ДВТ между носители и неносители на полиморфизъм (Таблица 9).

Таблица 9. Средни стойности на преживяемостта, стандартно отклонение, 95% конфиденциален интервал на Chi-квадрат и значение за 50% вероятност на събитието при пациенти под 45 години и над 45 години, носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за ГРПb/Ша.

Пациенти Възраст (год.)	Носителство на PLA1 / A2	Средна стойност	Стандартно отклонение	95% CI	χ^2 *	Fisher test (p)
Жени <45 год.	0	39.366	0.892	37.618-39.366	7.027	0.008**
	1	34.495	1.614	31.331- 34.495		
Мъже<45 год.	0	36.659	1.077	34.549- 38.770	1.081	0.298
	1	34.516	2.343	29.923-39.109		
Общо пациенти < 45 год.	0	37.876	0.692	36.520 -39.232	6.424	0.011**
	1	34.939	1.285	32.420- 37.457		
Жени > 45 год.	0	60.337	1.641	57.121- 63.553	1.012	0.314
	1	62.367	2.443	57.579- 67.156		

Мъже > 45 год.	0	59.578	1.531	56.577- 62.580	0.637	0.425
	1	57.963	1.922	54.196- 61.730		
Общо пациенти > 45 год.	0	60.006	1.036	57.975 - 62.037	1.211	0.292
	1	61.498	1.691	58.183 - 64.813		

* χ^2 Log Rank Mantel-Cox, ** Сигнификантна стойност $p < 0.05$

7. Повтарящи се тромботични инциденти при носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa

Повтарящо се събитие на ВТЕ е един от най-важните фактори за клиницистите предвид разработването на адекватна стратегия за лечение и профилактика.

При пациенти носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa, честотата на повтарящи се тромботични инциденти бе значително по-висока при жените 39.1, в сравнение с 25.9 при мъжете. Значително по-висок е и рискът от повтарящ се инцидент при жените носителки на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa ($\chi^2 = 3.634$, OR = 2.581, $p = 0.025$), и особено при младите жени ($\chi^2 = 3.405$, OR = 2.581, $p = 0.044$). (Таблица 10).

Таблица 10. Честота на генотипа (Pearson Chi-Square, точен тест на Fisher) при пациенти с повтарящи се събития, носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa.

Статистически стойности за повтарящи се събития	Носители PLA1 / A2 %	Носители на дивия алел %	Pearson χ^2	OR	Fisher test (p)
Жени < 45 год.	42.1	22.1	3.405	2.581	0.044*
Жени > 45 год.	36.4	32.4	0.023	1.193	0.723
Жени общо	39.1	26.30	3.634	1.785	0.025*
Мъже < 45 год.	25.8	16.4	1.387	1.798	0.239
Мъже > 45 год.	25.9	29.5	0.1345	0.782	0.717
Мъже общо	25.9	22.6	0.518	1.266	0.475

* Сигнификантна стойност $p < 0.05$

Таблица 11. Честота на носителство на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa, Chi-Squared, точен тест на Фишер, относителен риск и 95% конфиденциален интервал при жени с репродуктивни проблеми с ранни загуби на плода

Генетичен фактор	Честота в контроли %	Честота при пациенти със ЗП %	Chi-Squared	Fisher test (p)	Mantel-Haenszel Odds Ratio	95% Конфиденциален интервал	Asymp. Sig.(p)
rs5918(C)	19.4	31.8	15.055	0.001	1.937	1.383-2.711	0.044

Носителството полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa при по-възрастни и по-млади мъже с повтарящи се инциденти не се различава значително.

Няма разлика в интервала преди следващото събитие и при по-възрастните жени, нито при пациентите от мъжки пол с повтарящи се инциденти носители и неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa.

Носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa при жени с ранни загуби на плода през 5-11 г.с е 31.8% ($\chi^2 = 15.055$, $p = 0.001$)

8. Обсъждане на значението на носителство на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa за промени в наномеханичните свойства и активирането на тромбоцитите.

Активирането на тромбоцитите води до патологични тромботичните инциденти. Основните промени при активирането на тромбоцитите са съответно промени по повърхността им, дължащи се на експресия на гликопротеини. Полиморфизмът в тромбоцитния гликопротеин повишава афинитет на тромбоцита към интегриновите агонисти, които активират агрегацията и адхезията на тромбоцитите, от което следва образуването на тромб в увреденият кръвоносен съд.

Морфологичните промени в тромбоцитите се дължат на реорганизация на цитоскелета им, включват взаимодействие между различни рецептори и адхезия на медиращите лиганди. Полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa е свързан с конформационни промени в гликопротеина, които могат да окажат влияние върху топографски промени на тромбоцитите, както и на сигналните пътища, и по този начин да повлияят настъпването на тромботичен инцидент. Ние изследвахме влиянието на носителството на A2 алела върху тромбоцитната наномеханика и сравнихме топологията модула на Young на тромбоцитите, получени от здрави индивиди и пациенти с ДВТ, носители и неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa.

Установихме, че грапавостта и височината на тромбоцитите изолирани от пациенти с ДВТ, носители и неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa са намалени в сравнение със съответните здрави контроли, които са неносители. Причината за този резултат може да бъде разлика в етапа на активирането на тромбоцитите. Може да се предположи, че при здрави лица, неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa, новообразуваните микрочастици остават скупчени в централната част на тромбоцитите (Фиг. 1 А), което допринася за по-голяма височина и грапавостта на тромбоцита. Само малка част от микрочастиците/гранули се намират в близост до тромбоцитите. Тромбоцитите на здрави индивиди, носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa, се оказват в по-напреднал етап на активиране с частично освободени, микрочастици, наблюдавани в близост до тромбоцитите и отчасти, присъстващи по повърхността на клетките (Фиг. 1 D). Тромбоцитните фракции изолирани от пациенти с ДВТ, носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa се характеризират с ниски по размер с плоски/гладки мембрани и значително по-голям брой микрочастици или гранули разположени в близост.

Множество малки обекти, открити около активираните тромбоцити, вероятно представляват микрочастици (Фиг. 1), което показва, че техните морфологични характеристики (форма и размери) също са силно зависими от носителството на полиморфизъм.

Стойностите на модула на Young на здрави контроли са много по-високи (>150 кПа) от отчетените в изследванията на Lee и Marchant (46.5, 29.7, и 6,2 кПа) и Rheinlaender и др. (46.6 кПа), което може да се дължи на факта, че нашите измервания с АСМ се провеждат във въздушна среда с тромбоцитите фиксирани с 1% глутаралдехид, докато в гореспомнатите изследвания се работи във водна среда.

В нашето проучване, установяваме, че тромбоцитите изолирани от здрави индивиди носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa, имат почти два пъти по-висока стойност на модула на Young (359 ± 61 кПа) в сравнение със здрави лица, неносители на (198 ± 50 кПа). Модула на Young има също значително по-високи стойности на тромбоцитите при пациенти с ДВТ, носители и неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa, сравнени с тези на здрави контроли, неносители (Фиг.9). Наблюдавахме и повишена мембранна „твърдост“ на тромбоцити, предварително

активирани с АДФ. Стойностите на модула на Young на активирани с АДФ тромбоцити (402 ± 123 кРа) са близки до тази на тромбоцитите носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa. Това потвърждава, че те са в по-късна фаза на активиране, което е видно и от нашите данни, получени чрез флуоцитометрия. Активността на тромбоцитите изолирани от пациенти носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa бе значително по-висока от тези без носителство. По-високата твърдост на мембраната на тромбоцитите при пациенти с ДВТ трябва да се дължи на повишената степен на тяхното активиране.

Нашите изследвания относно активността на тромбоцитите показаха че носителите на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa от пациенти с ДВТ имат двойно по-високи стойности на MFI CD41/CD61/CD62p и съответно степента на активиране на тромбоцитите е двойно по-висока в сравнение с тази при пациенти с ДВТ неносители на полиморфизъм ($P=0,0720$). (Фиг. 12)

Може да заключим, че се доказва връзката между наличие на полиморфизъм и високата степен на активиране на тромбоцитите.

Показателят Q2 – за активирани тромбоцити на двойната положителна популация CD41/CD62P от скатер диаграмите на Фиг. 9 ясно показва, че най-голям процент активирани тромбоцити се наблюдават при пациенти с артериална тромбоза (МИ) с хомозиготно носителство на полиморфизъм A1/A2 в гена за GP IIb/IIIa (Фиг. 9 D) следвани от пациенти с венозна тромбоза (ДВТ) носители на полиморфизъм A1/A2 в гена за GP IIb/IIIa сравнени с контролите здрав носител и здрав неносител (Фиг. 9).

Пациенти с артериална тромбоза хомозиготни по полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa показват високи стойности на P1 образуване на гранули от тромбоцитите, маркер за тяхното активиране. Фиг.10

Можем да заключим, че при пациенти с миокарден инфаркт с хомозиготно носителство на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa, тромбоцитите им образуват голям брой тромбоцитни частици.

Съобразно резултатите от флуоцитометрията можем да заключим, че се доказва връзката между наличие на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa и високата степен на активиране на тромбоцитите.

При хомозиготно носителство на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa връзката с активиране на тромбоцитите е силно изразена.

9. Значение на генетичен полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa при жени с ранни загуби на плода

Намерихме сигнификантна връзка между загуби на плода в период на имплантация и развитието на плацента от 5 г.с. до 10 г.с и честотата на носителство на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa при жени с ранни загуби на плода 31.8% ($\chi^2 = 15.055$, $p = 0.001$). (Таблица 11)

За да се убедим в това, че PLA2 действително има принос към инцидентите, измерихме активността на тромбоцитите и проучихме топографските им параметри. Нашите изследвания на активността на тромбоцитите показаха че носителите на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa и със загуба на плода през 8-10 седмица имат по-високи стойности на MFI CD41/CD61/CD62p и степента на активирането в сравнение с не носителите на мутацията. Топографските изследвания също така показаха, че носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa води до променена сензитивност на тромбоцитите към активиращите сигнали и по-бързото им активиране (Фиг.2).

АСМ изследвания също така потвърждават по-висока степен на активирането на тромбоцитите (модула на Young) при бременни жени, както и увеличаване на площта и височината на тромбоцитите. Отделят се и микрочастици с полигонална форма, преимуществено от филоподиите. Наличието на повишените нива на тромбоцитни микрочастиците при бременни жени, което е интересен факт, е коментирано и в други публикации и е маркер на повишена прокоагулантна активност.

На АСМ изображенията на сканираните проби получени от жена със СПА през (8г.с.) носителка на PLA2 / rs5918 (С), се наблюдават множество тромбоцити, скупчени на групи с изцяло сляти помежду им хиалоплазми (Фиг. 2 F). Тромбоцитите са по-гладки и с по-голяма площ. Всички тези данни говорят за по-висока степен на активирането им. Това се потвърждава и от флуоцитометричното изследване на тромбоцитите при жени с ранни загуби на плода. При тях се установява висок процент на показателя за броя на образуваните тромбоцитните частици P6, определен на базата на процента CD41 позитивни

клетки. При жени с ранни загуби на плода носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa този процент е висок 62,6% (Фиг. 11 E),

10. Изводи за промените в тромбоцитите при здрави контроли, дарители пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa

АСМ методът се прилага с цел да се характеризират качествено и количествено механичните свойства и топографията на тромбоцитите, и да се определи конкретния ефект на полиморфизъм P1A2 върху наномеханиката на тромбоцитите.

1. Ние продемонстрирахме, че степента на тромбоцитната еластичност, грапавост и височина силно зависи от носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa при здрави лица, при пациенти с ДВТ и жени с репродуктивни неудачи.

2. Грапавостта и височината на тромбоцитите, изолирани от пациенти с ДВТ и жени с репродуктивни неудачи носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa са с по-високи стойности от тези на здрави индивиди неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa.

3. Степента на твърдост на тромбоцитите е по-висока за пациентите с ДВТ с носителство на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa в сравнение със здравите индивиди в етапа на разливане/спрединг. Също така установихме, че плазмените мембрани на тромбоцитите при здрави хора, носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa, са два пъти по-твърди от тези на носителите на полиморфизма.

4. По този начин нашите резултати ясно показват, че носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa води до **наномеханични промени в тромбоцитите**, и е свързано с **повишената им активност**. Тази зависимост ясно проличава при пациенти с ДВТ, носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa и жени с ранни загуби на плода носителки на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa в сравнение с неносителите здрави индивиди. Тези наблюдения биха могли да имат принос върху разбирането на природата на връзката между тромбофиличните фактори и механизми на патологичните процеси.

5. Генетичният вариант A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa допринася за по-висок риск от единични и повтарящи се инциденти на ДВТ при жените в по-млада възраст.

(Честотата на носителство на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa е значително по-висока сред жените пациенти с ДВТ в сравнение с жените контроли.)

6. Вероятността от по-ранна проява на инцидент на ДВТ при млади пациенти от женски пол, носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa, е по-висока в сравнение с неносителите.

7. При млади жени с дълбока венозна тромбоза, носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa, повтарящите се епизоди са значително повече в сравнение с по-възрастните жени носители на същия полиморфизъм.

8. При жени с ранни загуби на плода носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa може да се смята за фактор който повишава риска за патологичен инцидент.

11. Изследване на морфологичните и наномеханичните особености на тромбоцитите, чрез АСМ при здрави контроли, дарители пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода носители носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889)

При активиране тромбоцитите претърпяват редица морфологични промени от дискоидни, те се трансформират в неправилна сферична форма, като мембраната им става силно нагъната в началния стадий на активиране.

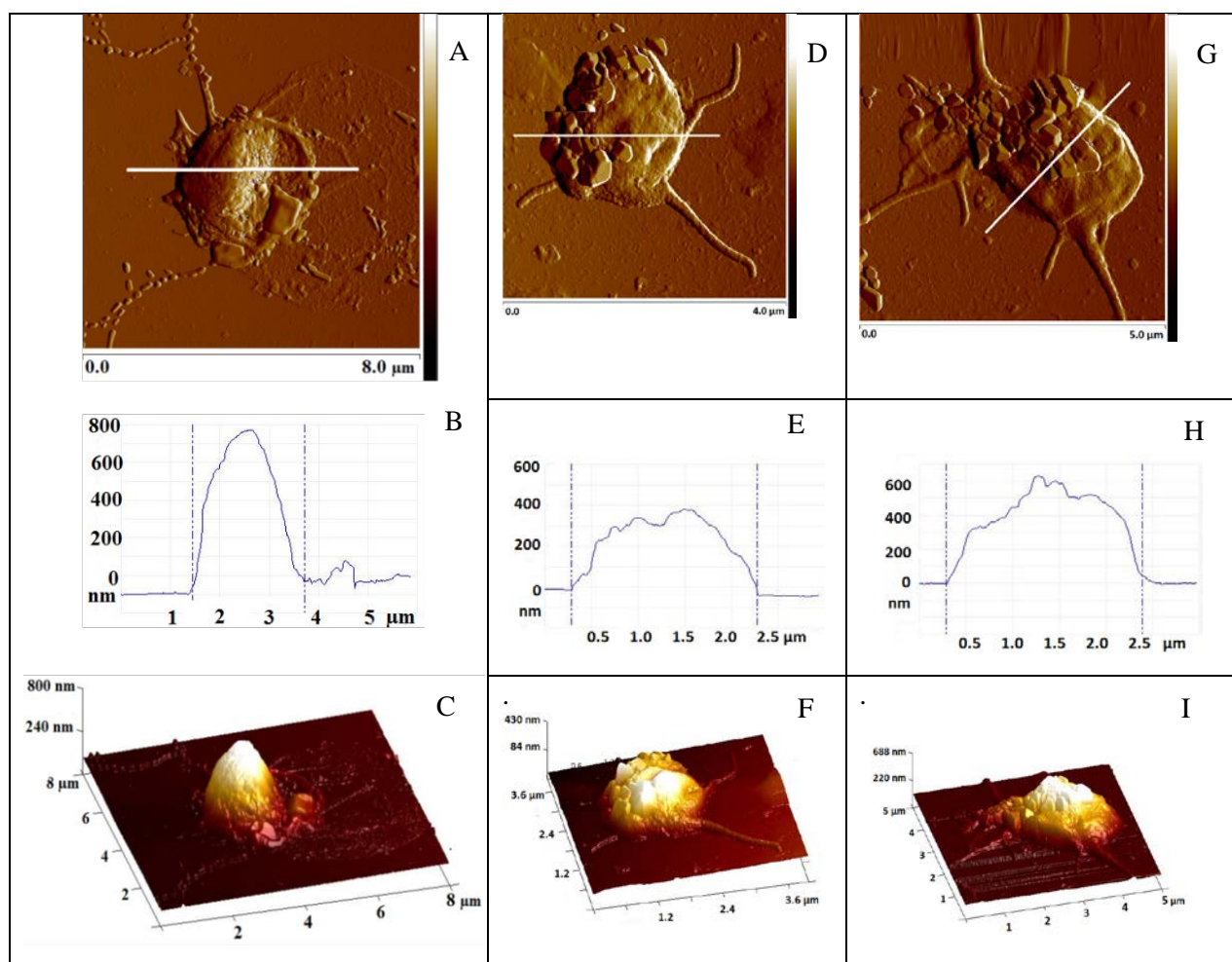
На следващия етап се образуват филоподии и ламелоподии, последвано от разстилане на хиалоплазмата около тромбоцита. (Фиг.14 А, В, С) ДВТ пациенти имат сходни АСМ характеристики на тромбоцити с известни разлики в топографски величини като височина, площ и грапавост (Ra) на мембраната, което предполагаме до определена степен зависи от носителството на генетичните мутации. (Фиг.14 D-I) Общото за тези параметри е, че техните стойности са значително по-ниски от съответните, определени за здрави индивиди, което може да бъде индикация за разлика в състоянието на активиране.

Средната площ на тромбоцитите, изолирани от ДВТ пациенти, носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) е $3.76 \pm 1.0 \mu\text{m}^2$, която е по-ниска от тази на тромбоцити от здрави индивиди.

Измерените височини на тромбоцити, изолирани от ДВТ пациенти имат по-ниски стойности от тези на здрави контроли. Друг важен параметър за състоянието на активиране на тромбоцитите е грапавостта (Ra) на тяхната мембрана, измерена в централната част на тромбоцита ($0.9 \times 0.9 \mu\text{m}$). Грапавостта отразява състоянието на тромбоцита. Ra има много

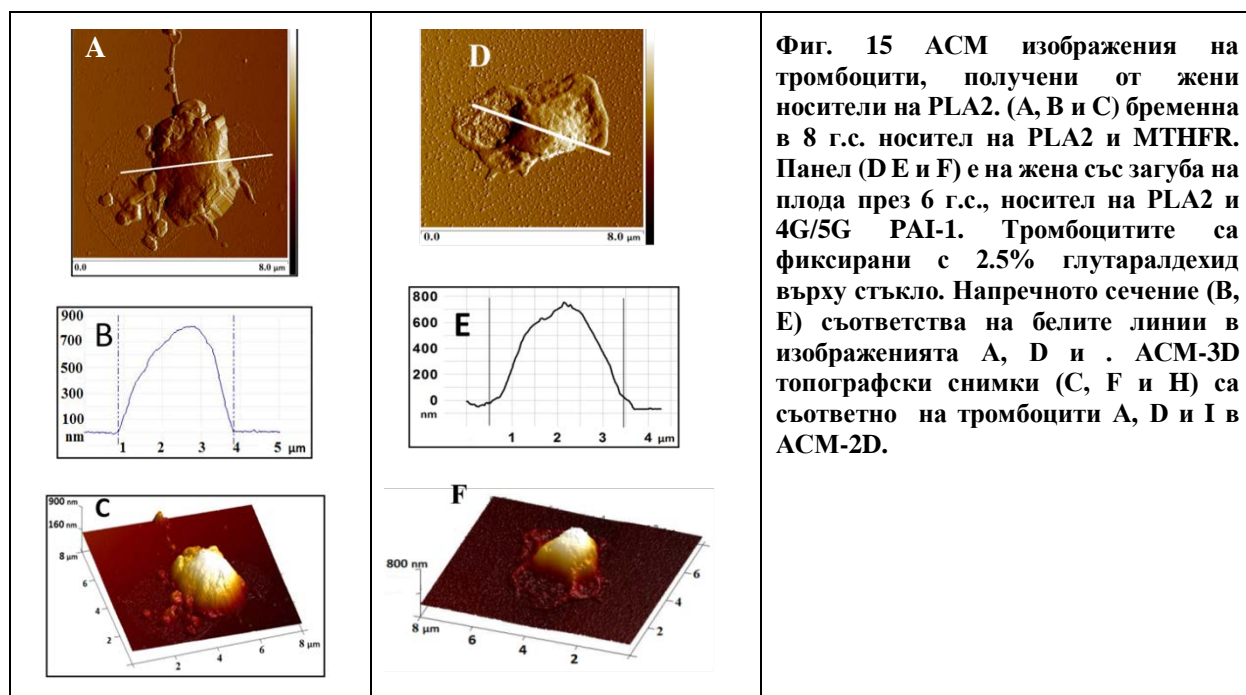
близки стойности за всички ДВТ пациенти (28 – 30 nm), независимо от носителството на мутация. Тази стойност е значително по-ниска от измерената за здрави индивиди.

АСМ показва тенденция на изразено „прилепване“ на тромбоцитите към подложката „тип пържено яйце“ и разливане на хиалоплазмата в тънък слой плътно около централно събрани клетъчни органели (Фиг. 15 D). Топографските параметри (височина и площ) на тромбоцитите при жените със загуби на плода са значително по-ниски в сравнение с тромбоцитите на контролите и здрави бременни (табл. 12). Броя на микрочастиците образувани от тромбоцитите на жените с ранни загуби на плода е увеличен (повече от 4 пъти) в сравнение с микрочастиците образувани от тромбоцитите на контролите и бременните жени. Тези частици имат елипсоидна или полигонална форма. Обемът им е $0.004\mu\text{m}^3$ и са с размери под 80 nm. Разположени са в близост до тромбоцитите, като образуват плътна покривка около самите тромбоцити.



Фиг. 14 АСМ изображения на тромбоцити, получени от здрав индивид носител на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) (А, В и С), и ДВТ пациент носител на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) (D - I). Тромбоцитите са фиксирани с 2.5% глутаралдехид върху покривно стъкло. Скалата е посочена във всеки панел. АСМ-2D профил (А, D, G) получен при сканиране XY площ 8x8 μm^2 , Z = 900nm.

В рамките са представени уголемени снимки на централната зона. Напречно сечение (В, Е, Н), съответства на бели линии в изображенията А, D и G. АСМ-3D топографски снимки (F, I) на съответните тромбоцити в изображения А, D и G . Изображенията бяха направени на въздух при стайна температура.



Фиг. 15 АСМ изображения на тромбоцити, получени от жени носители на PLA2. (А, В и С) бременна в 8 г.с. носител на PLA2 и MTHFR. Панел (D E и F) е на жена със загуба на плода през 6 г.с., носител на PLA2 и 4G/5G PAI-1. Тромбоцитите са фиксирани с 2.5% глутаралдехид върху стъкло. Напречното сечение (В, Е) съответства на белите линии в изображенията А, D и . АСМ-3D топографски снимки (С, F и H) са съответно на тромбоцити А, D и I в АСМ-2D.

Мембраната на тромбоцитите на жените с ранни загуби на плода е с увеличена грапавост почти двойно по-висока от тази на тромбоцитите на контролите. Вероятно тази увеличена стойност се дължи не толкова на нагъването на самата мембрана, а на факта, че тя е плътно покрита с тромбоцитни микрочастици, което води до увеличение почти два пъти на грапавостта.

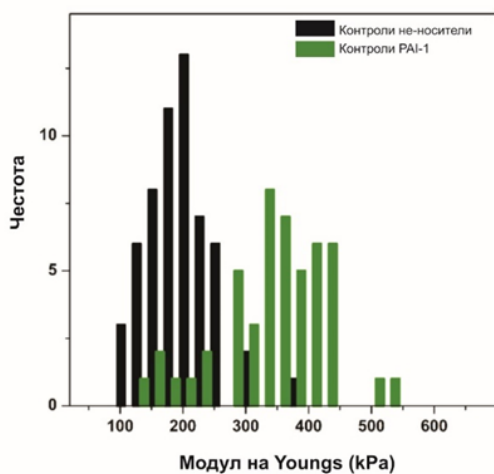
Таблица 12. Средни стойности и стандартни отклонения височината (H), площ, грапавостта (Ra) и Young модул (E) на тромбоцитите изолирани носители и неносители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) пациенти с ДВТ и жени с репродуктивни неудачи

Изследвани индивиди	Носителство 4G/5G PAI-1	h (nm)	Тромбоцити Площ (mm ²)	Ra (nm)b
Контроли	0	1021 + 433	5.2 + 2.6	49.7 + 14
Пациенти с ДВТ	0	865 + 290	5.0 + 2.4	28.6 + 6

Пациенти с ДВТ	4G/4G PAI-1	771 ± 150	3.76 ± 1.0	29.3 ± 3.9
Здрави бременни жени	0	1035 ± 177	6.78 ± 1.5	29.4 ± 6.0
Жени с ранни загуби на плода	4G/4G PAI-1	692 ± 121	4.70 ± 1.0	41.1 ± 9.5

12. Модул на Young на тромбоцити здрави контроли и пациенти с ДВТ, носители и неносители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa.

Стойностите на модула на Young за здрави контроли са 371 ± 67 kPa и 198 ± 50 kPa, съответно за носители и неносители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889). Носителството на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) допринася за по-изразена промяна в еластичността на мембраните на тромбоцитите при здрави индивиди, носители на полиморфизъм. При носителите еластичността на мембраните на тромбоцитите е по-малка, което прави тромбоцитите по-ригидни (Фиг.16)

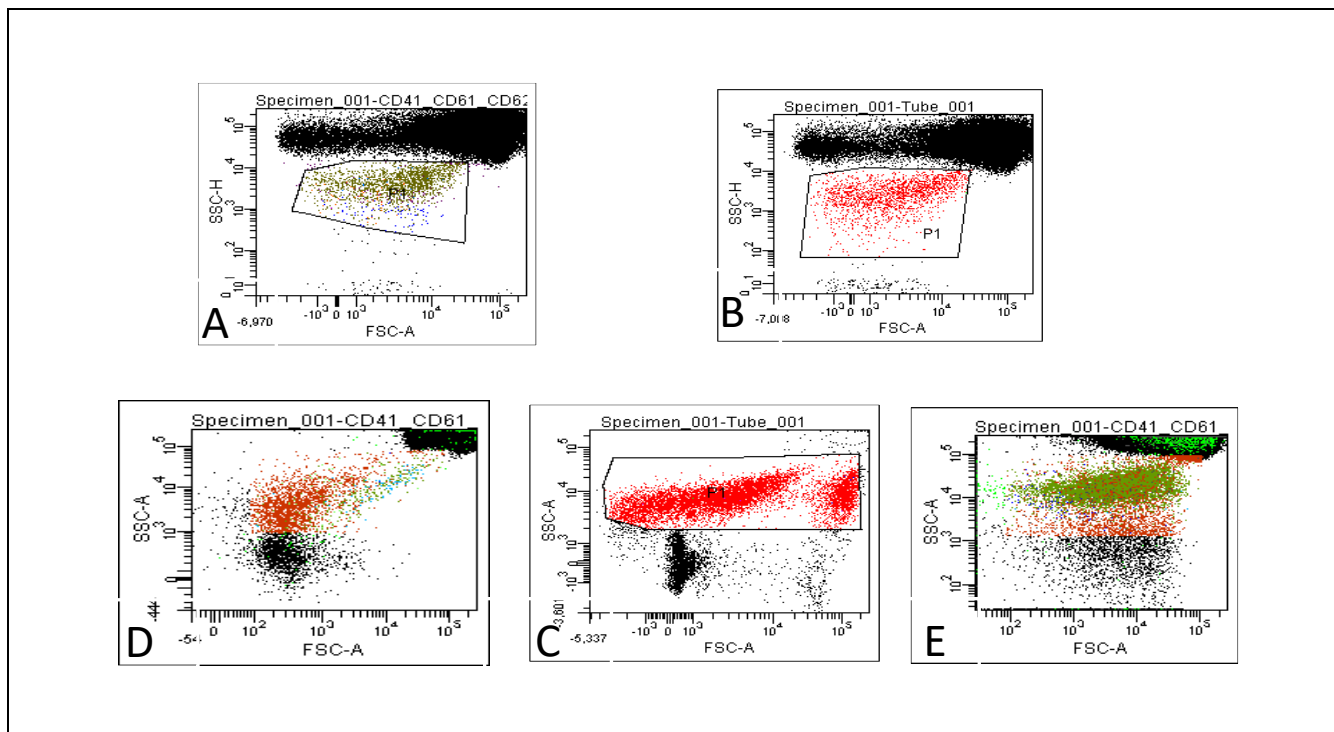


Фиг. 16 Хистограма на Young модули измерени за тромбоцити, изолирани от здрави контроли, носители и неносители на носител на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889).

13. Флоуцитометрично изследване на активността на тромбоцитите на здрави контроли, дарители, пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода носители при полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889)

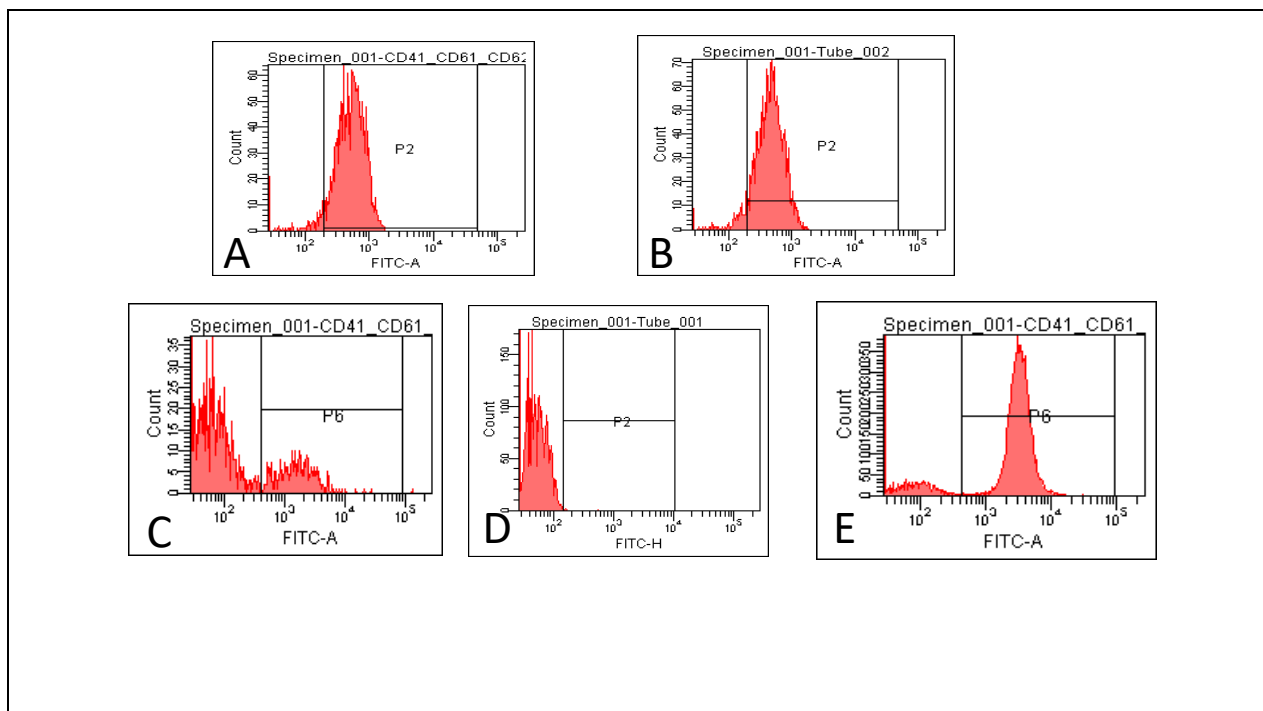
Пробите изследвани чрез флоуцитометрия съдържат смес от активирани тромбоцити и такива в покой. Данните се изобразяват, като се използва логаритмично-ортогонално и

логаритмично-напредващо светлинно разсейване. Комплексът от CD61-позитивни клетки се комбинира с клетки с CD41 и CD62P. Двойно - положителна популация CD41/CD62P (Q2) се характеризира като активирани тромбоцити.



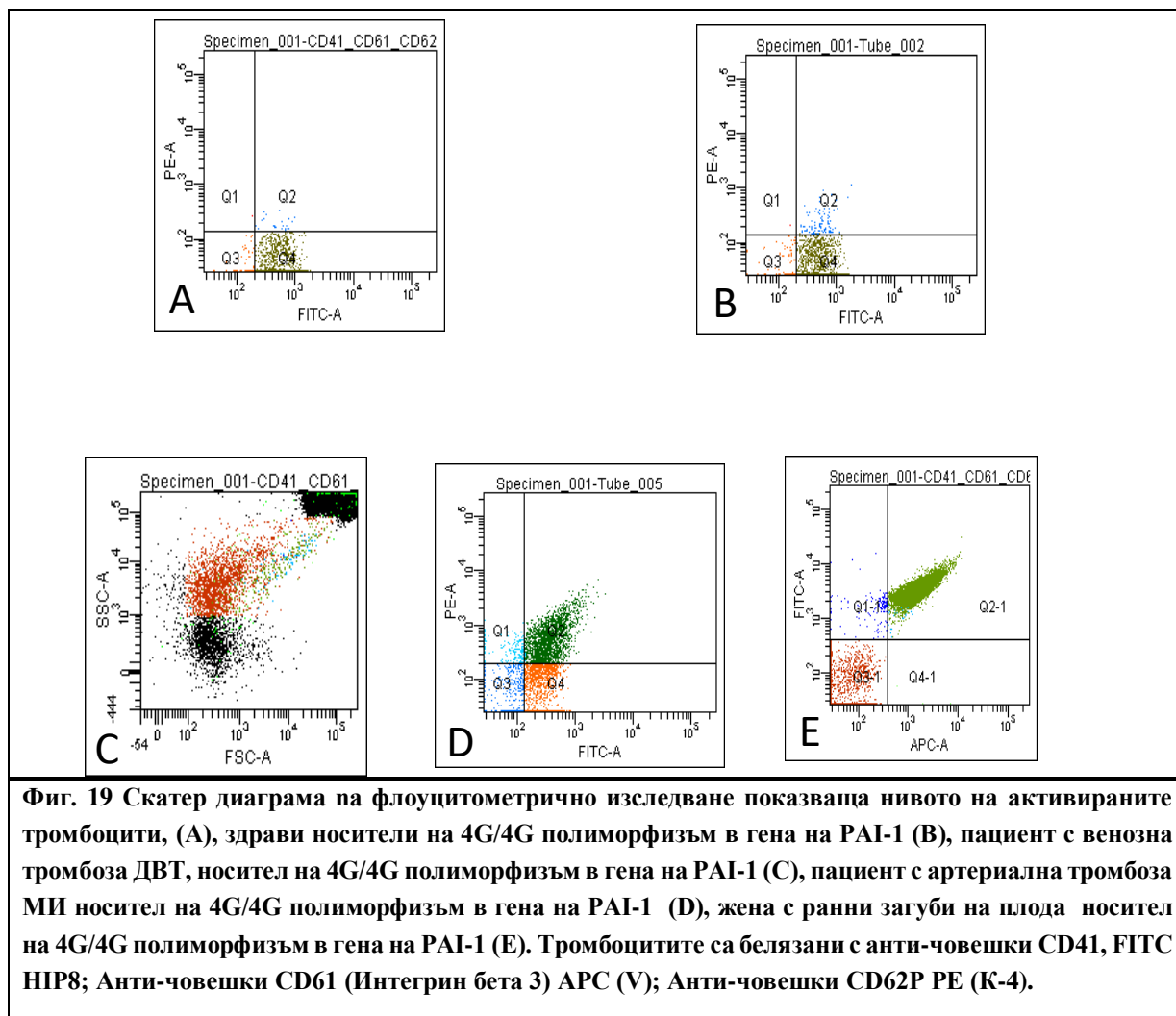
Фиг. 17 Скатер диаграма на флоуцитометрично изследване показваща нивото на гранулираност на тромбоцитите, изолирани от здрави неносители – (А), здрави носители на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 (В), пациент с венозна тромбоза ДВТ, носител на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 (С), пациент с артериална тромбоза МИ носител на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 (D), жена с ранни загуби на плода носител на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1(E).

Даните за гранулираност на тромбоцита P1 показват по-изразена такава само при пациенти с артериална тромбоза МИ носители на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 (Фиг. 17D) 38,7%, докато при пациенти с венозна тромбоза ДВТ носители на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 стойностите са ниски 4,9%; (Фиг. 17 C), при здрави носители са 4,0%; (Фиг. 17 A) и здрави неносители са 5,8% (Фиг. 17 B) При жени с ранни загуби на плода процента на гранулираност P1 е 4,6% (Фиг. 17 E). Можем да заключим, че повишена гранулираност на тромбоцитите се наблюдава само при пациенти с артериална тромбоза носители на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1.



Фиг. 18 Скатер диаграма на флуцитометрично изследване показваща нивото на тромбоцитните частици на тромбоцитите, изолирани от здрави носители – (A), здрави носители на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 (B), пациент с венозна тромбоза ДВТ, носител на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 (C), пациент с артериална тромбоза МИ носител на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 (D), жена с ранни загуби на плода носител на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 (E).

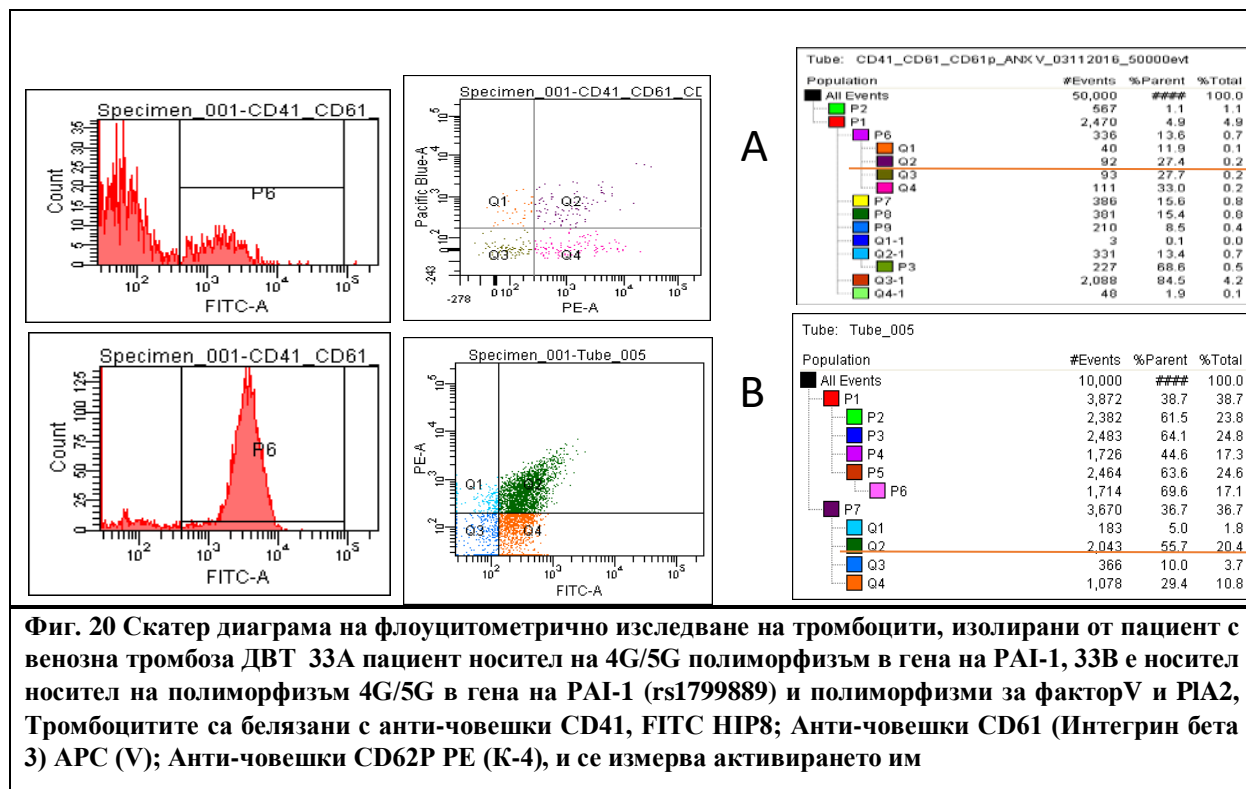
P6 представлява процент на тромбоцитните частици представен на базата на процента CD41 позитивни клетки. Наблюдават се с най-висок процент при жени с ранни загуби на плода носителки на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 77,6% (Фиг. 18 E) следвани от пациенти с артериална тромбоза (МИ) носителки на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 69.6 % (Фиг. 18 D) и венозна тромбоза ДВТ носители на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 13.6 % (Фиг. 18 C) докато при здрав носител на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 (Фиг. 18 B) и носители (Фиг. 18 A) образуване на тромбоцитни частици липсва.



Q2 е показател за активирани тромбоцити. От скатер диаграмите се вижда че най-много активирани тромбоцити се наблюдават при пациент с артериална тромбоза носители на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 (МИ) 55.7%, (Фиг. 32 D) следвани от пациент с венозна тромбоза ДВТ носители на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 27.4% (Фиг. 19 C) докато при здрави носители на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 (Фиг. 19 B) и при здрави неносители (Фиг. 19 A) процента на активирани тромбоцити е доста нисък 5% за носителите и 1.3% при здрави неносители на полиморфизма. При жени с ранни загуби на плода (Фиг. 19 E) носителки на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 данните за активирани на тромбоцитите са много ниски 0.9%.

При пациентите с артериална тромбоза носители на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 (МИ) - (Фиг. 19 D) и пациенти с ДВТ носители на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1

(Фиг. 19 С) прави впечатление разликата в броя на тромбоцитите (CD41 позитивни клетки). При пациенти с ДВТ носители 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 този брой на тромбоцитите е по-нисък за сметка на високата степен на активирани (CD41/CD62p позитивни клетки).



Фиг. 20 Скатер диаграма на флоуцитометрично изследване на тромбоцити, изолирани от пациент с венозна тромбоза ДВТ 33А пациент носител на 4G/5G полиморфизъм в гена на PAI-1, 33В е носител носител на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) и полиморфизми за факторV и PIA2, Тромбоцитите са белязани с анти-човешки CD41, FITC HP8; Анти-човешки CD61 (Интегрин бета 3) APC (V); Анти-човешки CD62P PE (K-4), и се измерва активирането им

При пациенти с ДВТ носители само на 4G/4G полиморфизъм в гена на PAI-1 броя на тромбоцитите е по-висок, но с по-ниска степен на активирани позитивни по CD41 и CD61. Q2. (Фиг. 20А) 27,4%, в сравнение с пациенти с комбинирани мутации освен 4G/5G полиморфизъм в гена на PAI-1 и наличие на полиморфизми за фактор V и PIA2, броя на тромбоцитите е по-нисък за сметка на високата степен на активирани 55.7% на позитивни по CD41 и CD61 Q2. (Фиг. 20 В)

Разлика се открива и при процента на гранулираност на тромбоцитите P1, при пациенти с ДВТ носители на комбинирани мутации (4G/5G, факторV и PIA1/A2) той е по-висок 38.7% (Фиг. 21 В) в сравнение с пациенти с ДВТ носители само на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) 4.9% (Фиг. 21 А).

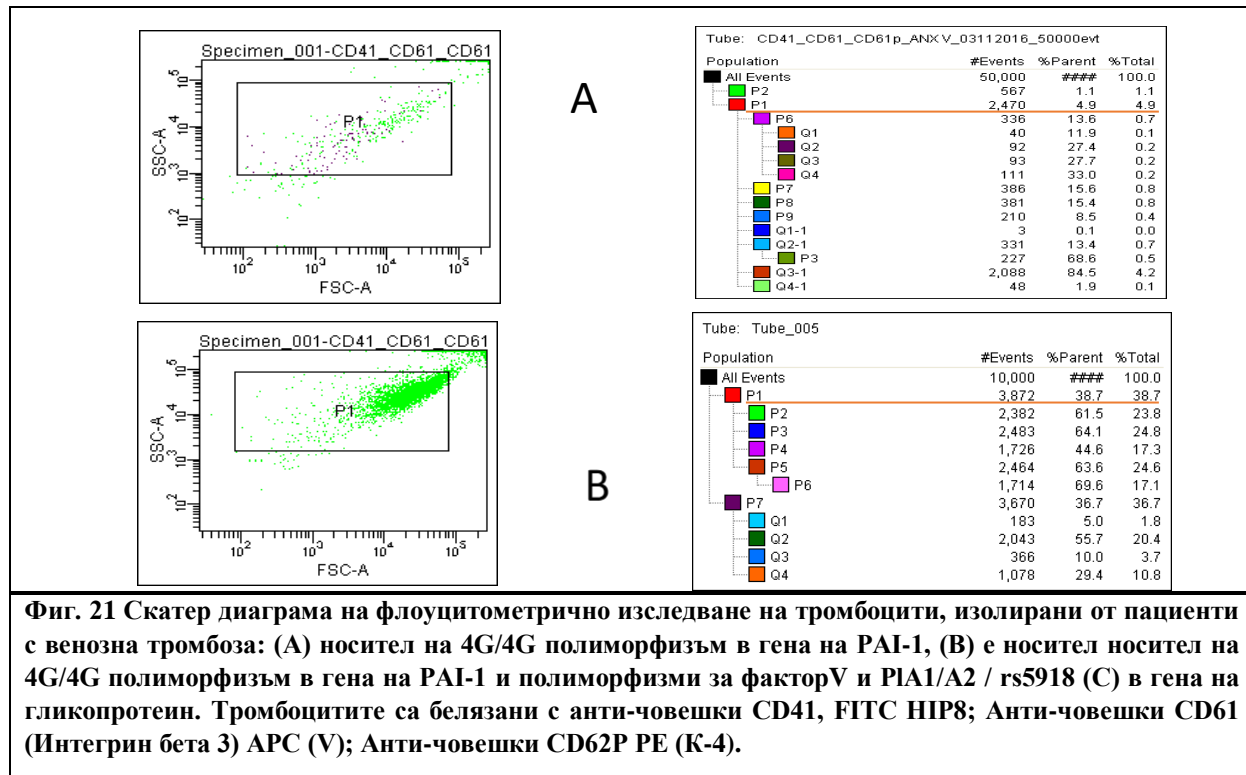


Таблица 13. Средни стойности на % CD41/CD62/CD62p, MFI CD41/CD62/CD62p, % ANX V при пациенти с ДВТ, артериална тромбоза, жени с чести загуби на плода, носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) и контроли

Средни стойности	Средни стойности на % CD41/CD62/CD62p	Fisher test (p)	Средни стойности на MFI CD41/CD62/CD62p	Fisher test (p)	Средни стойност и на % ANX V	Fisher test (p)
Пациенти с ДВТ носители на полиморфизъм rs1799889	47,6	0.0105	894	0.0184	23,86	0.0358
Пациенти с МИ носители на полиморфизъм rs1799889	70,7	0.0092	954,5	0.0085	21.5	0.0335
Жени с чести ЗП носители на полиморфизъм rs1799889	28	0.0907	605	0.0420	1,05	0.0321
Контроли	6,8	0.0893	220,33	0.0630	1.93	0.0148

От данните в Табл. 13 се вижда, че при пациенти с ДВТ носители на полиморфизъм 4G/5G

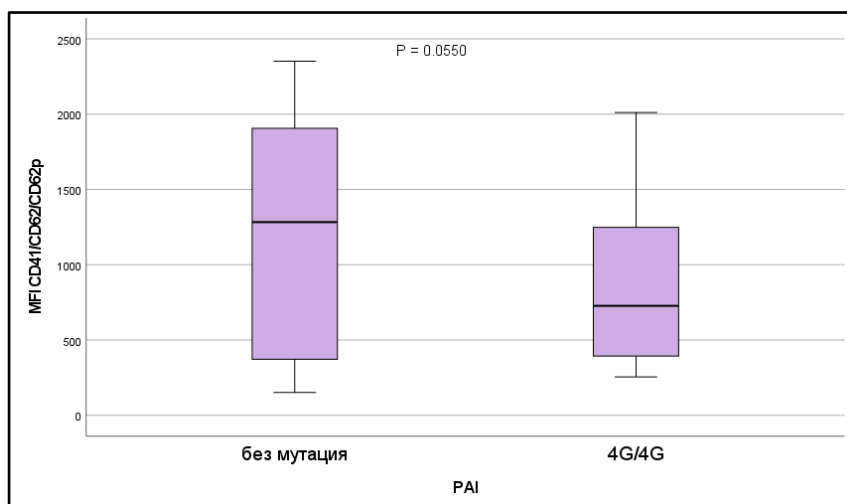
в гена на PAI-1 (rs1799889) степента на активиране на тромбоцитите, изразена чрез средната интензивност на флуоресценцията (MFI) на съотношението CD41/CD62/CD62p, е 894, по-ниска от тази при пациенти с артериална тромбоза 945,5, но е около 4 пъти по-висока от тази на контролите 220,33. Може да направим извод, че носителството на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) при пациенти с ДВТ е причина за повишената тромбоцитна активност.

Данните за здрави носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) и донори на цялостна кръв съвпадат, затова те са обобщени в резултатите.

Същото съвпадение има и при здрави донори не носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) и здрави контроли не носители.

При изследване на разпределението на активността на тромбоцитите на **пациенти с ДВТ, носители спрямо неносители** на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), се установиха по-ниски стойности на средната интензивност на флуоресценцията (MFI) CD41/CD61/CD62p при носителите на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), в сравнение с тази на носителите на мутацията. (Фиг.22)

Установена зависимост между степента на активирането и носителството при пациенти с ДВТ: Pearson Correlation $r^2 = -0.508^*$, $p = 0.0550$. Корелацията с анексина, т.е. с образуването на микрочастици е много слаба, ($r^2 = 0.467$, $p = 0.175$).



Фиг. 22 Активността на тромбоцитите, представена като средна интензивност на флуоресценцията (MFI) CD41/CD61/CD62p изолирани от пациенти с ДВТ носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), и пациенти без мутация

14. Носителството на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) при здрави контроли, дарители, пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода

Резултатите от ДНК-анализ за носителство на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) изследвани при 172 пациенти и 146 контроли, и 50 дарители на цяла кръв в Таблица 14. Установява се, че при хомозиготно носителство на полиморфизъм 4G в гена на PAI-1 увеличава риска за клинична изява на тромбоза.

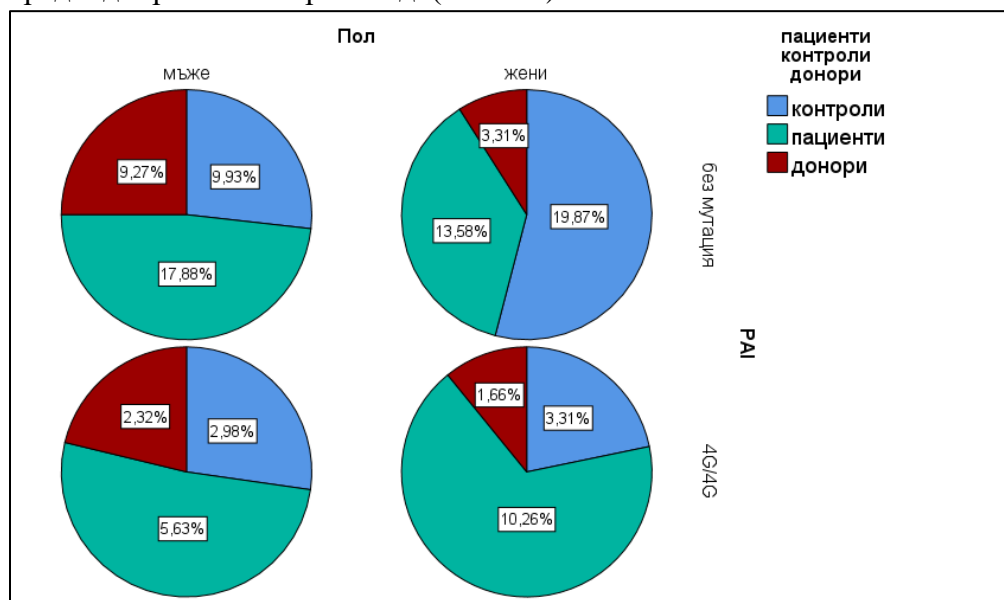
Честота на носителството на полиморфизъм 4G в гена на PAI-1 при контролите бе намерена общо 19,86%, разпределени по пол 22,36% при жените и 17,14% при мъжете. Намерена бе възрастова разлика на носителството при контроли, с тенденция с увеличение на възрастта намаляване на носителството. Предполага се по-ранната смърт на носителите. Честотата на носителство на 4G алела на гена на PAI-1, бе намерена сигнификантно по-висока при пациентите, спрямо контролите (27,32% срещу 19.86%), ($\chi^2 = 8.530$; OR=2.210, $p = 0.004$) Таблица 15.

При дарители се наблюдава сигнификантно по-висока честота на носителството спрямо контролите (24.00% срещу 19.86%), ($\chi^2 = 13.706$; OR=3.276, $p = 0.003$), но това може би се дължи на родствените връзки при често кръводаряващите дарителите от ромски произход и сравнително малка извадка.

Таблица 14 . Генни честоти на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) при контроли, дарители и ДВТ пациенти.

Генни честоти (%)	rs1799889(-)		
	(4G/4G)	(4G/5G)	(5G/5G)
Контроли жени	17 (22.36%)	40 (52.63%)	19 (25.00%)
Контроли мъже	12 (17,14%)	37 (52.85%)	21 (30,0%)
Общо контроли	29 (19,86%)	77 (52,73%)	40 (27,39%)
Дарители мъже	7 (20,0%)	15 (42,85%)	13 (37,14%)
Дарители жени	5 (33.33%)	6 (40.00%)	4 (26.67%)
Общо дарители	12 (24.0%)	21 (42.00%)	17 (34.0%)
Жени с ДВТ	30 (34,88%)	41 (47.67%)	15 (17,44%)
Мъже с ДВТ	17 (20,60%)	54 (64.28%)	13 (15,11%)
Общо ДВТ	47 (27,32%)	95 (55.23%)	28 (16,27%)

При пациентите ДВТ от женски пол – процента на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) е най-висок 10,26%, двойно по-нисък е процента при мъжете с ДВТ 5,63%. Докато при дарителите мъже процента е по-висок 2,32% в сравнение с жените дарители 1,66%, което може да се обясни с по-честите дарявания от мъже, а и често кръводаряващите са в родствени отношения, като не на последно място трябва да се има в предвид и ромският произход. (Фиг. 23)



Фиг. 23 Разпределение по пол на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) в отделните групи пациенти с ДВТ контроли и донори на цялостна кръв

Таблица 15. Средни стойности на носителство на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), Pearson Chi-Squared, точен тест на Фишер, относителен риск и 95% конфиденциален интервал CI при пациенти от мъжки и женски пол в сравнение с контролите и за различни възрастови групи и жени с ранни загуби на плода

Статистически стойности	Носителство при пациенти %	Носителство при контроли %	Pearson χ^2	Fisher test (p)	OR	95% CI	p
Жени	34.88	22.36	12.079	0.0025	3.265	1.031 - 3.882	0.001
Мъже	20.60	17.14	0.222	0.987	1.392	0.479-1.635	0.638
Общо пациенти	27.32	19.86	8.530	0.0208	2.210	0.852 - 2.994	0.004

Общо дарители	24.00	19.86	13.706	0.1039	3.276	2.404-0.420	0.003
Мъже <45г.	20.64	25.0	0.122	0.0727	0.833	0.299-2.319	0.466
Жени <45г.	28.57	19.7	0.230	0.631	1.244	0.509-3.039	0.398
Мъже >45г.	20.89	15.8	1.115 ^c	0.291	2.023	0.537-7.628	0.227
Жени >45г.	37.31	12.4	12.875	0.001	6.243	2.228-21.04	0.001
Общо пациенти <45г.	23.68	21.9	0.021	0.886	1.050	0.536-2.057	0.343
Общо пациенти >45г.	29.10	14.8	11.557	0.001	4.063	1.732-9.533	0.001
Жени с ранни загуби на плода	26.56	19.7	0.245	0.2929	1.7838	0.6511 - 4.889	0.260

При разделяне по пол, сигнификантно по-висока честотата на носителство на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) бе намерена и при пациентите от женски пол, в сравнение с контроли (34.88% срещу 22.36%, $\chi^2 = 12.079$, OR = 3.265, p = 0.001), докато при пациенти от мъжки пол, носителството на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) е с по-малка и несигнификантна разлика спрямо контролната група мъже (20.60 % срещу 17.14% $\chi^2=0.222$, OR = 1.392, p= 0.638) . (Таблица 15).

Прави впечатление значително по-високото полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) при пациенти над 45 години. Сигнификантно по-висока честота на носителство на rs1799889(-) полиморфизъм бе установена в обща група по-възрастни пациенти (над 45 години) (29.10% при пациенти срещу 14.8% при контроли; $\chi^2 = 11.557$, OR = 4.063, p = 0.001).

При жените с ранни загуби на плода честотата на носителството на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) бе намерена 26,56% срещу 19,7% при контролите ($\chi^2 = 0.245$, OR = 1.7838, p = 0.260) Таблица 15

15. Обсъждане на значението на носителство на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) за промени в наномеханичните свойства и активирането на тромбоцитите.

Разграничени са различни стадии на процеса на агрегация, които са съпроводени с формирането на характерни филоподии и ламелоподии, преразпределяне на хиалоплазмата, промяна в грапавостта и твърдостта на мембраната при носители и неносители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889). Стойностите на височината, площта и грапавостта (Ra) на мембраната на тромбоцитите при ДВТ пациенти са значително по-ниски от съответните определени за здрави индивиди, което може да бъде индикация за разлика в състоянието на активиране. Носителството на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) допринася за по-голяма промяна в еластичността на мембраните на тромбоцитите при здрави индивиди, носители на полиморфизма. Стойностите на модула на Young за здрави контроли са по-високи при носителите на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889). Активността на тромбоцитите на пациенти с ДВТ носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), определена флоуцитометрично като MFI, бе по-ниска в сравнение с тези на пациенти, неносители на полиморфизма (Фиг 22). Корелацията с анексина, т.е. с образуването на микрочастици бе също много слаба при носителите на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889). Наблюдава се висок процент на активираните тромбоцити на пациенти носителите на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), а също така и при пациенти с комбинирани тромбофилични полиморфизми.

С цел определяне значението на носителство на полиморфизмът за протромботичният риск и рискът от ранни загуби на плода чрез флоуцитометричен и АСМ анализ определихме протромботичният статус. Тези изследвания показаха различията при носителки на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa и полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) в топографски и флоуцитометрични характеристики въпреки че, общата тенденция при всички беше протромботична с висок MFI, промяна в грапавостта на тромбоцитите, в броя, форма и обема на микрочастиците.

Независимо от различията в данните, по отношение приноса на отделните маркери за тромбофилия почти единно е становището че носителството на тромботични дефекти повишава риска за репродуктивни неудачи.

Изследването на връзката между генетичните фактори, ултраструктурата и механиката на тромбоцитите чрез топографско изследване на тромбоцитите посредством АСМ и флоуцитометрия при бременни и жени с ранни загуби на плода, позволява да се съпоставят промените в морфологията и активирането на тромбоцита с особеностите на протичането на нормална и усложнена бременност при носители на протромботични полиморфизми. Флоуцитометричните и АСМ данни разкриват потенциала на тези методи за изследване на структурни, физико-химични свойства и физиологичните на тромбоцитите при различни патологии.

Изследването на връзката между генетичните фактори, в частност полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), ултраструктурата и механиката на тромбоцитите чрез морфологично и физико-химично характеризиране на тромбоцитите посредством атомно силова микроскопия с висока разделителна способност при пациенти с активно тромбообразуване, каквито са пациенти с ДВТ дава уникална възможност да се съпоставят промени в морфологията и активирането на тромбоцита с особеностите на развитието на тромба при носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889).

Носителството на 4G алела (rs1799889 (-)) е свързано с по-високо ниво на PAI-1 в кръвта и възможни хипофибринолитични състояния. Също така PAI-1 влияе върху процесите на пролиферация на гладкомускулните клетки и ремоделирането на извънклетъчния матрикс в посока повишаване на риска от тромбоза.

В нашето проучване намерихме достоверна връзка между носителството на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) и развитието на ВТЕ в общата група пациенти, въпреки че предварителните ни изследванията не дадоха сигнификантен резултат. Пациентите бяха анализирани в подгрупи разделени по пол и по възраст.

Значително по-висока честота на носителство на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) установихме в група пациенти от женски пол с ДВТ в сравнение с контролите носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) (Таблица 15). Не бе намерена подобна връзка в групата мъже, носителството на полиморфизъм бе близко в групите на ДВТ пациенти и контроли мъже.

При анализа на разпределението по възраст при жените и мъжете в групи под и над 45-годишни, намерихме значителна разлика в честотата на носителство на полиморфизъм само при по-възрастните пациенти от женски пол. Докато подобна разлика не се наблюдава при

мъжете.

Приносът на възрастта като фактор в нашето проучване е свързан с пола и се проявява по различен начин при пациенти от мъжки и женски пол.

Възрастовата зависимост на проява на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) особено при жените, ни кара да предположим за евентуална връзка с нивата на естрогени.

Основната хипотеза може да бъде, че нивата на PAI-1 в кръвта при жените са свързани с нивата на естрогени, което допринася за елиминиране на ефекта на висока концентрация на PAI-1 в кръвта при млади жени, което предполага, че нивото на PAI-1 се регулира по много по-сложен начин при жените.

Според нашите данни бихме могли да подкрепим идеята на Tsantes [4], че присъствието на 4G алела може значително да увеличи риска от тромбоза при пациенти с наследствени или придобити тромбофилични фактори и в по-малка степен при пациенти без такива.

Беше предложена хипотеза, че този полиморфизъм може да допринесе за по-висок риск от развитие на ВТЕ при пациенти с други протромботични рискови фактори.

16. Значение на носителството на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) жени с ранни загуби на плода

Нашите изследвания показаха че носителството на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) допринася за загубите на плода през втория и третия лунарен месец.

Има данни, че и PAI-1 контролира в определена степен протеолизата и ремоделирането на майчина тъкан по време на трофобластна инвазия. Това има важно значение за успешната инвазия на бластоциста на подходяща дълбочина на матката, имплантирането, закрепването за плода и адаптацията на утероплацентарния комплекс. Увеличената концентрацията на PAI-1 може да дестабилизира ситуацията и да допринесе за проблемна имплантация и адаптацията на плода, което може да изиграе роля при много ранни загуби на плода. Предполага се, че при повишени нива на PAI-1, вследствие носителството на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) се увреждат кръвоносните съдове на плацентата.

При промяната в активността (концентрацията) само на един от участниците, както в случая PAI-1 (носителство на 4G/4G генотипа) нарушава баланса, което води до дисфункция на хемостаза и патология.

Регулирането на нивата на PAI-1 е възможен адаптивен механизъм по време на бременност и раждане.

17. Изводи от за промените в тромбоцитите при здрави контроли, дарители пациенти с ДВТ и жени с ранни загуби на плода носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889).

1. Стойностите на височината, площта и грапавостта (Ra) на мембраната на тромбоцитите при пациенти с тромбоза носители полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) са значително по-ниски от съответните определени за здрави индивиди, което може да бъде индикация за разлика в състоянието на активиране.
2. Стойностите на модула на Young за здрави контроли са по-високи при носителите на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889).
3. Активността на тромбоцитите на пациенти с ДВТ носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), определена флуцитометрично като средна интензивност на флуоресценцията - MFI бе по-ниска в сравнение с тези на пациенти, неносители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889). Обаче процента на активираните тромбоцити на пациенти носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), е сравнително по-висок в сравнение с контролите, а също така и при пациенти с комбинирани тромбофилични полиморфизми.
4. Сигнификантно по-висок риск е установен за пациенти носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) в общата група от пациенти с ДВТ и пациенти от женски пол в сравнение с контроли.
5. Значителен принос на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) за по-ранни ДВТ инциденти е установен при жените и особено при тези над 45 години .

18. Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати върху реципиенти със съдово заболяване без данни за носителството, добити от донори носители на полиморфизмите полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa и полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889)

Тромбоцитните концентрати може да се прилагат с профилактична цел или с терапевтична цел. С профилактична цел за предотвратяване на тежки и животозаплашващи спонтанни кръвоизливи или поради необходимост от извършване на инвазивни процедури или

оперативни интервенции при подходящи пациенти. Докато с терапевтична цел, когато вече има животозаплашващи кръвоизливи.

Стандартната лечебна доза на тромбоцитните концентрати е една единица средно 60-80 ml на 10 kg телесна маса (Материали и Методи).

18.1. Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати, върху реципиенти без данни за носителството, добити от донори носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa.

18.1.1 Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати, върху реципиенти със съдово заболяване без данни за носителството, добити от донори носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa.

При проследени 16 пациенти от съдова хирургия хоспитализирани по повод дълбока венозна тромбоза за периода 2008-2018 без данни за носителството и преливани с тромбоцитни концентрати между които има и такъв добит от донори с носителство на rs5918(C), се установи че само един от тях в следващият период от 6 месеца след преливането е направил съдов инцидент изразяващ се в исхемичен инсулт.

Трансфузирани са 27 пациенти с тромбоцитни концентрати добити от донори неносители на полиморфизъм rs5918(C) в гена на ITGB3, установихме че в следващият период от 6 месеца след преливането не се проявява съдов инцидент.

Изчисления Fisher's exact test ($p = 0.3721$) не показва статистическа значимост.

18.1.2. Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати, върху реципиенти без носителство със хематологично заболяване, добити от донори носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa.

При проследени 41 политрансфузирани пациенти от хематологично отделение хоспитализирани по повод различни хематологични заболявания (хронична миелоидна левкемия, нетромбоцитопенична пурпура, апластични анемии) в период от 2008-2018 и преливани с тромбоцитни концентрати между които има и такъв добит от донори с

носителство на rs5918(C) се установи че само 2 от тях в следващият период от 6 месеца след преливането са направили съдови инциденти исхемичен инсулт и ДВТ на пополитея. При трансфузираните 30 пациенти с тромбоцитни концентрати добити от донори неносители на полиморфизъм rs5918(C) в гена на ITGB3, установихме че в следващият период от 6 месеца след преливането не се проявява съдов инцидент.

Изчисления Fisher's exact test ($p = 0.5091$) не показва статистическа значимост.

18.1.3. Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати, върху реципиенти без носителство претърпели хирургична интервенция, добити от донори носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GPIIb/IIIa.

При проследени 38 пациенти от отделение по обща хирургия хоспитализирани по повод на различни заболявания изискващи хирургична интервенция за периода от 2008-2018, преливани с тромбоцитни концентрати между които има и такъв добит от донори с носителство на rs5918 (C) се установи че в следващият период от 6 месеца след преливането никой от тези пациенти няма проява на тромботично усложнение след трансфузия.

При трансфузираните 15 пациенти с тромбоцитни концентрати добити от донори неносители на полиморфизъм rs5918(C) в гена на ITGB3, установихме че в следващият период от 6 месеца след преливането не се проявява съдов инцидент.

Изчисления Fisher's exact test ($p = 1.0000$) не показва статистическа значимост.

18.2. Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати, върху реципиенти без данни за носителството, добити от донори носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889)

18.2.1. Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати, върху реципиенти със съдово заболяване без данни за носителството, добити от донори носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889)

При проследени 27 пациенти от съдова хирургия хоспитализирани по повод на тромбоза за периода от 2008-2018 без данни за носителството и преливани с тромбоцитни концентрати между които има и такъв добит от донори с носителство на полиморфизъм

4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) се установи, че в следващият период от 6 месеца след преливането не се наблюдавал нов съдов инцидент или тромбофилично усложнение.

При трансфузирани 18 пациенти с тромбоцитни концентрати добити от донори носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), установихме че в следващият период от 6 месеца след преливането не се проявява съдов инцидент.

Изчисления Fisher's exact test ($p = 1.0000$) не показва статистическа значимост.

18.2.2. Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати, върху реципиенти без носителство със хематологично заболяване, добити от донори носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889).

При проследени 29 политрансфузирани пациенти от хематологично отделение хоспитализирани по повод различни хематологични заболявания (хронична миелоидна левкемия, нетромбоцитопенична пурпура, апластични анемии) през период от 2008-2018 и преливани с тромбоцитни концентрати между които има и такъв добит от донори с носителство на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) не се установява тромбофилично усложнение което да бъде свързано с трансфузията .

При трансфузирани 15 пациенти с тромбоцитни концентрати добити от донори носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), установихме че в следващият период от 6 месеца след преливането не се проявява съдов инцидент.

Изчисления Fisher's exact test ($p = 1.0000$) не показва статистическа значимост.

18.2.3. Влияние на трансфузията на тромбоцитни концентрати, върху реципиенти без носителство претърпели хирургична интервенция, добити от донори носители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889)

При проследени 14 пациенти от отделение по обща хирургия хоспитализирани по повод на различни заболявания изискващи хирургична интервенция за периода 2008-2018 и преливани с тромбоцитни концентрати между които има и такъв добит от донори с носителство на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) се установи че в следващият период от 6 месеца след преливането никой от тези пациенти няма проява на тромбофилично усложнение след трансфузия.

При трансфузирани 10 пациенти с тромбоцитни концентрати добити от донори неносители на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), установихме че в следващият период от 6 месеца след преливането не се проявява съдов инцидент. Изчисления Fisher's exact test ($p = 1.0000$) не показва статистическа значимост.

Изводи за влиянието на трансфузията на тромбоцитни концентрати върху реципиенти

При проследени 95 политрансфузирани пациенти хоспитализирани по повод хематологични заболявания или дълбока венозна тромбоза за периода 2008-2018 без данни за носителството и преливани с тромбоцитни концентрати между които има и такъв добит от донори с носителство на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), се установи че само 3 от тях (3.2%) в следващият период от 6 месеца след преливането са направили съдов инцидент изразяващ се в исхемичен инсулт (2) и ДВТ (1) на пополитея.

При 70 трансфузирани пациенти по повод хематологични заболявания, дълбока венозна тромбоза или оперативни интервенции не се наблюдава активиране на тромбоцитите на реципиентите от активирани такива на донора, който е носител на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), които да доведат в следствие до тромбофилични усложнения на реципиента.

Прилагането най-малко на пет тромбоцитни препарата при една трансфузия е причината да не се наблюдава значително активиране на тромбоцитите на реципиентите от активирани такива на донора, с носителство на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889).

V. Изводи

Изследването на връзката между носителство на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa и полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), и топографски параметри, наномеханиката и активирането на тромбоцитите посредством АСМ и с флоуцитометрия при здрави контроли, дарители и пациенти с по-висок протромботичен статус, характерен за пациенти с инциденти на тромбоза и жени с усложнена бременност даде ни основание да направим следните изводи:

Установихме, че:

1. Топографските характеристики на тромбоцитите, височина, площ и грапавост

зависят от носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa при здрави лица, дарители както и при пациенти тромботични инциденти и при жени с ранни загуби на плода.

2. Степента на тромбоцитната еластичност (модула на Young), зависи от носителството полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa и е по висока при носителите както при здрави лица, така и при пациенти с тромботични инциденти и при жени с ранни загуби на плода.

3. Степента на активирането на тромбоцитите изчислена като средна интензивност на флуоресценцията MFI CD41/CD61/CD62p е по-висока при носители на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa както при здрави лица, така и при пациенти с тромботични инциденти и при жени с ранни загуби на плода.

4. Носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa допринася за по-висок риск от единични и рекурентни инциденти на венозна тромбоза, както и за по-ранна проява при млади жени.

5. Носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa допринася за по-висок риск от единични инциденти за ранна загуба на плода.

6. Топографските характеристики на тромбоцитите: височина, площ, грапавост и еластичността зависят от носителството на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 при здрави лица, дарители както и при пациенти с тромботични инциденти така и единични инциденти за ранна загуба на плода.

7. Активността на тромбоцитите на пациенти пациенти с тромботични инциденти и репродуктивни неуспехи, определена флоуцитометрично като средна интензивност на флуоресценцията MFI CD41/CD61/CD62p бе по-ниска при носители на rs1799889(-) полиморфизъм, но по-висока спрямо контролите. Корелацията с анексина, т.е. с образуването на микрочастици показва повишено образуване на микрочастици при пациенти с ДВТ носителите на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889), и ниска степен на образуване на микрочастици при жени с ранни загуби на плода носителите на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889).

8. Носителството на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) допринася за по-висок риск от единични инциденти на венозна тромбоза в обща група пациенти и при по-възрастните пациенти от женски пол.

9. Носителството на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) допринася за по-висок риск от единични и инциденти за ранна загуба на плода (втория месец) при млади жени.

10. Носителския статус на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa допринася за увеличаване на популацията на микрочастиците (броя, големина, форма, обем) при жени с нормална бременност и такива със загуба на плода.

11. Установихме че присъствието на тромбоцити с носителството на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa увеличава но не-сигнификантно активността на тромбоцити в тромбоцитни концентрати, без да променя основните характеристики на концентрата (данните не са представени).

12. При трансфузия на тромбоцитни концентрати получени от цяла кръв на дарители с носителство на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa по повод хематологични заболявания, дълбока венозна тромбоза и оперативна интервенция без данни за носителството при реципиенти, установихме нисък риск (3.2 % $p=0.5091$) за развитие на тромботични усложнения при реципиенти.

13. При трансфузия на тромбоцитни концентрати получени от цяла кръв на дарители с носителство на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) по повод хематологични заболявания, дълбока венозна тромбоза и оперативна интервенция без данни за носителството при реципиенти, не открихме риск за развитие на тромботични усложнения при реципиенти.

Тези наблюдения биха могли да имат принос върху разбирането на връзката между тромбофиличните фактори и механизми на патологичните процеси.

VI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Носителския статус на полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa и полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) води до наномеханични и морфологични промени в тромбоцитите: намалява височината и грапавостта и увеличава активността на тромбоцитите, характерни за по-напреднала степен на активирането им.
2. Носителския статус за полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa и полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) променя еластичността на тромбоцитните мембрани като увеличава ригидността им (Модула на Young) при здрави индивиди и при пациентите с тромботични инциденти.
3. Носителския статус за полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa води до по-високи стойности на MFI CD41/CD61/CD62p, характерни за по-висока степен на активирането на тромбоцита както при контроли така и при пациенти.
4. Носителския статус за полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa и полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) сигнификантно допринася за репродуктивни проблеми през втория и третия лунарни месеци.
5. Носителския статус за полиморфизъм A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa и полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889) допринася за увеличаване на популацията на микрочастиците (броя, големина, форма, обем) при жени с нормална бременност и такива със загуба на плода.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изразявам огромната си благодарност към научните ми ръководители:

проф. Регина Комса – Пенкова д.б.н и **доц. Светла Тодинова д.б.**, които в истинския смисъл на думата, бяха мой учители и ми оказаха неоценима помощ в работата над моя дисертационен труд.

Проф. Регина Комса – Пенкова ме въведе в интересната научна тематика и на всеки етап от съвместната ни работа ме напътстваше, подкрепяше и мотивираше. Благодаря ѝ, че не ми позволи да се откажа когато беше трудно, а винаги намираше точният начин да ме стимулира и подкрепя за да излявя най-доброто на което съм способна.

Благодаря на **доц. Д-р Пенчо Тончев д.м.**, който е един нестихващ генератор на идеи, за отделеното време, помощта, конструктивните дискусии и приятелството.

Благодарност изказвам на **Даниела Георгиева** за оказаната помощ и подкрепа винаги в точният момент, както и за искренното ни приятелство.

Благодарност изказвам на **ас.Георги Големанов** за извършеният от него ДНК анализ, на екипа на **Институт по биофизика и биомедицинско инженерство към БАН** за направените АСМ и на екипа на **Институтът по микробиология “Стефан Ангелов” към БАН** и най-вече на **Николина Михайлова** за осъществените флуоцитометрични анализи. С благодарност към всички колегите от **Катедра „Химия и Биохимия“ и РЦТХ - Плевен** за сътрудничеството и добрите отношения.

Благодаря на моите родители и на моите деца, за безкрайната любов и опора.

Благодаря сърдечно на всички, които в една или друга степен ме подкрепяха и помогнаха!

Списък на публикации приложени към дисертационен труд

I. Публикации в български списания

1. Ivanov P, Gecheva S, Tsvyatkovska T, Georgieva G, Komsa-Penkova R, Konova E, Simeonova M, Tanchev S. Inherited thrombophilic factors in women with secondary infertility. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2012; 51(4):3-7. (SJR 0.104) -Q4
2. Komsa-Penkova R, Andreeva T, Krumova S, Taneva S, Golemanov G, Georgieva G, Tonchev P, Mihaylova N, Tchobanov A, Todinova S. Alterations in platelet activity and elasticity modulus of healthy subjects, carriers of G20210A polymorphism in the prothrombin gene. *JOURNAL OF BIOMEDICAL AND CLINICAL RESEARCH (JBCR)*, Vol. 9 number 1, 2016.
3. Georgieva G, Mihaylova N, Tonchev P, Todinova S, Komsa-Penkova R Increased platelet-derived microparticles in patients with thrombosis, carriers of PIA2 Polymorphism in Glycoprotein IIb/IIIa *Journal of Biomedical and Clinical Research*. За печат в ИМАБ

II. Публикации в чуждестранни списания

1. Todinova S, Komsa-Penkova R, Krumova S, Taneva S, Golemanov G, Georgieva G, Tonchev P, Tsankov B, Beshev L, Balashev K, Andreeva TD. PIA2 Polymorphism in Glycoprotein IIb/IIIa Modulates the Morphology and Nanomechanics of Platelets. *Clinical and Applied Thrombosis-Hemostasis*, 23(8), 951-960. ISSN 1076-0296, eISSN 1938-2723 Scopus, Web of Science, 2017 (IF 2.096).

III. Участия в научни форуми с темата на дисертацията

1. Todinova S., Andreeva T., Langari A., Komsa-Penkova R., Krumova S., Golemanov G., Georgieva G., Taneva S.G., Morphological and nanomechanical properties of platelets derived from women with early pregnancy loss. Eighth international conference on radiation in various fields of research, Virtual conference Herceg Novi, Montenegro - July 20-24, 2020.

