

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН**  
**КАТЕДРА “КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ, КЛИНИЧНА**  
**ИМУНОЛОГИЯ И АЛЕРГОЛОГИЯ ”**

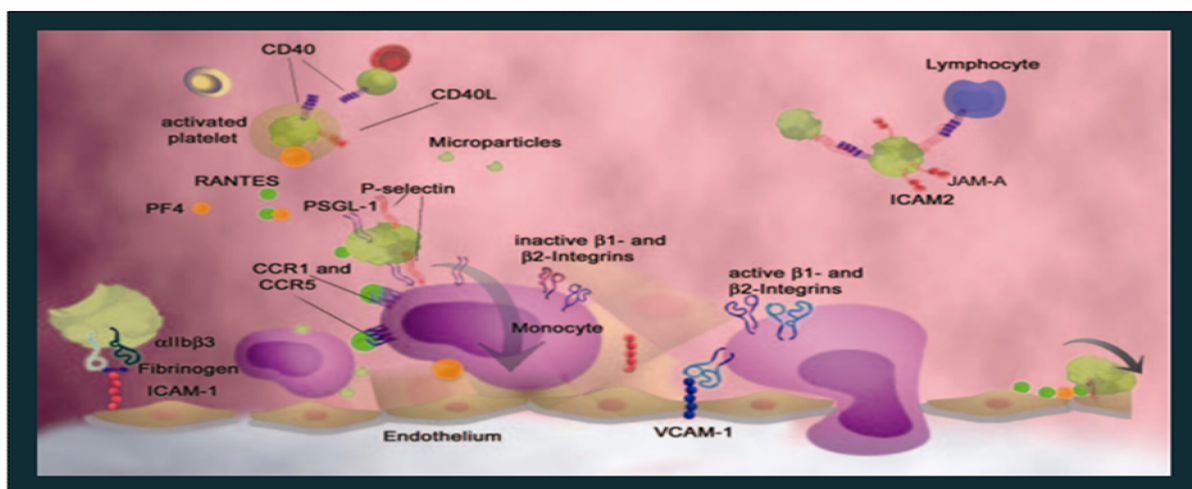
---

д-р ГАЛИНА ЛЮБОМИРОВА ВЕЛЕВА

**ФЛОУЦИТОМЕТРИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА**  
**ТРОМБОЦИТНО-ЛЕВКОЦИТНИ АГРЕГАТИ**  
**ПРИ ЖЕНИ С РЕПРОДУКТИВНИ НЕУСПЕХИ,**  
**АСОЦИИРАНИ С ТРОМБОФИЯ**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

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



**ПЛЕВЕН**  
**2011 ГОДИНА**

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН**  
**КАТЕДРА “КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ, КЛИНИЧНА**  
**ИМУНОЛОГИЯ И АЛЕРГОЛОГИЯ ”**

---

д-р Галина Любомирова Велева

**ФЛОУЦИТОМЕТРИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА**  
**ТРОМБОЦИТНО-ЛЕВКОЦИТНИ АГРЕГАТИ ПРИ**  
**ЖЕНИ С РЕПРОДУКТИВНИ НЕУСПЕХИ**  
**АСОЦИИРАНИ С ТРОМБОФИЛИЯ**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

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

Научна специалност: Имунология - 01.06.23

Научен ръководител:  
Доц. д-р Емилияна Илиева Конова, д.м.

Официални рецензенти:  
Проф. д-р Виктория Сарафян, д.м.н.  
Проф. д-р Иван Кехайов, д.б.н.

Плевен  
2011

Дисертационният труд е написан на 125 стандартни машинописни страници. Съдържа 9 таблици и 14 фигури. Библиографската справка включва 303 литературни източника – 1 на кирилица и 302 на латиница.

Включените в дисертацията изследвания са извършени в:

МДЛ по Имунология и МДЛ по Медицинска Генетика на УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ – гр. Плевен

Имунологична лаборатория на Медицински център „Клиничен институт за репродуктивна медицина” - Плевен.

Работата по дисертационния труд е финансирана частично от МОН съгласно наредба №9/08.08.2003 г. (Научно-изследователски проекти 15/2007 и 3/2008).

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен научен съвет на катедра “Клинична лаборатория, клинична имунология и алергология ” при МУ – Плевен.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 21.12.2011 г. в Медицински Университет – Плевен.

Материалите по защитата на дисертационния труд са публикувани на страницата на Медицински Университет – Плевен.

## СЪДЪРЖАНИЕ

### ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ВЪВЕДЕНИЕ .....	1
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....	3
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....	4
1. Кръв, реактиви, апаратура.....	4
2. Пациенти и здрави контроли.....	5
3. Методи .....	8
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ .....	10
1. Флоуцитометрично определяне на нива на PLA при контролната група от здрави жени.....	10
2. Флоуцитометрично определяне на нива на PLA при групата от здрави бременни жени .....	13
3. Флоуцитометрично определяне на PLA при групата жени с анамнестични данни за репродуктивни неуспехи, небременни към момента на изследването .....	17
4. Флоуцитометрично определяне на PLA при групата бременни жени с анамнестични данни за инфертилитет, без назначена антиагрегантна и/или антикоагулантна терапия към момента на изследване .....	26
5. Флоуцитометрично определяне на нива на PLA при групата бременни жени с анамнестични данни за инфертилитет, които към момента на изследване провеждат антиагрегантна и антикоагулантна терапия по схема .....	35
6. ОБОБЩЕНИЕ .....	42
7. ИЗВОДИ .....	44
8. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....	45
9. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ.....	47

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

- АКА - антикардиолипинови антитела  
АФА - антифосфолипидни антитела  
АФС - антифосфолипиден синдром  
МоАт - моноклонални антитела  
мРНК – матрична рибонуклеинова киселина  
ПЕ - прееклампсия  
 $\beta$ 2-GP I – бета2-гликопротеин едно - beta2-glycoprotein I  
CD - групова детерминанта - cluster determinant  
EDTA – етилендиаминтетраацетат - ethylenediaminetetraacetate  
ELISA - ензимно-свързан имуносорбентен анализ - enzyme-linked immunosorbent assay  
FITC - флуоресцеин изотиоцианат - fluorescein isothiocyanate  
FL - флуоресценция - fluorescence  
FSC - предно разсейване - forward scatter  
GP - гликопротеини - glycoproteins  
Ig - имуноглобулин/и - immunoglobulin/s  
LMWH – нискомолекулярен хепарин - low-molecular-weight heparin  
Mac-1 –  $\alpha$ -верига на  $\beta$ 1-интегрин  
PAF – фактор, активиращ тромбоцитите – platelet-activating factor  
PBS - фосфатен буфер - phosphate-buffered saline  
PE - фикоеритрин - phycoerythrin  
PLA – тромбоцитно-левкоцитни агрегати – platelet-leukocyte aggregates  
SSC - странично разсейване - side scatter  
TF – тъканен фактор - tissue factor

## ВЪВЕДЕНИЕ

Активираният тромбоцити и левкоцити реализират функциите си при голямо разнообразие от физиологични и патологични състояния. Тромбоцитите имат ключова роля в процесите на хемостаза и тромбоза, в процеса на възпаление и атеросклерозата. При физиологични условия те циркулират в латентно състояние. Тромбоцитната активация е свързана с промени във формата на клетката и експресионния модел на адхезионните молекули, както и с освобождаване на разтворими медиатори. Това определя адхезията на тромбоцитите към левкоцитите и към съдовата стена. Въпреки че тромбоцитно-левкоцитните агрегати (PLA) вероятно имат кратък интраваскуларен полуживот, по време на който, само малка фракция от формираните хетеротипни агрегати е уловима в системната циркулация, повишени нива на циркулиращи тромбоцитно-левкоцитни агрегати са наблюдавани при пациенти с възпалителни и инфекциозни заболявания, сепсис, захарен диабет, остър коронарен синдром, автоимунни, алергични, невродегенеративни, онкологични и миелопролиферативни нарушения. През последните години научният интерес към тромбоцитно-левкоцитните агрегати непрекъснато расте. Търсенията засягат както разкриване значението на агрегатите като чувствителен маркер за тромбоцитна активация, така и оценяване на възможността за използването им като диагностичен маркер и/или терапевтичен таргет при различни заболявания. Много автори са насочили вниманието си към усъвършенстване на протоколите за флуоцитометрично определяне нива на тромбоцитно-левкоцитни агрегати.

Знанията за асоциацията между тромбофиличните дефекти, вродени и/или придобити, и неблагоприятния изход на бременността нарастват бързо през последните години и ангажират интереса на специалисти от различни направления. Няколко са предизвикателствата пред изследователите към настоящия момент:

- Да се установят критерии, чрез които жените с тромбофилични дефекти, предразположени към неблагоприятен изход на бременността да бъдат разграничени от жените, чиято бременност ще бъде успешна, независимо от подлежащата тромбофилия. Липсва консенсус относно това кои са най-подходящите хемостатични показатели за характеризиране на риска

от възникване на фетални загуби или късни усложнения на бременността. Конвенционалните тестове за вродени и придобити коагулационни дефекти са скъпи, консумиращи време и не отчитат факта, че хемостазата *in vivo* е един динамичен процес, в който едновременно участват коагулационната, фибринолитичната система и клетъчните елементи. Така определянето на отделните тромбофилични дефекти е с ограничени възможности за оценка на тромбофиличния риск, особено по време на бременност.

- Да се установи значението на феталния генотип за протичането и изхода на бременността.

- Да се разработят критерии и стратегии за лечение на жените с тромбофилични дефекти не само по време на бременността и репродуктивния им период, но и след това, с оглед възможността тромбофилията да обуслови възникването на тромботично-исхемични заболявания на по-късен етап.

Натрупаните знания за асоциацията между тромбофиличните дефекти и неблагоприятния изход на бременността, както и данните, че в основата на нарушенията вероятно стои един абнормен хемостатичен и възпалителен отговор, ни провокираха да изследваме нивата на тромбоцитно-левкоцитните агрегати при жени с инфертилитет. За целта трябваше да разработим метод за *ex vivo* флоуцитометрично определяне на нива на тромбоцитно-левкоцитни агрегати от цяла кръв. Получените резултати ни дадоха основание да потърсим значението на този показател за планиране, прогнозиране на изхода и проследяване на бременността, както и да обосновем използването му за мониториране ефективността на антиромботичната терапия при жени с инфертилитет.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на проучването е да се оцени участието на PLA в патогенезата на репродуктивните неуспехи, асоциирани с тромбофилия и значението им за прогнозата и изхода на бременността.

За изпълнението на посочената цел бяха поставени следните конкретни задачи:

1. Модифициране и внедряване на флоуцитометричен метод за определяне на PLA.

2. Флоуцитометрично определяне в периферна кръв на PLA при жени с репродуктивни неуспехи - повтарящи се загуби на плода, загуби във втори и трети триместър.

3. Сравняване на нивата на PLA при жени с репродуктивни неуспехи спрямо същите показатели при контролни групи от здрави бременни и небременни жени:

а/ преди настъпване на бременност;

б/ по време на бременността.

4. Анализ на влиянието на носителството на вродени и/или придобити фактори за тромбофилия (генни мутации, асоциирани с тромбофилия и антифосфолипидни антитела) върху нивата на PLA преди и по време на бременност при жени с репродуктивни неуспехи.

5. Формиране на критерии за изграждане на диагностични и терапевтични стратегии преди и по време на бременността на база нивата на PLA.

6. Флоуцитометрично мониториране на антикоагулантна и антиагрегантна терапия по време на бременност при жени с предшестващи репродуктивни неуспехи на база нивата на PLA.



## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 1. МАТЕРИАЛИ

#### 1.1. Кръв, реактиви и апаратура

##### 1.1.1. Кръв за изследване

За определяне нива на PLA чрез директен имунофлуоресцентен метод беше използвана свежа, цяла, венозна кръв. С оглед минимално активиране на тромбоцитите, кръвта се взема без турникет или при невъзможност с много лек турникет, с игла 20G. Първите 2 ml кръв се отстраняват. Следващите 4,5 ml кръв се поставят във вакутейнер с 3,6 mg K<sub>2</sub>EDTA (Becton Dickinson) и се използват за флоуцитометрично определяне на нива на PLA.

За изследване на антикардиолипинови антитела (АКА), антитела срещу бета две гликопротеин едно ( $\beta$ 2-GP I) беше използван серум от пациентите.

За определяне носителство на вродени тромбофилични фактори чрез ДНК – анализ беше използвана венозна кръв, добита чрез асептична венепункция на антекубиталната вена и поставена във вакутейнер 10 mL с 0.084 mL 15% EDTA (Becton, Dickinson and Company).

##### 1.1.2. Използвани Реактиви

За определяне нива на PLA чрез директен имунофлуоресцентен метод бяха използвани следните моноклонални антитела, конюгирани с флуорохром, на фирмата Becton Dickinson, USA: CD41a FITC и CD11b PE.

Фиксиране на пробите беше извършено с фиксиращ разтвор - 1% параформалдехид в 0.01M фосфатен буфер (PBS) на фирма Becton Dickinson.

За изследване на антикардиолипинови антитела от клас IgG и клас IgM са използвани готови тестове на фирма Orgentec (Germany) – ORG 515, Anti-Cardiolipin клас IgG и клас IgM ELISA кит.

За изследване на антитела срещу  $\beta$ 2-GP I от клас IgG и IgM са използвани готови ELISA тестове на фирма Orgentec – ORG 521 Anti- $\beta$ 2-Glycoprotein I, клас IgG и клас IgM.

За определяне носителство на вродени тромбофилични фактори чрез ДНК – анализ бяха използвани реактиви на фирма Amersham Pharmacy Biotech/GE Healthcare.

### **1.1.3. Използвана апаратура**

За флоуцитометрично определяне на PLA беше използван флоуцитометър FACSort на фирма Becton Dickinson, USA, с аргонов лазер.

За изследване на антикардиолипинови антитела и антитела срещу  $\beta$ 2-GP I беше използван ELISA Reader "Ceres UV 900c" на фирма Bio-Tek.

Аmplификация на участъците от ДНК, подлежащи на изследване за мутации беше извършена на термосайклер (Techne version 11.04).

## **1.2. ПАЦИЕНТИ И ЗДРАВИ КОНТРОЛИ**

Проучването на 285 лица (контроли и пациенти) е проведено в МДЛ по Имунология на УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ – Плевен за периода 2007-2010 година. Изследваните пациенти са консултирани и наблюдавани в Център за репродуктивно здраве, Медицински университет – Плевен и Медицински център „Клиничен институт за репродуктивна медицина“ - Плевен.

При наличие на информирано съгласие кръв беше взета от следните клинични групи:

### **1.2.1. Група I. Здрави небременни жени**

Като контролна група бяха използвани (доброволно) 34 здрави, небременни, раждали жени на възраст от 21 до 39 години, без анамнестични данни за репродуктивни неуспехи и автоимунни заболявания. От 34 жени в тази група, 27 имаха по една успешно завършила бременност, а при останалите 7 броят на успешните бременности беше 2.

### **1.2.2. Група II. Здрави бременни жени**

25 жени на възраст от 21 до 41 година, без анамнестични данни за инфертилитет и автоимунни заболявания, бременни в 12 гестационна седмица на нормално протичаща бременност. За 24 от жените, настоящата бременност е втора поред, а за 1 от тях – трета. Предходните бременности са завършили без усложнения, на термин. Жените, включени в тази група, бяха проследени в хода на

бременността и кръв за определяне нива на PLA беше взета и по време на втори и трети триместър, съответно в 20 и 35 г. с.

**1.2.3. Група III.** 185 жени с анамнестични данни за инфертилитет, небременни към момента на изследването, на възраст от 23 до 38 години. В зависимост от гестационния срок, в който са настъпили загубите на плода пациентките се разпределят в подгрупи както следва:

- **Група IIIa:** 150 жени с анамнеза за повтарящи се загуби на плода, дефинирани като 2 или повече загуби през първи триместър на бременността (между 7 и 12 г. с.). Включени са само случаи на постембрионални загуби, след загуба на феталния пулс при ултразвуково изследване. Жените с документирани предходни загуби на биохимична бременност или аборт тип „кухо яйце” не са обект на изследването.

- **Група IIIб:** 19 жени с анамнеза за 2 или 3 загуби на бременността по време на втори триместър (между 13 и 24 г. с.). Не са включени случаите, които са резултат от документирана фетална малформация.

- **Група IIIв:** 16 жени с анамнеза за интраутеринна фетална смърт (след 24 г.с.). При 4 от жените бременността е била асоциирана с прееклампсия. Не са включени случаите, които са резултат от документирана фетална малформация.

Нито една от пациентките, включени в групата, няма живородено дете.

Изследването при всяка една от жените е проведено най-малко 4 седмици след последния неуспех.

**1.2.4. Група IV.** 41 бременни жени с анамнестични данни за инфертилитет. Включените в групата пациентки провеждат антиагрегантна и антикоагулантна терапия със следните препарати и схеми:

- Aspirin protect 100 mg, по 1 табл. вечер, през ден или всеки ден, до 36 г. с.

- Fraxiparin 0.3 ml s.c., по една апликация сутрин, през ден или всеки ден, като апликациите продължават до 7 дни преди термин.

Нива на PLA се определят преди започване на терапията (изходна стойност) и се проследяват ежемесечно в хода на терапията, но не по-рано от:

- 28 ден от назначаване на антиагрегантната терапия.
- 28 ден от провеждането на комбинирана антиагрегантна и антикоагулантна терапия.

При формиране на всяка от четирите групи, бяха изключени пациенти със следните заболявания, които биха повлияли получените резултати: предшествващи тромбози, диабет, инфекциозни, малигнени, автоимунни, чернодробни, бъбречни, сърдечно-съдови заболявания, дислипидемия, скорошна, голяма по обем хирургична интервенция и травма. Кръв не беше взета и от жени, съобщили за употреба на алкохол и тютюнопушене.

Наличието на тромбофилични фактори (панел от изброените по-долу генетични и придобити) беше използвано като критерий за изключване при формиране на групи I и II. При формирането на групи III и IV, пациентките не бяха тествани предварително за вродена и придобита тромбофилия, което означава, че в тези случаи, тромбофиличните фактори не бяха използвани като включващи или изключващи критерии. Вродената тромбофилия беше дефинирана като носителство на FVL G1691A, фактор II G20210A, C677T мутация в гена за MTHFR, GPIIb/IIIa полиморфизъм, PAI-1 – полиморфизъм. Придобитата тромбофилия беше дефинирана като наличие в плазмата на едно или повече от следните антифосфолипидни антитела - АКА-IgG, АКА-IgM, анти- $\beta$ 2-GPI-IgG, анти- $\beta$ 2-GPI-IgM, потвърдени при две отделни изследвания с интервал най-малко от 12 седмици.

Пациентките включени в групите от I до III са преустановили приема на медикаменти – антиагреганти, антикоагуланти, противовъзпалителни, антихистамини, и др. най-малко 6 седмици преди извършване изследването. Бременните жени, участващи в изследването и тези, които се подготвят за бременност, приемат по 0.4 mg фолиева киселина дневно, с оглед профилактика дефектите на невралната тръба.

## **2. МЕТОДИ**

### **2.1. Метод за *ex vivo* флуоцитометрично определяне нива на PLA от цяла кръв чрез определяне експресията на антигените CD41a, CD11b**

Изследването определя циркулиращи PLA.

Кръвните проби бяха обработени съгласно методичните указания на фирмата Becton Dickinson, USA, която е производител на използваните МоАт. Бяха спазени изискванията на водещи автори за минимални манипулации, като са изключени центрофугиране и миене при обработка на пробите с цел предпазване от *in vitro* активиране на тромбоцитите.

До 20 минути от вземане на кръвта беше приложено директно двуцветно имунофлуоресцентно оцветяване и комбинация от тромбоцитно-специфично и левкоцитно-специфично МоАт – CD41a/CD11b.

По време на приемане на пробите и анализа на резултатите, на двумерна точкова графика – FL1/SSC (CD41a/SSC) – при логаритмична скала за FL1 и SSC бяха очертани региони около тромбоцитите и тромбоцитните агрегати - хомо- и хетеротипни. С помощта на изотипните контроли се поставиха маркерите за отрицателна флуоресценция на FL1 и FL2-логаритмични хистограми. Анализът на резултатите беше извършен с компютърен софтуер Cell Quest. Резултатите за PLA, които експресират едновременно изследваните гликопротеини, бяха представени като процент от всички събития положителни за приложените маркери.

### **2.2. Метод за определяне на антикардиолипинови антитела от клас IgG и клас IgM**

Изследването е извършено по метода ELISA. Нормална стойност за Anti-Cardiolipin клас IgG < 10 GPL (U/ml) и клас IgM < 7 MPL (U/ml).

### **2.3. Метод за определяне на антитела срещу $\beta$ 2-GP I от клас IgG и IgM**

Принципът на метода е ELISA. Норма до 5 U/ml.

#### **2.4. Метод за определяне носителство на вродени тромбофилични фактори чрез ДНК анализ**

В основата на метода стои полимеразно-верижната реакция (PCR). Амплифицираните проби се инкубират със специфични рестриктази. Продуктите на рестриктазната реакция се разделят чрез електрофореза в 3.5% агарозен гел и се визуализират чрез етидиев бромид на ултравиолетова светлина.

#### **2.5. Статистически методи**

Данните от проучването са обработени със софтуерните статистически компютърни приложни програми Statgraphics v. 4.0 и EXCEL.

Резултатите от репрезентативното проучване са описани чрез таблици и графики. За доказване на достоверността на резултатите и установяване на статистическите закономерности и връзки между изследваните явления, се използваха следните статистически методи:

- изчисляване на основните показатели – относителен дял, средна стойност, медиана, стандартно отклонение;
- за изработване на референтни стойности – метод на перцентилите;
- за определяне на статистическата достоверност при сравняване на независими извадки – Kruskal-Wallis test, както и Mann-Whitney (Wilcoxon) W test, за сравняване на медианите от резултатите на изследваните групи;
- за изследване на връзки и зависимости – дисперсионен анализ за оценка на факторно влияние.

Всички връзки, зависимости и разлики между изследваните групи са установени при ниво на значимост на нулевата хипотеза –  $p < 0.05$ , респективно с гаранционна вероятност по-голяма от 0.95 (95%).

Чувствителността на флоуцитометричния метод за изследване на някои от показателите, беше изчислена като съотношение между броя на пациенти с повишени нива на PLA в групата и общия брой пациенти в същата група.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. Флоуцитометрично определяне на нива на PLA при контролната група от здрави жени

В хода на нашето проучване, натрупахме достатъчно резултати за нивата на PLA чрез проследяване експресията на антигените CD41a, CD11b посредством прилагане на флоуцитометричен метод при контролната група, която достигна до 34 здрави, небременни жени. Това ни позволи да формираме собствени референтни граници относно нивата на PLA, които бяха използвани за сравнение с получените резултати от изследваните групи пациенти (Таблица №1).

*Таблица №1. Словесна скала и граници на 7 степенен норматив за нива на PLA (%) при здрави небременни жени, изработен чрез изчисляване стойностите на персентилите (P).*

Словесна оценка	Граници	PLA (%)	Процент (брой) от случаите към всяка от оценките
Много ниска	$< P_5$	$< 0.35$	2.94 (1)
Ниска	$P_5 - P_{10}$	0.35 – 0.71	5.88 (2)
Под норма	$P_{10} - P_{25}$	0.71 – 1.07	14.7 (5)
Норма	$P_{25} - P_{75}$	1.07 – 1.56	52.94 (18)
Над норма	$P_{75} - P_{90}$	1.56 – 1.82	14.7 (5)
Висока	$P_{90} - P_{95}$	1.82 – 1.93	5.88 (2)
Много висока	$> P_{95}$	$> 1.93$	2.94 (1)

Флоуцитометричното определяне на PLA се характеризира с бързина, чувствителност, прецизност и обективност при съобразяване със специфичните характеристики на изследвания обект, поради което този анализ се използва все по-широко в практиката за оценка на тромбоцитна активация. Високата сензитивност на метода го прави лесно раним по отношение на артифициална *in vitro* активация. По-важни фактори, влияещи върху нивата на PLA, са: начин на венепункцията; вида на използвания антикоагулант; времето до началото на изследването; вид на приложените методични процедури (центрофугиране, миене,

миксиране, еритроцитна лиза); прилагане на фиксиране на пробите и етапа, на който се осъществява; време и температура на инкубиране; вид и настройки на използваната флоуцитометрична техника; начин на отчитане на резултатите (процент или MFI). До момента, няма създадена единна стандартизирана флоуцитометрична методика за определяне нива на PLA. Описаните в литературата протоколи са различни в методично отношение и ненапълно съобразени с влиянието на горните фактори. Това, както и специфичните характеристики на изследваните от нас пациенти, наложи изработване на собствени референтни граници съобразно приложената методика.

### **1. 1. Обсъждане на резултатите от контролната група здрави лица**

При изготвяне на нашия протокол следвахме препоръките на водещи автори във флоуцитометричните проучвания на PLA като *A. Hagberg*, 2000 г. и *M. Barnard*, 2003 г.

Отстраняването на червените кръвни клетки, което позволява точна идентификация на левкоцитните популации се постига чрез процедури на клетъчна сепарация и еритроцитна лиза. Тези процедури обуславят сигнификантната артификална активация *in vitro*. По тази причина, ние използвахме метод без еритроцитна лиза, както препоръчват *Hagberg u Lyberg*, 2000 г. При наличие на интактни еритроцити, разграничаването на левкоцитите се реализира посредством свързването им с левкоцитно-специфични МоАт. Комбинация от тромбоцитно-специфични и левкоцитно-специфични МоАт позволява идентификация на хетеротипните клетъчни комплекси.

Разнопосочни са мненията относно подбора на използваните МоАт. При избора на флоуцитометричен тромбоцитен маркер се обсъждат:

- степента на участие на гликопротеините във формиране на тромбоцитни агрегати (хомо- и хетеротипни), при което е възможно повърхностните рецептори да бъдат маскирани във вътрешността на комплексите;



- възможността за активационно-зависима загуба на гликопротеинния комплекс от клетъчната повърхност, което компрометираща точността на анализа, използващ съответния маркер.

При разработване на нашия протокол, сметохме за подходящо като тромбоцитно-специфичен маркер да използваме CD41a – активационно-независимата субединица на GPIIb-IIIa комплекса. Основание за избора си намерихме в изследванията на *M. Gawaz* и съавт., 1994 г., *A. Grau* и съавт., 1998 г., *J. Zeller* и съавт., 2005 г.

Друг спорен момент при методите за определяне на циркулиращи тромбоцитно-левкоцитни комплекси е изборът на антикоагулант, с който се взема кръвната проба. Водещи автори, независимо че подчертават важността на избора на кръвен антикоагулант за анализа на тромбоцитно-левкоцитното взаимодействие, не смятат за уместно да се налага употребата на даден антикоагулант пред другите възможни. Необходимо е с особено внимание да се интерпретират и сравняват резултатите от проучвания, при които са използвани различни антикоагуланти. Съобразихме се с най-често прилаганите за определяне на PLA антикоагуланти – Na-цитрат и K<sub>2</sub>EDTA, при разработване на нашия протокол.

Пробите инкубирахме на стайна температура (20 - 28°C), т. к. е известно, че инкубирането при 37°C води до повишаване нивата на PLA в нестимулирани проби.

Използвахме максимално “изчистена” методика за изследване на PLA, предвид високата чувствителност на тромбоцитите към *in vitro* активиране. Спазихме изискванията на *S. Harding* и съавт., 2007 г., обработката на кръвта да стартира до 20 минути от венепункцията. С цел предпазване от *in vitro* активиране на тромбоцитите и повишаване на PLA, приложихме минимални манипулации, като бяха изключени процедурите: разреждане, центрофугиране, миене, интензивно размесване. Фиксирането беше осъществено след оцветяването с МоАт.

Приложеното от нас флуоресцентно формиране на региони позволява да се анализират само частиците, които експресират едновременно CD41a и CD11b.

При направената от нас литературна справка намерихме резултати от изследване на нива на PLA при контролни групи от

няколко авторски колективи. Публикуваните резултати са разнопосочни спрямо нашите. Това обясняваме от една страна с голямото разнообразие от използвани методики, поради липсата на стандартизиран метод, а от друга – с малкия брой лица (n=12), включени в контролната група при някои от проучванията.

**В заключение**, представеният флоуцитометричен анализ на цяла кръв за определяне нива на PLA е чувствителен, информативен и с възможност за прилагане в ежедневната клинично-имунологична практика. Считаме, че достоверно отразява формирането на PLA *in vivo*, като не допуска възможността за отчитане на агрегацията на клетъчните елементи *in vitro*. Формираните референтни граници са съответни на използваната методика и особеностите на изследваните пациенти, което позволява да се използват при сравнение с получените в хода на проучването резултати.

## 2. Флоуцитометрично определяне на нива на PLA при групата от здрави бременни жени

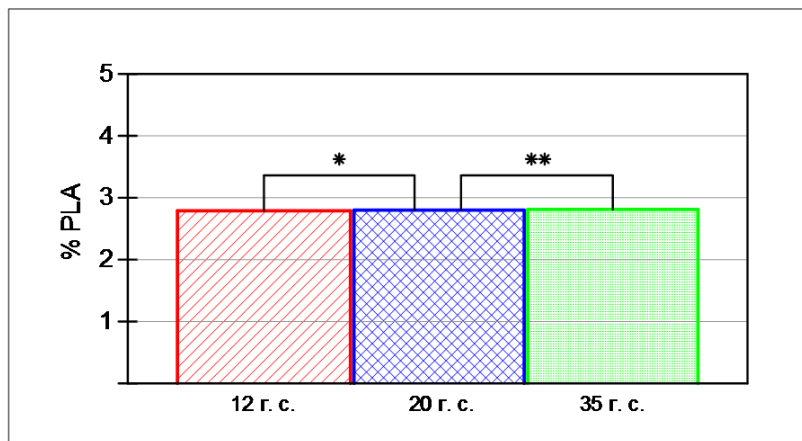
В хода на проведеното проучване проследихме нивата на PLA по време на нормално протичаща бременност при 25 здрави бременни жени (Таблица № 2).

*Таблица №2. Процент PLA, определен в хода на нормално протичаща бременност – по време на първи, втори и трети триместър на бременността. Резултатите са представени като средна стойност и медиана.*

Здрави бременни n=25	PLA%	
	Средна стойност	Медиана
I триместър (12 г. с.)	2.7856	2.89
II триместър (20 г. с.)	2.8008	2.66
III триместър (35 г.с.)	2.8052	3.03

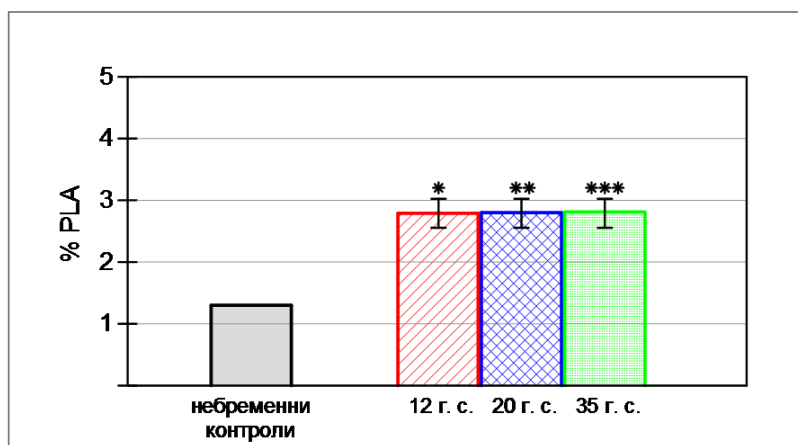
С помощта на дисперсионен анализ потърсихме зависимост между срока на бременността и нивата на PLA. Данните от анализа показват, че разликата между средните нива на PLA в проценти, определени при жени бременни в 12 г. с. и при жени бременни в 20 г.с., е случайна и не е зависима от срока на бременността, дефиниран в гестационни седмици. Аналогични резултати получихме и при

прилагане на анализа за сравняване средните равнища на PLA в проценти, определени при жени бременни в 20 г. с. и при жени бременни в 35 г.с. (Фиг. №1)



**Фиг. №1** Нива на PLA в проценти, определени в първи, втори и трети триместър при жени с нормално протичаща бременност ( $n=25$ ). Резултатите са представени като средна величина. Не се установяват статистически значими различия –  $*F=0.006231$ ;  $p=0.937$  и  $**F=0.000339$ ;  $p=0.985$ .

Достоверно повишен процент на PLA, представен като средна величина, регистрирахме при изследването на показателя при здрави жени, бременни съответно в 12 г. с., 20 г. с. и 35 г.с. в сравнение с контролната група от здрави жени, небременни към момента на изследване (1.2997%). Разликата беше сигнификантно значима за всеки един от трите случая – първи триместър ( $F=188.3675$ ;  $p=1.46E-19$ ), втори триместър ( $F=71.36523$ ;  $p=1.63E-11$ ), трети триместър ( $F=91.56107$ ;  $p=2.64E-13$ ) (Фиг. №2).



**Фиг. №2** Нива на PLA в проценти, определени в първи, втори и трети триместър при жени с нормално протичаща бременност ( $n=25$ ) и при контролна група ( $n=34$ ). Резултатите са представени като средна величина. Статистически значими различия –  $p < 0.05$  (\* / \*\* / \*\*\*).

Данните от представения дисперсионен анализ за оценка на факторно влияние идентифицират бременността като фактор, повлияващ нивата на PLA.

Нивата на PLA, определени при здрави жени с нормално протичаща бременност и проследени в хода на бременността, послужиха за формиране на референтни стойности на PLA по време на бременността (Таблица №3).

**Таблица №3** Словесна скала и граници на 7 степенен норматив за нива на PLA (%) при здрави бременни жени, изработен чрез изчисляване стойностите на персентилите (P).

Словесна оценка	Граници	PLA (%)	Процент (брой) от случаите към всяка от оценките
Много ниска	$< P_5$	$< 1.33$	4.0 (3)
Ниска	$P_5 - P_{10}$	1.33 – 1.99	6.7 (5)
Под норма	$P_{10} - P_{25}$	1.99 – 2.35	6.7 (5)
Норма	$P_{25} - P_{75}$	2.35 – 3.13	62.6 (47)
Над норма	$P_{75} - P_{90}$	3.13 – 3.46	9.3 (7)
Висока	$P_{90} - P_{95}$	3.46 – 4.12	6.7 (5)
Много висока	$> P_{95}$	$> 4.12$	4.0 (3)

Така формираните референтни стойности бяха използвани за сравнение с получените резултати от изследваните групи пациенти, наблюдавани по време на бременност.

## **2. 1. Обсъждане на резултатите от флоуцитометрично определяне на нива на PLA при групата от здрави бременни жени**

Бременността е период, по време на който е повишен рискът за възникване на тромботични усложнения. Интерес представляват тези механизми за поддържане на хемостазния баланс в хода на бременността, чието нарушение би обусловило изявата на тромботично събитие. Често се поставя въпросът за ролята на PLA като елемент на тези регулиращи механизми.

Не открихме статистически значими различия в нивата на PLA между жените в различните триместри на бременността. Затова, при последващите анализи представихме резултатите без разделяне по триместър.

Сравнявайки обаче, нивата на изследвания маркер между здравите бременни и небременни жени, установихме статистически значимо повишение на нивата на PLA по време на нормалната бременност. Нашите резултати са в съответствие с данни от предходни проучвания, че бременността е състояние, асоциирано с тромбоцитна активация.

Няколко са описаните в литературата хипотези, които обясняват наблюдаваното повишение на нивата на PLA в хода на нормална бременност. Според едни автори, PLA отразяват физиологичен механизъм на елиминиране на активирани тромбоцити от циркулацията, което означава, че повишението на нивата им вероятно е белег за диспропорционално повишение на активирани тромбоцити. От друга страна, *V. Dole* и съавт., 2007 г., и *M. Elstad* и съавт., 1995 г., описват един порочен кръг, водещ до прогресивна и неконтролирана тромбоцитна активация, а именно: Р-селектинът, при свързването си с PSGL-1 върху левкоцитите инициира синтез на PAF (фактор, активиращ тромбоцитите); При конюгирането с тромбоцитите се повишава експресията на CD11b/CD18 (Mac-1) от левкоцитите, което амплифицира

тромбоцитно-левкоцитното взаимодействие чрез изграждане на фибриногенови мостове между Mac-1 и тромбоцитния GP IIb-IIIa.

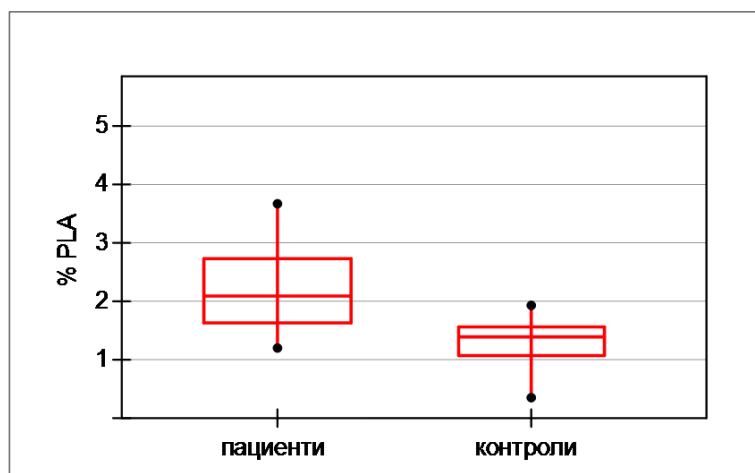
За формирането на хетеротипни агрегати допринасят състояния, асоциирани с възпаление и ендотелна дисфункция, каквото е метаболитният синдром. Нормалният физиологичен отговор към бременността може да се разглежда като преходна изява на метаболитен синдром. По този начин, метаболитният отговор може да се разглежда като „стрес“ тест за майчиния въглехидратен и липиден метаболизъм, както и за съдовата функция. Жени, които не успяват да компенсират адекватно свързаните с бременността метаболитни и възпалителни промени са с повишен риск от възникване на тромботични инциденти, включително тромбоза на утероплацентарните съдове. В тези случаи, както посочват *S. Lindemann* и съавт., 2007 г., PLA са не само маркер за тромбоцитна активация, но и водещ елемент в патогенезата на нарушенията.

**В заключение**, получените от нас резултати показват, че промените, съпътстващи настъпването и развитието на бременността са свързани с усилване на тромботичните процеси като част от имуновъзпалителната и метаболитна реакция, характеризираща нормалната бременност. В това проучване доказахме, че по време на един хроничен имунологичен дисбаланс, какъвто е бременността, част от циркулиращите тромбоцити са активирани, експресират висок брой адхезионни молекули, което определя възможността да се свържат с моноцити и неутрофили до формиране на хетеротипни агрегати и да реализират функциите си в процесите на тромбоза и възпаление. Изработените референтни стойности за нива на PLA при нормална бременност имат информативна стойност за идентифициране на рискови за развитие на тромботично събитие бременни жени.

### **3. Флоуцитометрично определяне на PLA при групата жени с анамнестични данни за репродуктивни неуспехи, небременни към момента на изследването**

Резултатите, които получихме за процент PLA, като медиана (2.09) при групата жени с анамнестични данни за инфертилитет, небременни към момента на изследването, сравнихме с контролната

група (1.39). На Фигура №3 е представено сигнификантно установеното повишение на изследвания маркер.

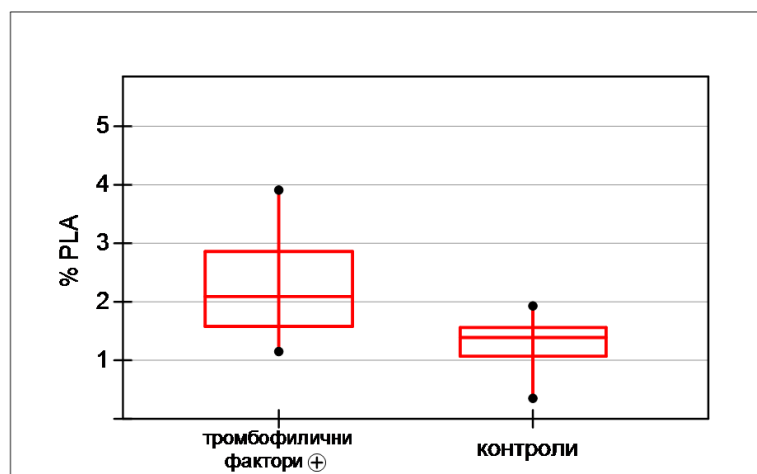


**Фиг. №3** Нива на PLA в проценти, при групата жени с анамнестични данни за инфертилитет, небременни към момента на изследване ( $n=185$ ) и контролна група ( $n=34$ ). Резултатите са представени като медиана (хоризонтала) и стойностите на 25-ти и 75-ти перцентил (квадрат) и 5-ти и 95-ти перцентил (вертикала). Статистически значими различия –  $w=933.5$ ;  $p=7.49316E-11$

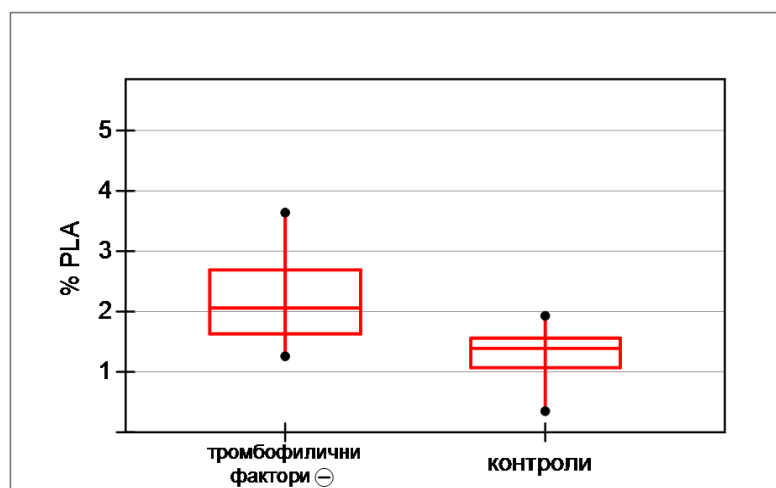
Групата от 185 жени беше допълнително разделена на две подгрупи в зависимост от наличието на вродени и/или придобити тромбофилични фактори:

- 99 жени (53.5%) с доказани вродени и/или придобити тромбофилични фактори;
- 86 жени (46.5%), при които не се установява никой от изследваните вродени и/или придобити тромбофилични фактори.

Сравнихме нивата на PLA на двете подгрупи, с доказани тромбофилични фактори и без установени тромбофилични фактори съответно, с нивата на PLA при контролната група. И за двете подгрупи установихме достоверно повишен процент PLA спрямо контролите (Фиг. №4 и №5).



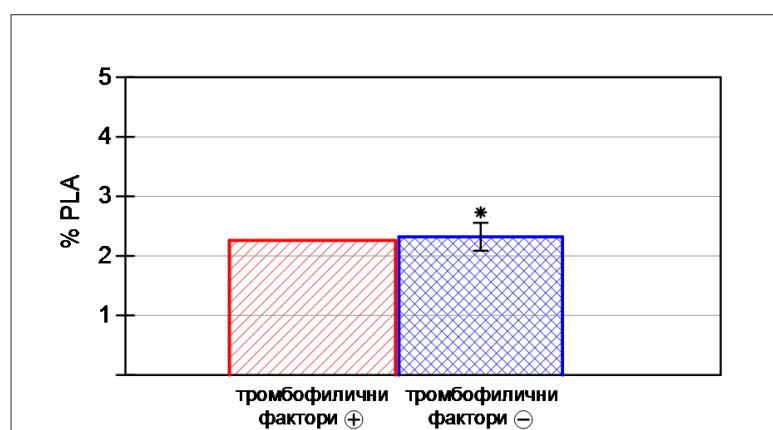
**Фиг. №4** Нива на PLA в проценти, при групата жени с анамнестични данни за инфертилитет, небременни към момента на изследване, с доказани вродени и/или придобити тромбофилични фактори ( $n=99$ ) и контролна група ( $n=34$ ). Резултатите са представени като медиана (хоризонтала) и стойностите на 25<sup>та</sup> и 75<sup>та</sup> перцентил (квадрат) и 5<sup>та</sup> и 95<sup>та</sup> перцентил (вертикала). Статистически значими различия –  $w=2862.0$ ;  $p=1.21336E-9$ .



**Фиг. №5** Нива на PLA в проценти, при групата жени с анамнестични данни за инфертилитет, небременни към момента на изследване, при които не са доказани вродени и/или придобити тромбофилични фактори ( $n=86$ ) и контролна група ( $n=34$ ). Резултатите са представени като медиана (хоризонтала) и стойностите на 25<sup>та</sup> и 75<sup>та</sup> перцентил (квадрат) и 5<sup>та</sup> и 95<sup>та</sup> перцентил (вертикала). Статистически значими различия –  $w=2494.5$ ;  $p=1.85568E-9$ .



Използвахме дисперсионен анализ, за да направим оценка на зависимостта между наличието на изследваните вродени и/или придобити тромбофилични фактори и нивата на PLA при жени с анамнестични данни за инфертилитет, небременни към момента на изследването. Данните от анализа показват, че разликата между средните нива на PLA в проценти, определени при жени, носителки на тромбофилични фактори и при жени, отрицателни за тромбофилични фактори е случайна и не е зависима от наличието на фактори за тромбофилия (Фиг. №6).



**Фиг. №6** Нива на PLA в проценти при двете подгрупи жени с анамнестични данни за инфертилитет, небременни към момента на изследване - с доказани вродени и/или придобити тромбофилични фактори ( $n=99$ ) и отрицателни за тромбофилични фактори ( $n=86$ ). Резултатите са представени като средна величина. Не се установяват статистически значими различия –  $*F=0.118794$ ;  $p=0.730742$ .

След анализ на получените данни от двете подгрупи, решихме да продължим нашето проучване с определяне на честотата на установените тромбофилични фактори. Според носителството на единичен тромбофиличен дефект или комбинация от тромбофилични фактори се формираха 8 подгрупи. Най-висока беше честотата на придобитата тромбофилия (антифосфолипидни антитела), следвана от комбинацията от мутантен генотип и антифосфолипидни антитела (Таблица №4).

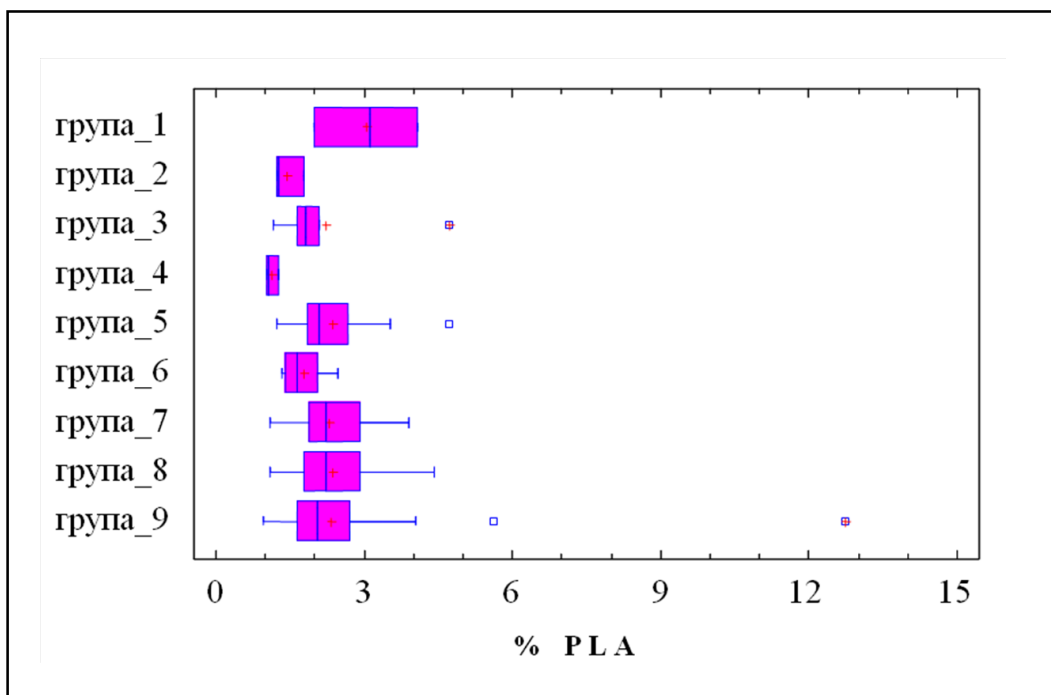
*Таблица №4. Тромбофилични фактори (мутантен генотип и антифосфолипидни антитела), тяхната честота при жените с анамнестични данни за инфертилитет, небременни към момента на изследване и PLA (средна стойност и медиана) при подгрупите, формирани съобразно носителството на вродени и/или придобити тромбофилични фактори.*

№	Тромбофилични фактори	Брой	Честота	PLA%	
				Средна стойност	Медиана
1.	Фактор V Лайден Хетерозиготен (G/A) или хомозиготен (A/A) генотип	3	3.03%	3.05	3.1
2.	Фактор II (Протромбин) G20210A Хетерозиготен (G/A) или хомозиготен (A/A) генотип	3	3.03%	1.43	1.28
3.	MTHFR (C677T) Хетерозиготен (C/T) или хомозиготен (T/T) генотип	6	6.06%	2.21	1.825
4.	GPІІb/ІІа Хетерозиготен (A1/A2) или хомозиготен (A2/A2) генотип	3	3.03%	1.13	1.07
5.	PAI-1 Хетерозиготен (4G/5G) или хомозиготен (4G/4G) генотип	17	17.2%	2.36	2.08
6.	Повече от един мутантен генотип	5	5.05%	1.78	1.65
7.	Антифосфолипидни антитела (без мутантен генотип)	38	38.4%	2.31	2.215
8.	Мутантен генотип и антифосфолипидни антитела	24	24.2%	2.38	2.24

Продължихме анализа на резултатите в групата жени с анамнестични данни за инфертилитет, небременни към момента на изследването, с оценка на влиянието на отделните тромбофилични фактори и на комбинацията от тромбофилични фактори върху нивата на PLA (Таблица №5). Достоверно повишен процент на PLA, представен като медиана, регистрирахме в подгрупата пациентки, носители на фактор V на Лайден мутация, в сравнение с останалите подгрупи. Разликата беше сигнификантно значима – test statistic= 17.8737; p=0.0221933 (Фиг. №7).

*Таблица №5. Нива на PLA (най-ниска и най-висока измерена стойност) и процент (брой) измервания в референтния интервал при подгрупите, формирани съобразно носителството на вродени и/или придобити тромбофилични фактори.*

№	Тромбофилични фактори	Брой	Най-ниска измерена стойност (%)	Най-висока измерена стойност (%)	Процент (брой) от случаите в референтния интервал
1.	Фактор V Лайден	3	1.98	4.07	0
2.	Фактор II (Протромбин) G20210A	3	1.24	1.78	66.7 (2)
3.	MTHFR (C677T)	6	1.17	4.73	16.7 (1)
4.	GPІb/IIIa	3	1.03	1.28	100 (3)
5.	РАІ-1	17	1.24	4.73	23.5 (4)
6.	Повече от един мутантен генотип	5	1.34	2.45	40 (2)
7.	Антифосфолипидни антитела (без мутантен генотип)	38	1.1	3.91	18.4 (7)
8.	Мутантен генотип и антифосфолипидни антитела	24	1.09	4.42	20.8 (5)
9.	Без доказани тромбофилични фактори	86	0.97	12.73	2.21 (19)



*Фиг. №7. Нива на PLA в проценти при подгрупите, формирани съобразно носителството на вродени и/или придобити тромбофилични фактори. Резултатите са представени като медиана, най-ниска и най-висока стойност.*

### **3. 1. Обсъждане на резултатите от флоуцитометрично определяне на PLA при групата жени с анамнестични данни за репродуктивни неуспехи, небременни към момента на изследването**

Точната етиология на спонтанните аборти и късните усложнения на бременността остава все още неизяснена. Патогенетично се предполага, че оклузия на утероплацентарната васкулатура може да бъде причина за неблагоприятния изход на бременността. Много автори посочват връзка между усложненията на бременността и изявата на атеротромботични оклузивни съдови заболявания на по-късен етап от живота.

Възниква въпросът дали има генерализирана тромбоцитна активация и ако има, каква е нейната диагностична и прогностична стойност както за планиране и проследяване на бременността при жени с инфертилитет, така и за идентифициране на високорискови

по отношение на съдова патология пациенти, нуждаещи се от засилено медицинско наблюдение впоследствие.

При сравняване с контролната група установихме сигнификантно повишение в нивата на PLA, представени като процент. Тази наша констатация идва, за да потвърди хипотезата за наличие на генерализирана тромбоцитна активация при жени с инфертилитет, небременни към момента на изследването. Не намерихме други проучвания, които да търсят връзка между нивата на PLA и изявите на инфертилитет. В подкрепа на нашите резултати са изследванията на редица автори, които установяват повишена тромбоцитна активация при жени с инфертилитет позовавайки се на различни маркери - нива на прокоагулантни микрочастици (тромбоцитни и ендотелни) и тромбин-антитромбиновите комплекси.

Наличието на повишени нива на PLA в интервалите между бременностите предполага наличието на хронично активирана хиперкоагулация. Независимо, че никоя от изследваните пациентки няма анамнеза за предшестващи тромботични инциденти, възможно е такива да се реализират по време на бременност. PLA при пациентки с инфертилитет, са не само маркер за протромботично състояние на организма, но заемат важно място в патогенезата на тромботичните нарушения, вкл. тромбозата на утероплацентарните капилляри. Те вероятно имат адитивен ефект върху други етиологични фактори за инфертилитет и върху хиперкоагулабилното състояние, което настъпва по време на бременност.

Въпреки непрекъснато увеличаващия се брой проучвания, все още няма яснота относно връзката между тромбофилията и неблагоприятния изход на бременността и по-специално относно влиянието на редките тромбофилични дефекти, както и относно влиянието на комбинация от тромбофилични фактори. Поради това се насочихме към сравняване нивата на PLA между формираните две подгрупи – жени със и без доказани тромбофилични фактори. При анализа на резултатите не установихме сигнификантна разлика в стойностите на изследвания показател при двете подгрупи. Подобни на нашите резултати, но като използват други маркери за прокоагулантна нагласа на организма, съобщават *Vincent* и съавт., 1998 г., и *Ferroni* и съавт., 2010 г.

Различни проучвания, които изследват връзката между тромбофилията и усложненията на бременността показват, че различни фактори като възпалителни заболявания, имунни механизми и ендокринни дефекти в допълнение или синергично на тромбофилията може да повлияят изхода на бременността. Не е намерена разлика между жените със и без тромбофилични дефекти по отношение тежките усложнения на бременността, което би могло да отразява едно неизвестно към момента тромбофилично състояние. Ето защо, ние също не бихме могли да изключим вероятността, според която сред жените в подгрупата без тромбофилични дефекти, да има и такива, които носят тромбофилични нарушения, различни от нашия панел, които не са диагностицирани. Тези данни показват, че последствието - прокоагулантните промени в организма, отразяват по-надеждно риска за възникване на усложнения на бременността в сравнение с причината - вродената или придобитата тромбофилия. В голямата част от случаите на фетални загуби причината за тях остава неясна и е трудно тези събития да се свържат с прокоагулантен проблем при майката, ако се използва диагностициране на определени тромбофилични фактори.

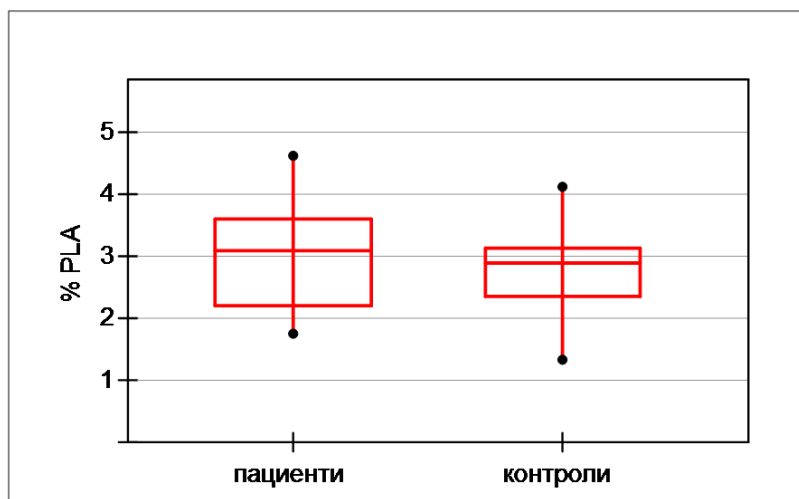
Прилагането на една универсална скринингова стратегия би улеснило прецизирането на антиромботичното лечение за редуциране на риска от неблагоприятен изход на бременността. Известни научно-изследователски групи считат, че скринингът на неселектирани пациенти е икономически неизгоден и се предпочита селективния, базиран на анамнестични данни скрининг. Конвенционалните тестове за вродени и придобити коагулационни дефекти са скъпи, консумиращи време и не отчитат факта, че хемостазата *in vivo* е един динамичен процес, в който едновременно участват коагулационната, фибринолитичната система и клетъчните елементи. Така определянето на отделните тромбофилични дефекти е с ограничени възможности за оценка на тромбофиличния риск, особено по време на бременност. В същото време, за клиничната практика е важно идентифицирането на жени с повишен риск от загуба на бременността, както и жените, подходящи за прилагане на антиагрегантна и антикоагулантна терапия. От направения литературен преглед за значението на хетеротипните конюгати при

съдови заболявания е видно, че те са подходящ прогностичен маркер за тромботични събития, а флоуцитометричният метод за определянето им се характеризира с бързина, чувствителност, прецизност и обективност. В съответствие с тези данни, нашите резултати сочат, че флоуцитометричното определяне на PLA е подходящ метод за идентифициране на пациентки с протромботична нагласа сред жените с репродуктивни неуспехи, планиращи бременност.

**В заключение** може да кажем, че съществува субгрупа от пациенти с репродуктивни неуспехи, които са в перманентно протромботично състояние, дори извън бременността. Наличието на PLA може да се разглежда като хронично нарушение, сравнимо с придобитата тромбофилия, което се манифестира клинично по време на бременността. Нашите резултати показват, че флоуцитометричното определяне на нива на PLA при пациентки с анамнестични данни за инфертилитет в периода на планиране на бременност е достатъчно информативно. Считаме, че това изследване би било важен елемент в комплексния подход към тези пациентки. В рамките на 1-2 часа, клиницистът би могъл да получи бърза и достоверна информация за протромботичната нагласа на своята пациентката и да прецени необходимостта от допълнителни изследвания за прецизно диагностициране на състоянието, както и да определи най-подходящата профилактична или терапевтична схема на лечение.

#### **4. Флоуцитометрично определяне на PLA при групата бременни жени с анамнестични данни за инфертилитет, без назначена антиагрегантна и/или антикоагулантна терапия към момента на изследване**

Не установихме статистически достоверна разлика при сравняване на медианите на нивата на PLA в проценти, между контролната група и групата бременни жени с анамнестични данни за инфертилитет без назначена терапия към момента на изследването (Фиг. №8).



**Фиг. №8.** Нива на PLA в проценти, при групата бременни жени с анамнестични данни за инфертилитет, без назначена терапия към момента на изследване ( $n=43$ ) и контролна група ( $n=75$ ). Резултатите са представени като медиана (хоризонтала) и стойностите на 25<sup>-та</sup> и 75<sup>-та</sup> персентил (квадрат) и 5<sup>-та</sup> и 95<sup>-та</sup> персентил (вертикала). Не се установяват статистически значими различия –  $w=1853.5$ ;  $p=0.178627$

Групата от 43 жени беше допълнително разделена на две подгрупи по наличието на вродени и/или придобити тромбофилични фактори:

- 21 жени (48.8%) с доказани вродени и/или придобити тромбофилични фактори;
- 22 жени (51.2%), при които не се установява никой от изследваните вродени и/или придобити тромбофилични фактори;

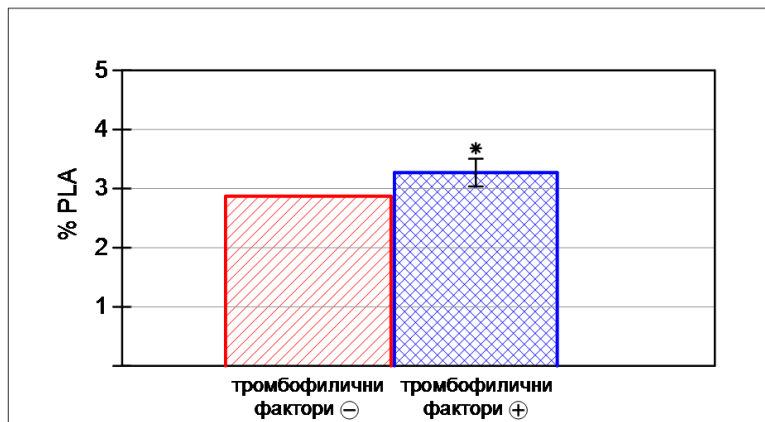
Сравнихме нивата на PLA на двете подгрупи, с доказани тромбофилични фактори и без установени тромбофилични фактори съответно, с нивата на PLA при контролната група. При сравняване на резултатите не установихме сигнификантна разлика (Таблица №6).



**Таблица №6.** Нива на PLA в проценти, при подгрупата пациенти с доказани тромбофилични фактори (n=21), подгрупата пациенти без установени тромбофилични фактори (n=22) и контролна група (n=75). Резултатите са представени като медиана.

Група	PLA% Медиана	Р спрямо контролна група	Р спрямо група без тромбофиличн и фактори
Пациенти с доказани тромбофилични фактори, n=21	3.21	0.240177	0.567902
Пациенти без установени тромбофилични фактори, n=22	2.975	0.354343	
Контролна група, n=75	2.89		

За да оценим влиянието на изследваните вродени и придобити тромбофилични фактори върху нивата на PLA по време на бременността, приложихме дисперсионен анализ. Данните от анализа показват, че разликата между средните равнища на PLA в проценти, определени при жени носителки на тромбофилични фактори и при жени отрицателни за тромбофилични фактори, е случайна и не е зависима от наличието на фактори за тромбофилия (Фиг. №9).



**Фиг. №9.** Нива на PLA в проценти при двете подгрупи бременни жени - с доказани вродени и/или придобити тромбофилични фактори ( $n=21$ ) и отрицателни за тромбофилични фактори ( $n=22$ ). Резултатите са представени като средна величина. Не се установяват статистически значими различия –  $*F=1.6$ ;  $p=0.2129$ .

Продължихме отразяването на резултатите в групата бременни жени с анамнестични данни за инфертилитет без назначена терапия към момента на изследването с оценка на влиянието на отделните тромбофилични фактори и на комбинацията от тромбофилични фактори върху нивата на PLA (Таблица №7). Не установихме разлика при сравняване на процента PLA представени като медиана между формираните съобразно наличието на вродени и/или придобити тромбофилични фактори подгрупи – test statistic=2.6488;  $p=0.448995$ .

*Таблица №7. Нива на PLA (най-ниска и най-висока измерена стойност) и процент (брой) измервания в референтния интервал при подгрупите, формирани съобразно носителството на вродени и/или придобити тромбофилични фактори.*

№	Тромбофилични фактори	Брой	Най-ниска измерена стойност (%)	Най-висока измерена стойност (%)	Процент (брой) от случаите в референтния интервал
1.	Мутантен генотип (един или повече)	11	1.67	4.44	54.5 (6)
2.	Антифосфолипидни антитела (без мутантен генотип)	6	1.75	6.03	50.0 (3)
3.	Мутантен генотип и антифосфолипидни антитела	4	3.09	6.0	25.0 (1)
4.	Без доказани тромбофилични фактори	22	0.91	3.87	59.1 (13)

След проследяване на бременността на пациентките от групата до термин, трябва да отбележим, че регистрирахме усложнения и неблагоприятен изход на бременността при 8 от включените в наблюдението жени:

- 4 от пациентките развиха преекламписия (ПЕ). При една от тях впоследствие имаше клинични, лабораторни и инструментални данни за тежка ПЕ с индикации за преждевременно родоразрешение чрез операция като плодът беше с признаци на хипотрофия;

- при две от жените се регистрира загуба на плода по време на първи триместър, в 6 г. с. и 8 г. с. съответно;

- при една от жените се регистрира интраутеринна фетална смърт в 26 г. с;

- при една от жените се регистрира ретардация на плода;

Нивата на PLA в проценти при пациентките с ПЕ имаха едни от най-високите стойности, съответно 6.03 за пациент №1, 4.44 за пациент №2, 4.05 за пациент №3 и 3.87 за пациент №4. Индивидуалните резултати на пациентките със загуба на плода по време на първи триместър и на пациентката, при която се регистрира интраутеринна фетална смърт бяха в референтния интервал както

следва: 2.18% (загуба в 6 г. с.), 2.2% (загуба в 8 г. с.), 2.76% (загуба в 26 г. с.). Повишени нива на PLA в проценти бяха измерени при пациентката с интраутеринна ретардация на плода като усложнение на бременността – 3.56.

На Таблица №8 са представени тромбофиличните фактори – вродени и/или придобити, при пациентките с усложнена или неблагоприятно протекла бременност.

*Таблица №8. Тромбофилични фактори (мутантен генотип и антифосфолипидни антитела), при жени с усложнена или неблагоприятно протекла бременност.*

№	Усложнение/ неблагоприятен изход на бременността	aPL	FV	FII	MTHFR	IIbIIIa	PAI
1.	ПЕ пациент №1	+	-	-	-	-	-
2.	ПЕ пациент №2	-	+	-	-	-	-
3.	ПЕ пациент №3	-	+	-	-	-	-
4.	ПЕ пациент №4	-	-	-	-	-	-
5.	Загуба на плода в 6 г. с.	-	-	-	-	-	-
6.	Загуба на плода в 8 г. с.	-	-	-	-	-	+
7.	Фетална ретардация	+	-	-	+	-	-
8.	Интраутеринна фетална смърт	-	-	-	-	-	-

#### **4.1. Обсъждане на резултатите от флоуцитометрично определяне на нива на PLA при бременни жени с анамнестични данни за инфертилитет, без назначена антиагрегантна и/или антикоагулантна терапия към момента на изследване**

При нормална бременност съществуват условия за отделянето на слаби активационни стимули, които повишават реактивността на тромбоцитите към последваща стимулация. Това балансирано физиологично състояние преминава в патологично на фона на патогенетичните характеристики при усложнения на бременността като повтарящи се аборти, прееклампсия и интраутеринна ретардация на плода.

Кооперацията между тромбоцити и левкоцити е свързана с генериране на интраваскуларен тъканен фактор (TF) и активиране на външния път на коагулация. Понижението на TF е един от

механизмите балансиращи прокоагулантното състояние при нормалната бременност. Логично възниква въпросът за значението на PLA като медиатор на неблагоприятния изход на бременността. Определихме нивата на PLA в хода на нетретирани бременности при жени с анамнестични данни за инфертилитет. При сравнение с контролна група от здрави бременни жени не установихме сигнификантна разлика в нивата на PLA при двете групи. От друга страна, анализирайки резултатите на отделните пациентки, констатирахме значително повишени нива на PLA при пет от пациентките, при които впоследствие наблюдавахме усложнения и неблагоприятен изход на бременността независимо от приложената терапия.

Интерес представлява регистрираното от нас повишение в нивата на PLA при 4 пациентки, които впоследствие развиха ПЕ и при една пациентка, при която беше установена интраутеринна ретардация на плода. Тези резултати са в синхрон с данните, публикувани от *J. Var* и съавт., 1997 г., и *A. Konijnenberg* и съавт., 1997 г., които съобщават, че тромбоцитната активация се повишава в ранните седмици на бременността при жени, рискови за възникване на прееклампсия. В търсене на обяснение на получените резултати, разгледахме голям брой проучвания върху регулацията на хемостатичните механизми в плацентата. Наблюденията на много автори показват, че трофобластните клетки мимикрират ендотела в способността му да регулира антикоагулантните и фибринолитичните процеси. При ПЕ и/или интраутеринна ретардация на плода е доказано, че трофобластните клетки експресират по-ниска активност на тъканен плазминогенен активатор, което обуславя развитие на остра атероза на майчините спирални артерии, свързана с чести тромбози. Плацентарната хипоксия и освобождаване на проинфламаторни цитокини и плацентарни фрагменти в майчината циркулация водят до генерализирана ендотелна активация и дисфункция. След активиране или увреждане ендотелните клетки не само губят антикоагулантните си функции, но продуцират прокоагуланти, вазоконстриктори и митогени. В резултат на тези промени се създават благоприятни условия за активиране на тромбоцитите, които стават ключова фигура в последващото развитие на

тромботичните и възпалителни процеси при пациентки с ПЕ, включително и с участието си в хетеротипни взаимодействия с левкоцитите.

Не намерихме проучвания, които проследяват нивата на хетеротипните агрегати в хода на бременности, рискови за възникване на спонтанни аборти. Съдовата тромбоза, като общ патогенетичен механизъм при неблагоприятния изход на бременността и остър коронарен синдром, ни даде основание да се върнем към значението на PLA при тромбоза на коронарните артерии, а именно като маркер за настъпване на остро тромботично събитие. Въз основа на тези данни, ние считаме, че PLA имат прогностична стойност за протичането на бременността.

При две от пациентките, при които регистрирахме спонтанно прекъсване на бременността съответно в 6 и 8 гестационна седмица, нивата на PLA бяха в границите на нормата, определена за бременни жени. Обяснение на регистрирания от нас резултат открихме в значителен брой проучвания върху животински модели относно ролята на коагулационната система за нормалното развитие и функциониране на плацентата. Нарушената функция на системата тромбомодулин–ендотелен протеин С рецептор е свързана с тромбин-медираната тромбоцитна активация, която обуславя увреждане на плацентарната морфогенеза. Точният механизъм на процеса остава неясен, но се обсъжда ролята на тромбоцитите за натрупване на възпалителни клетки и активиране на комплемента. Според *R. Sood* и съавт., 2008 г. се касае за локализирана активация на майчините тромбоцити в майчино-феталната циркулация, включително при майки с нормална хемостатична функция. Ултразвукови и анатомични проучвания показват, че интервилозната циркулация стартира в периферията на плацентата около 9 гестационна седмица и става дифузна и постоянна след 12 гестационна седмица, при което нетромботичните механизми на действие на компонентите на хемостатичния път може да обяснят наблюдаваните по време на първия триместър загуби.

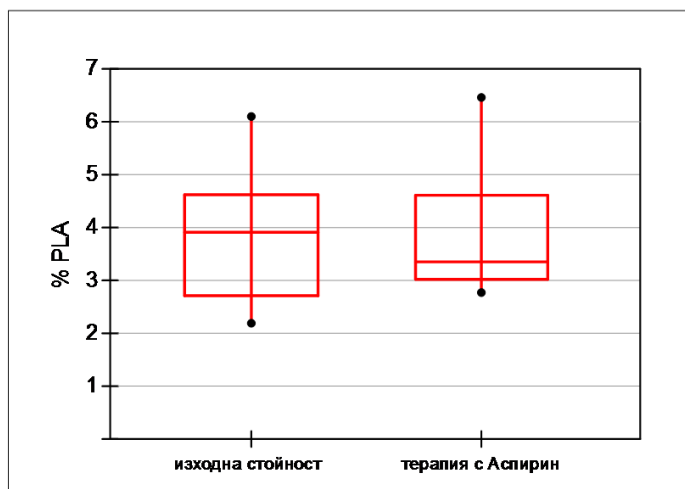
Друг аспект на проучванията върху плацентарната циркулация е свързан с идентифициране на генетичния произход на съдовото русло. Установено е, че майчини и фетални компоненти координирано регулират локалната хемостаза в плацентарната

циркуляция и поради това заедно детерминират риска от неблагоприятен изход на бременността. Това дава основание на някои автори при определяне на действителния риск от тромбофилия-асоциирани нарушения на бременността да анализират не само майчиния, но и бащиния (вместо феталния) геном. На второ място – тромбофиличните мутации не винаги са свързани с формиране на тромби в плацентрните капилляри и може да обусловят структурни нарушения и/или абнормности в развитието на плацентата. Не на последно място, локално активираните в условията на определен набор от тромбофилични мутации тромбоцити, може да окажат критично въздействие, което да ускори развитието на плацентарна дисфункция. Изхождайки от тези данни, за нас не беше изненадваща липсата на ясно изразена асоциация между нивата на PLA и наличието на вродени и/или придобити тромбофилични фактори при бременни жени с анамнестични данни за инфертилитет.

**В заключение** може да кажем, че проследяването на нивата на PLA в хода на бременността има прогностична стойност. Повишените нива на PLA индицират настъпване на остро тромботично събитие. Едновременно с това, нормалните нива на PLA не изключват възможността за неблагоприятен изход на бременността, в случаите когато локално активирани тромбоцити нарушават плацентарната морфогенеза при загубите на първи триместър. Считаме, че данните от флоуцитометричното определяне на нивата на PLA при пациентки с рискови бременности, съпоставени с данните от анализа на тромбофилични фактори при двамата партньори, осигуряват достатъчно информация за прогнозиране изхода на бременността и избора на най-подходяща терапевтична схема.

**5. Флоуцитометрично определяне на нива на PLA при групата бременни жени с анамнестични данни за инфертилитет, които към момента на изследване провеждат антиагрегантна и антикоагулантна терапия по схема**

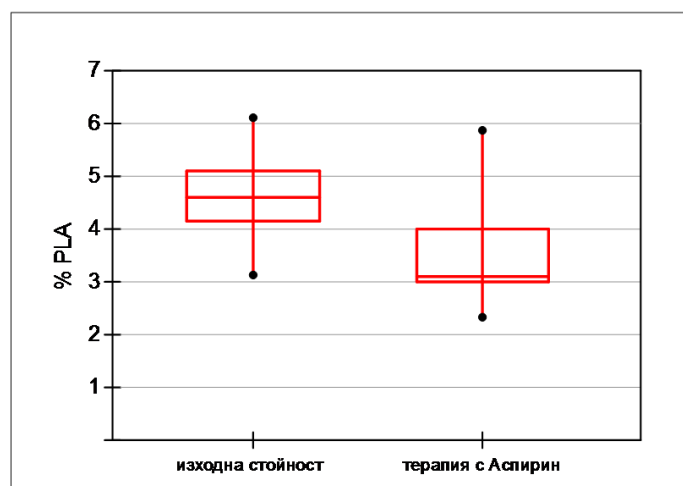
Сравнихме нивата на PLA, като медиана, определени при групата бременни жени (n=41) преди започване на терапия (изходна стойност) с нивата на PLA, определени след проведена терапия с аспирин по схема, описана в раздел „Материали и методи”, т. 1.2.4. Не установихме статистически достоверна разлика между нивата на PLA, определени преди и след провеждане на антиагрегантна терапия (Фиг. №10).



**Фиг. №10.** Нива на PLA в проценти, определени преди и след провеждане на антиагрегантна терапия в групата бременни жени с анамнестични данни за репродуктивни неуспехи (n=41). Резултатите са представени като медиана (хоризонтала) и стойностите на 25<sup>-та</sup> и 75<sup>-та</sup> персентил (квадрат) и 5<sup>-та</sup> и 95<sup>-та</sup> персентил (вертикала). Не се установяват статистически значими различия – w=869.5; p=0.791481.

При анализиране индивидуалните резултати на пациентите констатирахме сигнификантно понижени нива на PLA след провеждане на антиагрегантна терапия спрямо изходната стойност при 16 (39.02%) жени (Фиг. №11).





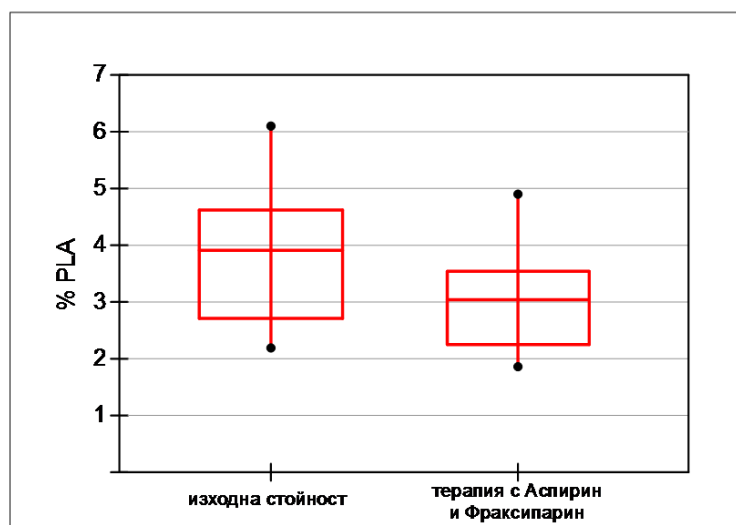
**Фиг. №11.** Нива на PLA в проценти, определени преди и след провеждане на антиагрегантна терапия, при 16 от пациентките. Резултатите са представени като медиана (хоризонтала) и стойностите на 25<sup>-та</sup> и 75<sup>-та</sup> персентил (квадрат) и 5<sup>-та</sup> и 95<sup>-та</sup> персентил (вертикала). Статистически значими различия –  $w=46.0$ ;  $p=0.00211692$ .

След сравнение с останалата част от групата, не установихме достоверно понижен процент на PLA, като медиана. Сигнификантна беше разликата, регистрирана при сравнение на изходната стойност в нивата на PLA при същите 16 жени спрямо изходната стойност на останалите 25 жени (Таблица №9).

**Таблица №9.** Индивидуален анализ на нива на PLA в групата бременни жени, провели антиагрегантна терапия.

Група	PLA% Медиана	P спрямо останалата част от група
Изходна стойност, n=16	4.59	0.000122131
Изходна стойност, n=25	3.27	
След проведена антиагрегантна терапия, n=16	3.105	0.141509
След проведена антиагрегантна терапия, n=25	4.02	

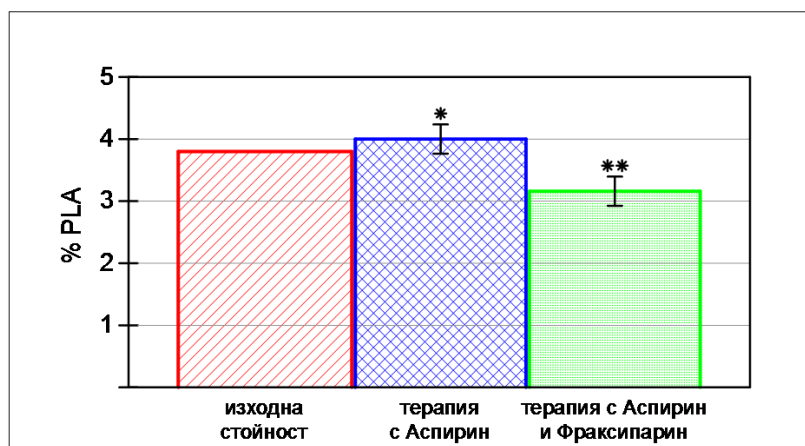
Сравняването на медианите на нивата на PLA в проценти, определени като изходна стойност и след провеждане на комбинирана антиагрегантна и антикоагулантна терапия по схема, описана в т. 1.2.4. (съответно 3,91 и 3,04) показва наличие на статистически достоверна разлика (Фиг. №12).



**Фиг. №12.** Нива на PLA в проценти, определени преди и след провеждане на комбинирана антиагрегантна и антикоагулантна терапия в групата бременни жени с анамнестични данни за репродуктивни неуспехи ( $n=41$ ). Резултатите са представени като медиана (хоризонтала) и стойностите на 25<sup>-ти</sup> и 75<sup>-ти</sup> перцентил (квадрат) и 5<sup>-ти</sup> и 95<sup>-ти</sup> перцентил (вертикала). Статистически значими различия –  $w=550.5$ ;  $p=0.00723843$ .

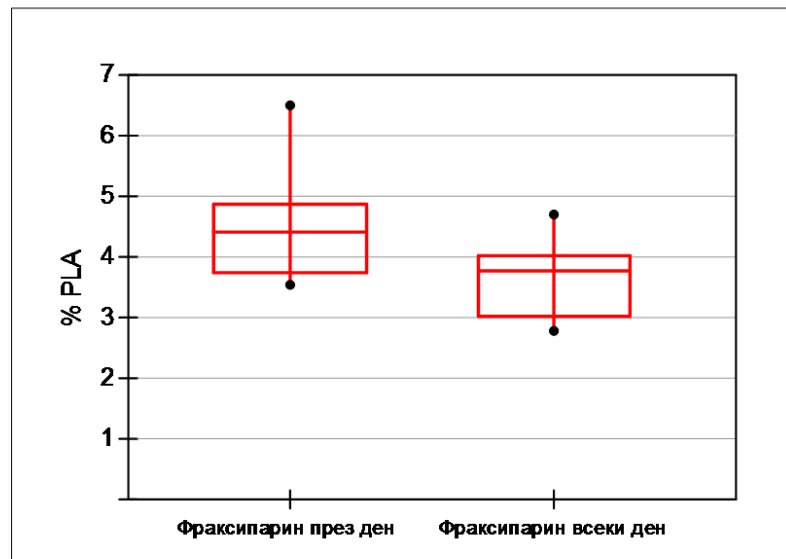
Приложихме дисперсионен анализ за да направим оценка на зависимостта между прилагането на антиагрегантна и антикоагулантна терапия и нивата на PLA в хода на бременността при жени с анамнестични данни за инфертилитет. Данните от анализа показват, че разликата между средните нива на PLA в проценти, определени като изходна стойност и след провеждане на антиагрегантна терапия е случайна и не е породена от проведената терапия с аспирин (Фиг. №13). Едновременно с това констатирахме, че разликата между средните нива на PLA в проценти, определени след проведена антиагрегантна терапия и определени след проведена комбинирана антиагрегантна и антикоагулантна терапия,

не е случайна и е породена от включването на фраксипарин в терапевтичната схема (Фиг. №13).



**Фиг. №13** Нива на PLA в проценти, определени в хода на провеждане на антиагрегантна и антикоагулантна терапия при бременни жени с анамнестични данни за инфертилитет. Резултатите са представени като средна стойност. Статистически значими различия – \* $F=0.45$ ;  $p=0.5054$ , \*\* $F=9.360091$ ;  $p=0.003017$ .

При 12 от пациентките в групата, поради персистиране на високи нива на PLA в проценти на фона на комбинираната антиагрегантна и антикоагулантна терапия, беше интензифицирана схемата на прилагане на Фраксипарин. Регистрирахме сигнификантно понижение в нивата на PLA (Фиг. №14).



**Фиг. №14.** Нива на PLA в проценти според схема на прилагане на Fraxiparin при бременни жени с анамнестични данни за инфертилитет. Резултатите са представени като медиана (хоризонтала) и стойностите на 25<sup>-та</sup> и 75<sup>-та</sup> персентил (квадрат) и 5<sup>-та</sup> и 95<sup>-та</sup> персентил (вертикала). Статистически значими различия –  $w=33.0$ ;  $p=0.0260989$ .

### **5. 1. Обсъждане на резултатите от флоуцитометрично изследване на PLA при бременни жени с анамнестични данни за репродуктивни неуспехи, които към момента на изследване провеждат антиагрегантна и антикоагулантна терапия по схема**

Формирането на PLA се иницира при състояния, асоциирани с възпаление и ендотелна дисфункция, като последващото взаимодействие между двата типа клетки амплифицира процесите на възпаление и тромбоза. При пациенти с остър коронарен синдром е доказана ролята на PLA като терапевтичен таргет. Това ни даде основание да проследим промените в нивата на PLA при прилагане на антиагрегантна и антикоагулантна терапия в хода на бременността при жени с анамнестични данни за инфертилитет.

При проследяване нивата на PLA при отделни пациентки установихме, че приложението на аспирин 100 mg през ден в продължение на поне 4 седмици не повлиява експресията на изследвания маркер в хода на бременността и нейните усложнения. Нашите резултати са в съответствие с данните от проучванията на

*Rinder* и съавт., 1993 г., и *Chronos* и съавт., 1994 г., според които аспирият не инхибира активацията на единични тромбоцити. Ефектът на антитромботичната терапия върху нивата на PLA е широко проучен както при експериментални системи, така и в клинични условия. *Li N.* и съавт., 2003 г., съобщават, че приемът на аспирин не повлиява тромбоцитно-левкоцитното взаимодействие. В същото време, тези резултати влизат в противоречие с данните за отлична протекция от аспирин срещу заболяемост и смъртност, свързани с артериални тромбози при кардиоваскуларни заболявания. Причините за това несъответствие вероятно са множествени и комплексни. Антитромботичният ефект на аспирин включва механизми, различни от блокиране на активността на COX-1. Аспирият повлиява не само тромбоцитите, но също и други кръвни клетки и клетки на съдовата стена.

Сигнификантна редукция в нивата на PLA при пациентки с инфертилитет наблюдавахме на фона на терапията с Fraxiparin, приложен в комбинация с Aspirin protect. Блокиращият ефект на нискомолекулярните хепарини (LMWH) върху тромбоцитно-левкоцитното взаимодействие е описан и от *Maugeri* и съавт., 2005 г., и *Maugeri* и съавт., 2007 г. Обсъждат се различни механизми на действие на хепариновите деривати, свързани с понижаване на нивата на PLA. Според едни автори, LMWH повлияват тромбоцитната функция, което се изразява в понижена експресия на P-селектин и намалено свързване към фибриноген. На следващ етап тези промени обуславят нарушаване на вторичната активация на левкоцитите. Въз основа на наблюдаваната зависимост между характеристиката и степента на сулфатиране на различните препарати и тяхната селективна свързваща активност, други автори считат, че се касае за директно взаимодействие на медикаментите с P-селектин. В цитираните проучвания се посочва, че описаните ефекти са зависими от концентрацията, в която се прилага LMWH. При това, в експериментални системи, където са използвани промити левкоцити, *N. Maugeri* и съавт., 2007 г., показват, че активирането на полиморфонуклеарни левкоцити от пречистен P-селектин е редуцирано пропорционално на повишението на концентрациите на приложения LMWH. Тези данни дават обяснение на наблюдаваната от нас редукция на PLA след интензифициране на схемата на

приложение на Fraxiparin и липса на промяна в нивата на PLA на фона на базово назначената терапия при 16 от пациентките в групата.

**В заключение,** на този етап от нашето проучване установихме, че нивата на смесените клетъчни агрегати се променят при прилагане на антикоагулантна терапия с LMWH. Това показва, че чрез техните противовъзпалителни свойства, LMWH изявяват допълнителен антитромботичен ефект с оглед на доказаната роля на възпалението при реализиране на тромботичните процеси. Провеждането на терапия с нискомолекулярен хепарин или комбинирана терапия нискомолекулярен хепарин и аспирин благоприятства реализирането на успешна бременност. PLA са подходящ показател за мониториране ефективността на антитромботичната терапия при жени с инфертилитет.

## ОБОБЩЕНИЕ

За реализиране целта на нашето проучване, трябваше да модифицираме и внедрим флоуцитометричен метод за определяне нива на PLA. Методът достоверно отразява формирането на PLA *in vivo* и дава възможност за обективизиране на получените резултати. В допълнение, важно е изработването на изходни контролни данни за проследения показател.

Чрез модифицирания от нас флоуцитометричен тест изследвахме ролята на PLA, ранен и ключов фактор за формиране на микро- и макротромбози, при жени с репродуктивни неуспехи. Доказахме повишени нива на тези агрегати при наблюдаваните пациентки, което вероятно има отношение към патогенезата на инфертилитета. В това проучване показахме, че съществува субгрупа от пациенти с инфертилитет, които са в перманентно протромботично състояние, дори извън бременността. Наличието на PLA може да се разглежда като хронично нарушение, сравнимо с придобитата тромбофилия, което се манифестира клинично по време на бременност.

Според нас, методът е високо чувствителен, информативен, с възможност за прилагане в ежедневната клинично-имунологична практика. Изследването на нивата на PLA би било важен елемент в комплексния подход към пациентките с инфертилитет. Чрез определяне на този показател преди настъпване на бременност, клиницистите биха могли да получат бърза и достоверна информация относно протромботичната нагласа на своята пациентка и да преценят необходимостта от допълнителни изследвания за прецизно диагностициране на състоянието, както и да определят най-подходящата профилактична или терапевтична схема. В хода на бременността, динамичното проследяване на нивата на PLA има прогностична стойност – повишените нива на PLA индицират настъпване на остро тромботично събитие. Едновременно с това, PLA са подходящ показател за мониториране ефективността на анти тромботичната терапия при жени с инфертилитет.

В заключение, би могло да се обобщи, че с проведеното проучване и последващ анализ на резултатите изпълнихме основната цел на дисертационния труд, а именно, направихме

оценка на участието на PLA в патогенезата на репродуктивните неуспехи, асоциирани с тромбофилия. Считаме, че повишените нива на PLA при пациентките отразяват наличието на субпопулация от активирани тромбоцити, които експресират висок брой адхезионни молекули и са в повишена готовност да се свържат както с левкоцити, така и с други тромбоцити и ендотелни клетки, изпълнявайки функцията си в процеса на тромбообразуване. Последващото адхезивното взаимодействие между тромбоцити и левкоцити модулира активността на двата типа клетки посредством промяна във вътреклетъчната сигнализация и създаване на биохимична кооперация чрез секреция на цитокини, реактивни кислородни радикали, растежни фактори, фактори на коагулацията, матрикс-металопроотеинази, които са елементи на тромботично-възпалителните реакции, ангажиращи включително плацентарните съдове. Предложеният флоуцитометричен метод за определяне нива на PLA и изработените референтни граници имат информативна стойност за идентифициране на жени, рискови за възникване на неблагоприятен изход на бременността.



## ИЗВОДИ

На база получените резултати и анализа на литературните данни могат да се направят следните изводи:

1. Модифицираният и внедрен флоуцитометричен метод за определяне нива на PLA дава възможност за бърз и високо информативен анализ на протромботичната нагласа при изследваните пациенти.

2. Флоуцитометричният анализ на PLA е подходящ за скрининг на рискови за развитие на тромботично събитие жени, които планират бременност.

3. Информативността на флоуцитометричния анализ на PLA по отношение прогнозата на бременността се повишава при съпоставяне на получените данните с данните от изследването на тромбофилични фактори.

4. Повишаването на нивата на PLA в хода на бременността е неблагоприятен фактор по отношение протичането на бременността.

5. PLA са подходящ показател за проследяване ефективността и корекция на анти тромботичната терапия при бременни жени с анамнестични данни за инфертилитет.

## **ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

### **Приноси с оригинален характер**

1. Модифициран е и внедрен в ежедневната клинично-лабораторна дейност флоуцитометричен метод за определяне на нива на тромбоцитно-левкоцитни агрегати в цяла кръв. Методът е прецизен, високо специфичен и достъпен за рутинно приложение във флоуцитометрична лаборатория.

2. Изработени са референтни стойности за PLA в цяла кръв за здрави, небременни жени от българската популация.

3. За първи път у нас е направено флоуцитометрично проучване на нива на тромбоцитно-левкоцитни агрегати в хода на нормална бременност. Предложени са референтни стойности на PLA за българската популация жени по време на нормалната бременност.

4. Предложен е метод за идентифициране на рискови за развитие на тромботично събитие бременни жени чрез флоуцитометрично определяне нива на тромбоцитно-левкоцитни агрегати.

5. За първи път у нас е направено флоуцитометрично проучване на нива на тромбоцитно-левкоцитни агрегати при жени с инфертилитет, както в периодите между бременностите, така и в хода на бременността.

6. За първи път у нас е извършен анализ на влиянието на носителството на вродени и/или придобити фактори за тромбофилия (генни мутации, асоциирани с тромбофилия и антифосфолипидни антитела) върху нивата на PLA преди и по време на бременност.

7. Предложен е метод за мониториране ефективността на антиромботичната терапия при жени с инфертилитет, чрез флоуцитометрично определяне нива на тромбоцитно-левкоцитни агрегати.

## **Приноси с потвърдителен характер**

1. Потвърдена е високата чувствителност на флоуцитометричния метод за определяне на нива на PLA.
2. Потвърдено е влиянието на Aspirin и LMWH върху нивата на PLA.
3. Потвърдена е прогностичната стойност на повишената тромбоцитна активация, по отношение развитието на ПЕ, което е изключително важно предимство за специалиста акушер-гинеколог с оглед предпазване от развитието на усложнения.

## ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### Публикации в научния печат:

1. **Велева Г**, Ц Луканов, П Петрова, Е Конова. Антитиреоидни антитела при жени с инфертилитет и субклиничен хипотиреоидизъм. *Годишник на БАКИ* 2007, 1, 2008, с. 69-74.

2. Луканов Ц, С Тишева, Л Терзиев, **Г Велева**, Н Станчева, А Велкова, Е Конова. Флоуцитометрично изследване на тромбоцити при пациенти с остър коронарен синдром. *Съвременна медицина*, LIX, 2008, № 2, с. 60-67.

3. Луканов Ц, Е Конова, **Г Велева**. Флоуцитометрично изследване на тромбоцити – възможности и клиничко-диагностични приложения. *Medinfo*, VIII, 2008, № 4, с. 38-41.

4. **Велева Г**, Ц Луканов, А Емин, Е Конова. Флоуцитометрично определяне нива на тромбоцитно-левкоцитни агрегати при жени с инфертилитет и придобити тромбофилични фактори. *Trakia Journal of Sciences*, VI, 2008, № 2, pt. 2, p. 212–215.

5. Lukanov Tz, SI Bojinova, VS Popova, AI Emin, **GL Veleva**, SP Gecheva, EI Konova. Flow cytometric investigation of CD40-CD40 Ligand system in preeclampsia and normal pregnancy. *Clinical and Applied Thrombosis/Haemostasis*, 2010, Vol. 16, No. 3, 306-312, Impact Factor - 1.421

6. Lukanov Tz, SI Bojinova, AI Emin, **GL Veleva**, VS Popova, EI Konova. Upregulation of CD40-CD40 ligand system in pre-eclampsia. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, CV, 2009, № 3, p. 257-260. Impact factor – 1.228

7. **Велева Г**, Ц Луканов, К Ковачева, Е Конова. Нива на тромбоцитно-левкоцитни агрегати след терапия с аспирин при

пациентки с тромбофилия индуциран инфертилитет. *Годишник на БАКИ* 2008, 1, 2009, с. 72-81.

8. Lukanov Tz, **GL Veleva**, EI Konova, PD Ivanov, KS Kovacheva, DJ Stoykov. Levels of platelet-leukocyte aggregates in women with both thrombophilia and recurrent pregnancy loss. *Clinical and Applied Thrombosis/Haemostasis*, 2011;17; 181-187. Impact Factor: 1.421

### **Научни съобщения и доклади:**

#### **А. Научни прояви в страната**

1. **Велева Г**, Ц Луканов, П Петрова, Е Конова. Антитиреоидни антитела при жени с инфертилитет и субклиничен хипотиреоидизъм. *Аутоимунитет и щитовидна жлеза*: Национална конференция по клинична имунология Плевенски имунологични дни, Плевен, 27-29 апр. 2007: Сб. рез., с. 13.

2. **Велева Г**, Ц Луканов, Е Конова, П Петрова. Флоуцитометрично определяне на тромбоцитно-левкоцитни агрегати при жени с инфертилитет и придобити тромбофилични фактори. *Юбилейна научна конференция*, Стара Загора, 27-29 септ. 2007, с. 22.

#### **Б. Научни прояви с международно участие**

3. **Велева Г**, Ц Луканов, Е Конова, П Петрова. Роля на тромбоцитно-левкоцитните агрегати като маркер за тромбофилия при жени с инфертилитет – флоуцитометричен анализ. [Осми] VIII Национален конгрес по клинична и трансфузионна хематология (с международно участие), Варна, 26–29 септ. 2007: Сб. рез., с. 74.

4. **Велева Г**, Ц Луканов, К Ковачева, Е Конова. Флоуцитометричен анализ на тромбоцитно-левкоцитни агрегати – значение при тромбофилични фактори и бременност. [Девети] IX

Национален конгрес по стерилитет, контрацепция, хормонозаместителна терапия и гинекологична ендоскопия с международно участие, Варна, 11-14 апр. 2008.

5. **Veleva G**, Tz Lukanov, K Kovacheva, P Ivanov, E Konova. Influence of the common prothrombotic factors on level of platelet-leukocyte aggregates in patients with infertility. [*Sixth*] VI International medical scientific conference for students and young doctors, Pleven, Bulgaria, 15-18 Oct. 2008: Abstracts book, p. 35.

6. **Veleva G**, Tz Lukanov, K Kovacheva, E Konova. Platelet-Leukocyte aggregates are not inhibited by aspirin in patients with both infertility and thrombophilia. [*Third*] III National congress of Immunology with international participation, Varna, Bulgaria, 8-11 May 2008: Abstracts book, p. 46.

#### **В. Научни прояви в чужбина**

7. **Veleva G**, Tz Lukanov, E Konova, P Petrova. Prevention of Platelet-Leukocyte interaction – significance of low molecular weight heparin for the therapy of patients with both infertility and thrombophilia. [*Fifth*] V Balkan Congress of Immunology, Ohrid, Republic of Macedonia, 1-3 June 2008: Abstracts book, p.33.