



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН

ФАКУЛТЕТ ФАРМАЦИЯ

---

Катедра „Химия и Биохимия“

**Доц. Регина Семьоновна Комса-Пенкова**

**Нов поглед върху ролята на генетичните и негенетични рискови фактори в патогенезата на тромботични инциденти при пациенти с венозен тромбоемболизъм и репродуктивни проблеми**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

**ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА НАУЧНА СТЕПЕН**

**„ДОКТОР НА НАУКИТЕ“**

*Официални рецензенти:*

**Проф. Диана Иванова, д.б.н.**

**Проф. Алексей Савов, д.б.н.**

**Проф. д-р Татяна Влайкова, д.б.**

Дисертацията е написана на 444 стандартни машинописни страници и е онагледена с 143 таблици и 120 фигури. Използвани са 856 литературни източника.

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

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 04.09.2017г. от 13.00ч. в зала „Амброаз Парев“, ТЕЛЕЦ, МУ–Плевен, гр. Плевен.

Материалите по защитата са предоставени на разположение на сайта на МУ–Плевен, [www.mu-pleven.bg](http://www.mu-pleven.bg)

## СЪДЪРЖАНИЕ

1. ВЪВЕДЕНИЕ .....	5
2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ .....	8
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....	9
4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	
Значение на носителството на полиморфизъм rs5918 (C) в гена ITGB3 на GРПb/IIIa, 4G/5G в гена на PAI-1 и тромбофилични мутации FVL и FП20210G>A при пациенти с ДВТ .....	15
4.1. Значение на носителството на полиморфизъм rs5918 (C) в гена ITGB3 на GРПb/IIIa при пациенти с ДВТ .....	16
4.2. Значение на носителството на полиморфизъм 675 4G/5G (SND rs1799889(-) в гена на PAI-1 при пациенти с ДВТ.....	32
4.3. Значение на носителството на полиморфизъм FVL в гена на Фактор V при пациенти с ДВТ .....	49
4.4. Значение на носителството на полиморфизъм 20210 G>A ( rs1799963) в гена на протромбина - Фактор II при пациенти с ДВТ .....	69
4.5. Значение на носителството на тромбофилични полиморфизми/генетични варианти: A1/A2 (rs5918ITGB3) в гена на тромбоцитен гликопротеин Пb/IIIa, 4G/5G (rs1799889(-) в гена на PAI-1, Фактор V Лайден (rs6025) и FП 20210 G>A (rs1799963) в гена на протромбина и влияние на външни фактори при жени с репродуктивни неудачи, върху ранна проява и рекурентни инциденти .....	84
5. ОБСЪЖДАНЕ .....	100
6. ИЗВОДИ .....	111
7. ПРИНОСИ .....	115
8. ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....	117
9. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА ...	122

*„НА МОЯТА СЕСТРА  
ЗА ВДЪХНОВЕНИЕТО  
ДА ЖИВЕЯ И ДА ПВОРЯ“*

## ВЪВЕДЕНИЕ

21 век открива нова страница на молекулярно-генетични изследвания и използването им в медицина. Изследване на патофизиологичните процеси на молекулно ниво и проучване на специфични генетични маркери позволява ранното откриване на заболяване и ранна интервенция, адекватно проследяване, както и разработване на иновативни специфични терапии.

Венозна тромбоза е социално значимо заболяване с относително висока честота и тежки усложнения. Венозните тромбози са третата по важност причина за остро сърдечно-съдово заболяване след коронарната болест на сърцето и мозъчно-съдовите заболявания.

Честота на ВТЕ е около 1.5 на 1 000 души, като значително се променя с възрастта. При пациенти под 40 години, честотата на ВТЕ е 1 на 10000, а при тези над 45 години е от 5–6 на 1000 и е 1 на 100 при пациенти над 80 години. Тъй като не малка част от венозните тромбози остават не диагностицирани, истинската им честота на практика е неизвестна.

Модерната представа за ВТЕ е - мултифакторно състояние, включващо генетични и негенетични рискови фактори в етиологията си. Значението на генетичните фактори е видно от фамилната анамнеза на част от пациентите, сочеща че малкия процент на носителство на генетичните фактори е значително по-висок при пациенти с ВТЕ. Генетичните фактори включват фактор V Leiden (6%), протромбин (20210G>A) (5-10%), дефект на MTHFR (697C>T), дефицит на протеин С (2.5-6%) и протеин S (1.3-5%), дефицит на антитромбин (0.5-7,5 %). Обсъжда се значението на носителството на полиморфизъм PLA1/A2 в гена за GPIIb/IIIa и 4G/5G в гена на PAI-1. От не генетичните фактори са важни (постоянни) фактори като възраст, пол и (променливи) различни клинични състояния като хирургични интервенции, неоплазми, мозъчен инсулт, застойна сърдечна недостатъчност, ХОББ, варикозни вени, нефрозен синдром, хронични заболявания, бременност, наличие на

антифосфолипидни антитела и самото хоспитализиране. ВТЕ се смята за “болестта на лежащи и наскоро хоспитализирани пациенти”. Начинът на живот също така има принос за развитието на ВТЕ. Факторите като обездвижване, затлъстяване, използване на орални контрацептиви и хормоно-заместителна терапия, тютюнопушенето повлияват честота на ВТЕ и ДВТ в частност.

Взаимодействия между рисковите фактори под форма на носителство на няколко генетични и/или генетични с други предразполагащи фактори увеличават риска. Носителството на генетичните фактори също изостря риска от ВТЕ по време на бременност, носителството на най-малко една тромботична мутация се свързва с увеличен с около 20% до 50% риск за ВТЕ по време на бременност. Акушерската анамнеза като цяло е също така един от предполагаеми рискови фактори за ВТЕ от една страна, а от друга страна носителството на тромботични мутации се свързва с увеличен риск от репродуктивни проблеми и спонтанни загуби на плода.

Физиологичните промени, които настъпват по време на бременността синергично създават хиперкоагулационно състояние. В хемостазната система увеличава се активността на коагулационни фактори и това се счита за защитен механизъм за предотвратяване на прекомерната загуба на кръв.

Редица проучванията са показали връзка между тромбофилия и неблагоприятен изход на бременността като отлепване на плацентата, раждане на мъртво дете, прееклампсия и загуби на плода.

Все още има пропуски в познанията ни за много физиологични и патологични процеси свързани с репродуктивно здраве. Клинични ситуации като спонтанен аборт, мисед аборт и мъртво раждане, остават до голяма степен идиопатични. Предполага се, че наличието на тромбофилия увеличава хиперкоагулацията причинявайки микротромби които нарушават майчино-плацентарна перфузия. Има и доказателства, че нежелания изход на бременността не може да бъде единствено

второстепенен на тромботично състояние. Обаче механизмите, чрез които неблагоприятни последици на бременността са повлияни от наследствена тромбофилия не са напълно изяснени.

Промяна в нуклеотидната последователност на гените кодиращи тромбофилични фактори е свързана с промяната на конформацията и съответно намалена или липсваща активност на съответния фактор (например PLA1/A2 ), или промяна в нивото на синтез на определен фактор (например FII20210G>A), а от там и на количество на протеина. От което следва че тромботичните мутации, променяйки хода на процеса (активирането и резолюцията) нарушават синхронно взаимодействие на активиращите молекули със сигналинга на взаимодействащите клетки, тромбоцити, ендотелни клетки, и др. Това води до началните етапи в развитието на патология, допълнително усложнена от други рискови фактори.

Тези факти и обстоятелства ни мотивираха за разработването на този труд върху съвременните клинични данни за влиянието на генетични и негенетични фактори върху тромботична патология при пациенти с венозен тромбоемболизъм и репродуктивни проблеми с оглед проучване на риска на самите фактори, взаимодействията им значението в патогенезата на тромботични инциденти. Изследването на промените в наномеханичните характеристики на тромбоцити и на тромбоцитни микрочастици с методите АСМ и **флоуцитометрия** при носители на генетични варианти на тромбофилични фактори: rs5918ITGB3, rs1799963, rs1799889(-), rs6025, и анализиране на участието/приноса за активирането на тромбоцити и развитието на тромбоза при пациенти с тромботични инциденти и репродуктивни проблеми би допринесло за разбирането на природата на връзката между тромбофиличните фактори и механизми на тези патологични процеси.

## **2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ**

### **ЦЕЛ**

Да се проучи приноса на генетичните и негенетични рискови фактори в патогенезата на тромботични инциденти при пациенти с венозен тромбоемболизъм и репродуктивни проблеми

- 1. Да се проучи честотата на носителството на генните полиморфизми A1/A2 в гена на тромбоцитен гликопротеин  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , 4G/5G в гена на плазминоген активатор инхибитор-1, Factor V Leiden и FII20210G>A в селектирана група пациенти с венозен тромбоемболизъм (ВТЕ) и репродуктивни проблеми (РП).**
- 2. Да се проучи приноса на носителството на генетичните фактори PLA1/A2, PAI-1 4G/5G, FVL и FII20210G>A за по-ранна проява на венозните тромбози, рекурентност на инцидентите и намаляване интервала между епизодите, изследвани в селектирана група пациенти с ВТЕ.**
- 3. Да се определи значимостта на носителство на генетични варианти PLA1/A2, PAI-1 4G/5G, FVL и FII20210G>A за загуби на плода в определен срок на бременността (времеви аспект) при пациенти с ранни и повтарящи се загуби на плода.**
- 4. Да се проучи приноса на негенетичните фактори (пол, възраст, тютюнопушенето, телесно тегло, хормонзамстителна терапия, и др.) в комбинация с генетични фактори (носителство на PLA1/A2, PAI-1 4G/5G, FVL и FII20210G>A) за допълнително покачване на риска за тромбози, вероятността за по-ранна проява на ДВТ, рекурентност на инцидентите и намаляване интервала между епизодите, изследвани в селектирана група пациенти с ВТЕ и РП.**
- 5. Да се изследват промените в наномеханичните характеристики на тромбоцити и на микрочастици, изолирани от пациенти с ВТЕ и РП по време на инцидента, и активирането им при носители на генетични фактори (PLA1/A2, PAI-1 4G/5G, FVL и FII20210G>A),**



**проучени чрез** метода на АСМ и анализ на участието им в процеса на тромбообразуване.

6. Да се изследват **промените в активирането на тромбоцитите, изолирани от пациенти с ВТЕ и РП** - носители на генетични фактори (PLA1/A2, PAI-1 4G/5G, FVL и FII20210G>A) и да се анализира участието им в процеса на тромбообразуване, като се прилага метода на **флоуцитометрия**.

### **3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

#### **3.1. Изследвани групи индивиди. Подбор и клинични критерии за включване в изследването**

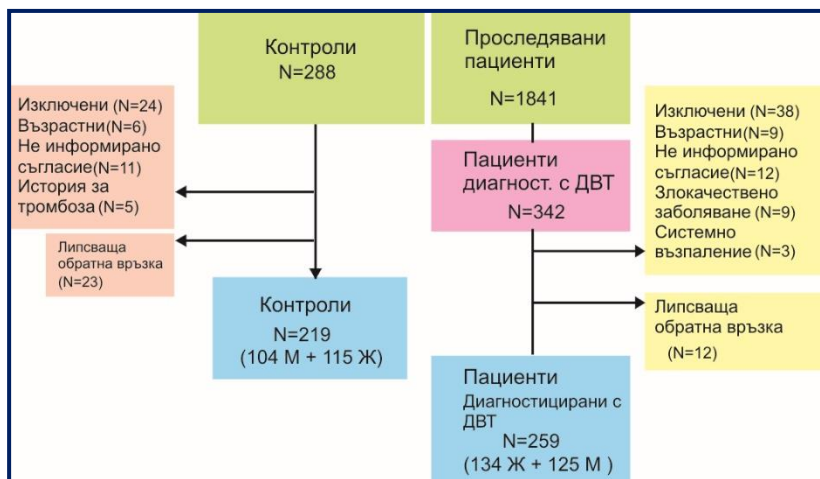
##### **3.1.1. Подбор и клинични критерии за включване в изследването на пациенти с ВТЕ (ДВТ и БТЕ)**

В това проспективно кохортно проучване са оценени последователни инциденти на ДВТ при пациенти от европейската раса, на възраст над 18 години, провеждащи стационарно лечение в клиниката по хирургия и пулмология в Университетската болница в Плевен, България.

Общо от 311 селектирани пациенти в проучването са включени 259 пациенти (125 мъже и 134 жени) с един или повече инциденти на дълбока венозна тромбоза (ДВТ) на проксималните вените. Пациентите с ДВТ (342) бяха подбрани от 1841 последователно приетите на лечение в клиниките по хирургия и пулмология (Фигура 1). Критерият за избор бе историята на ДВТ със или без последващ епизод на белодробна емболия. Средна възраст на пациентите бе  $48.8 \pm 15.05$  години, във възрастов диапазон от 18 до 75.

Инцидентите на ДВТ са диагностицирани с компресия и Доплер ехография и с изследване на D-димер в съответствие с критериите, установени от клинични практики и препоръки в съответствие с клинични ръководства.

В изследването са включени пациенти с диагноза ДВТ на вена поплитеа, вена феморалис и такива с илио-феморална венозна тромбоза.



**Фигура 1. От общо 1841 пациенти приети в двете клиники за този период 342 пациенти са диагностицирани с ДВТ. Тези със злокачествени или миелопролиферативни заболявания (n = 9, 2.6%), системно възпаление (n = 3, 0.88%), напреднала възраст (> 80 години, n =**

**9, 2.6%), 38 пациенти са били изключени от изследваната група, на 12 липсва обратна връзка. Осемдесет и три пациента (24.3 %) и шестдесет и девет (23.9%) от контролите са били изключени от проучването по различни причини.**

В изследването бяха включени пациенти, които освен ДВТ на долните крайници бяха с по-рядка локализация на ДВТ: на горни крайници, вена кава, вена лиеналис и др. Пациенти с клинични признаци на белодробна емболия (БЕ) допълнително са диагностицирани с СТ белодробна ангиография и са лекувани в Университетска пулмологична клиника

При пациентите с ВТЕ бяха установени инциденти с локализация на тромбоза и в артериалната система – мозъчен инсулт, инфаркт на миокарда. Специфична анкета е използвана за индивидуални интервюта с пациенти с тромботична изява за определяне на независими и външни рискови фактори.

Тъй като възрастта се явява самостоятелен рисков фактор за развитие на венозната тромбоза/емболия, както и честата коморбидност при възрастни пациенти в проучването не са включени пациенти над 75 годишна възраст. Нито една от пациентките в трите групи не е била бременна в момента на настъпване на венозната тромбоза/емболия. В изследването не са включени родили жени в пуерперален период (30 дни след раждането). Бременността и послеродовия период са оценени като предразполагащ фактор фактор при предходни инциденти на ВТЕ (при пациенти с повторни инциденти на ДВТ и/или БТЕ).

Други провокиращи фактори взети под внимание при оценката на причините за възникване на ВТЕ са: оперативна намеса (до три месеца преди инцидента на ВТЕ), травма (до три седмици от инцидента), имобилизация (протекла поне две седмици и не по-рано от 30 дни от инцидента), прием на ОК или ХЗТ, малигнен процес или миело-пролиферативно заболяване.

Тютюнопушенето до 10-15 цигари дневно е един от факторите, който се определя като фактор с принос за развитие на венозната тромбоза/емболия, поради което тези пациенти бяха изследвани допълнително за влияние на този фактор, а останалите бяха възприети като такива без придружаващ рисков фактор.

Пациентите са проследявани във времето от 0.5-10 години (средно 5.1). Пациентите с висок риск и с повтарящи се събития по време на проследяването са проверени с ултразвуков доплер за венозен статус. Пациентите нямаха кръвно-родствена връзка по между си.

### **3.1.2. Подбор и критерии за включване в изследването на здрави индивиди за формирането на контролната група за изследването на пациенти с ВТЕ (ДВТ и БТЕ)**

Контролната група за изследване на пациенти с ДВТ бе съставена от 219 случайно подбрани здрави индивиди (115 жени и 104 мъже, на възраст  $48.8 \pm 15.05$ ) от европейската раса, селектирани от 288 доброволци без анамнеза за ВТЕ, проверени и потвърдена чрез клинично изследване в Катедрата по хирургия. Фамилната анамнеза за ДВТ и ВТЕ е определена от интервюта.

Пациентите и контролната група са с подобни демографски данни и от един и същ географски район. Протоколът на проучването е одобрен от Комисията по етика на Медицински университет-Плевен. Всички включени лица са подписали писмено информирано съгласие за изследването.

### **3.1.3. Пациенти с репродуктивни проблеми**

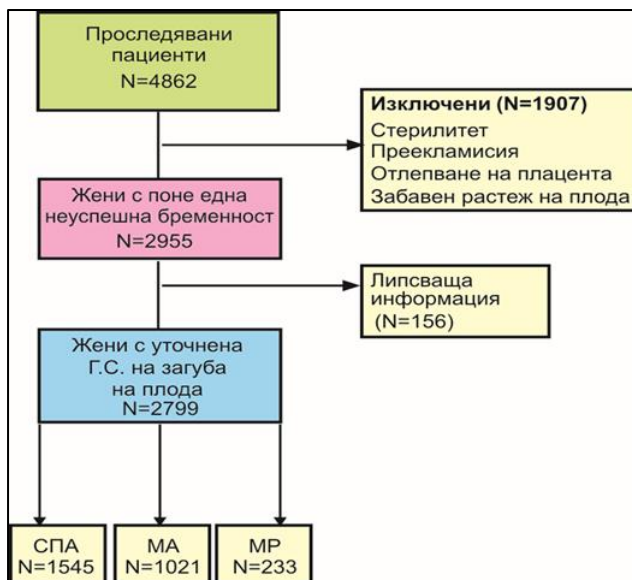
#### ***3.1.3.1. Подбор и клинични критерии за включване в изследването на пациенти с репродуктивни неудачи***

Проучването е ретроспективно и беше извършено върху 4862 жени, насочени към Център за репродуктивно здраве към УМБАЛ МУ Плевен и КИРМ, за изследвания и консултации, по повод неуспешни бременности и загуба на плода.

При електиране на подходящите жени са изключени редица акушерски и ендокринни нарушения като: възпалителни изменения във вътрешните полови органи, носителство на балансиран мутации – неприявили се в ранен срок на бременността, ендокринни смущения. др. От общо 4862 насочени и изследвани жени (18 до 45 години) 2955 жени бяха с поне една неуспешна бременност; 1545 бяха диагностицирани със спонтанен аборт, 1021 с мисед аборт и 233 с мъртво раждане (след 20 гестационна седмица). Нито една от жените нямаше история за предишни тромботични инциденти. МА са били доказвани с ехографска находка или с патоанатомичен анализ в началните гестационни седмици.

В изследването са включени жени с първичен инфетилитет без живородени деца, а също така и вторичен. Обаче основните статистически анализи са направени само с пациенти със загуби на плода.

Селекцията бе направена на базата на анамнезата и специално разработени анкетни карти. На всички жени, както и на техните партньори беше проведен цитогенетичен анализ за изключване на носителство на балансиран хромозомни изменения. Случаите с установени хромозомни изменения (56 бр.) бяха изключени от проучването



**Фигура 2. Подбор и клинични критерии за включване в изследването на пациенти с репродуктивни неудачи**

### 3.1.4.2. Контролна група

Беше оформена втора контролна група на млади жени на средна възраст ( $32.9 \pm 7.871$ ). Групата бе съставена от здрави жени с едно или повече живородени деца, които не са имали тромботични усложнения по време на бременността и раждането както и след него.

### 3.2. Вземане на биологичен материал

На всички пациенти и контролна група лица е взета веноза кръв 7 мл във вакутейнер съдържащ ЕДТА (0,084 ml, 15% EDTA, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany).

### 3.3. ДНК анализ. Методи за изолиране и оценка на качеството и количеството на изолираната ДНК. Амплификация и анализ

#### 3.3.1. Принцип на изолиране на ДНК по метода на солевата екстракция

Изолирането на ДНК от венозна кръв протича в няколко последователни етапа, целящи лизис на ядрените кръвните клетки и премахване на белтъците от ДНК молекула участващи в изграждането на компактната и структура.

#### 3.4. Директен диагностичен ДНК анализ. Потвърждаващи методи за откриване на известни мутации

В настоящата разработка са използвани Рестрикционен анализ и

Алел – специфичен PCR за доказване/отхвърляне на наличието на мутация.

### **3.5. Диференциална сканираща калориметрия (ДСК).**

Диференциалната сканираща калориметрия (ДСК) е високо чувствителна техника за изследване на термостабилността на биомолекули и комплексни биологични системи. Използваме я за регистрация на денатурационни преходи.

### **3.6. Флоу-цитометрия.**

Флоуцитометрия е метод, за измерване на клетъчни характеристики като: размер, обем, вискозитет, коефициент на отражение, съдържание на ДНК, РНК, протеини и ензими в тромбоцити.

### **3.7. Атомно Силова Микроскопия (АСМ).**

Този вид сканиращ микроскоп с висока разделителна способност е един от най-съвременните инструменти за изследване топологията и свойствата на материята на атомно ниво. За изследване на еластичните свойства на пробата се използва модула на Young (E).

### **3.8. Статистически методи и софтуерни продукти използвани при анализа на резултатите от проучването**

Обработка на данните бе осъществена с пакет от приложни програми за статистически анализи, интерпретиране и представяне на данните SPSS 21.0 (*SPSS Inc., IBM SPSS Statistics*)

Статистически анализ е извършен с помощта на SPSS 21.0 за Windows (SPSS Inc.Chicago,IL,USA). Непрекъснатите променливи бяха изразени със средните стойности  $\pm$  стандартно отклонение. Категорийните променливи са изразени с проценти.

Разликите между непрекъснатите променливи бяха анализирани с помощта на Т-тест на Стюдънт, докато тези между категорийните променливи са анализирани с помощта на ( $\chi^2$ ) теста  $\chi$ -квадрат.

Алелните честоти на изследваните полиморфизми са изчислени с помощта на метода генно броене. Hardy-Weinberg равновесието за разпределението на генотиповете е тествано чрез ( $\chi^2$ ) теста.

Генна честота е изчислена от с метода на крос-табулация,  $\chi^2$  оценките са изчислени като  $\chi^2$  -квадрат на Пиърсън и значимост като точен тест на Фишер. Оценки на риска са измерени като отношение на шансовете (OR) в 95% доверителни интервали със сигнификантно значение за цялата група от пациенти по пол в сравнение с контролите (с корекция за пол и възраст).

Кумулативната честота на първите и повтарящите се случаи на ВТЕ се оценява по метода на Kaplan-Meier, цензурирани по време на тромботични инциденти (единични и рекурнтни).

Анализът по Kaplan-Meier се използва за измерване на фракцията на пациенти, които са били носители на протромботична мутация и в сравнение с не-носители за вероятността за "времето за оцеляване" в очакване на първия инцидент на ВТЕ, както и следващия, рекурентен епизод. Интервалът от време е бил взет от медицинската документация и проследяване на данните. Cox-пропорционален модел за оценка на риска е използван за оценка на вероятността от риска за инцидент на ВТЕ, случил се в по-млада възраст, свързано с потенциални рискови фактори.

## **4. РЕЗУЛТАТИ**

**Значение на носителството на полиморфизъм rs5918 (C) в гена ITGB3 на GРЩб/Ща, 4G/5G в гена на PAI-1 и тромбофилични мутации FVL и FII29219G>A при пациенти с ДВТ**

### **4.0. Клинични параметри и фактори на начина на живот на пациенти с ДВТ**

Клиничните параметри и рискови фактори на изследваните 259 пациенти са представени в Таблица 1, отделно за пациенти от мъжки и женски пол.

Клиничната проява на ВТЕ зависи от комбинация на рискови фактори. Жените имат допълнителен риск, като скорошна бременност или инциденти, свързани с бременността (24.27%), приемали са орални контрацептиви или са били на хормонална терапия (7.69%).

**Таблица 1. Клинични параметри и фактори за начина на живот, в зависимост от пола (мъжки и женски).**

Клинични параметри, антропометрични и други фактори	Общо n (%)	Пациенти от мъжки пол n (%)	Пациенти от женски пол n (%)
Пациенти	259	125(48.26%)	134(51.74%)
Възраст (години)	48.8±15.05	47.11±14.97	49.22±15.06
Възраст на първи тромботичен инцидент	46.42±14.99	45.94±15.12	46.88±14.88
Диагноза за ДВТ	185 (84.4%)	92 (85.2%)	98 (84.1%)
Тромбофлебит / повърхностна тромбоза	36 (16.1%)	24 (22.2%)	12 (10.3%)
Белодробна емболия	35 (15.6%)	28 (25.90%)	7 (6.03%)
История на дълбока венозна тромбоза/белодробна емболия	70 (31.26%)	33 (30.55%)	37 (31.87%)
Операция	13.45%	14.80%	12.07%
Травма	14.73%	23.15%	7.76%
Имобилизация	13.07%	22.72%	5.10%
Затлъстяване	34.82%	37.03%	32.75%
ВМІ kg/m <sup>2</sup>	29.48	28.77	30.29
Тютюнопушене	38.46%	47.61%	28.03%
Хормонзаместителна терапия/орални контрацептиви			7.76%
Инциденти, свързани с бременността (жени)			21.47%.

#### **4.1. Значение на носителството на полиморфизъм rs5918 (C) в гена ITGB3 на GPIIb/IIIa при пациенти с ДВТ**

Честотата на носителството на rs5918 (C) полиморфизъм бе изчислена като сума от хомозиготното rs5918 (C)/PLA2 и хетерозиготно носителство на rs5918(C/T)/PLA2. Хомозиготното носителството PLA2 не бе намерено при контролите, и бе 2.87% при общо пациентите (Таблица 2). Хомозиготното носителството на rs5918 (C) е доста рядко в общата популация (около 1%).



Алелната честота съгласно Hardy-Weinberg бе изчислена както следва и е представена на Таблица 2.

**Таблица 2. Генотип и алелни честоти на rs5918 T> C (PLA1 / A2) полиморфизъм при пациенти и контроли.**

Алелни честоти (%)	rs5918(C)/PLA2	rs5918(T)/PLA1	P
Контроли жени	22 (10.81%)	194 (89.19%)	0.2386
Жени с ДВТ	44 (18.97%)	188 (81.03%)	0.4788
Контроли мъже	15(7.08%)	197 (92.9)	0.4331
Мъже с ДВТ	32 (14.81)	184 (85.19)	0.2961
Общо контроли	37 (8.64%)	391 (91.36)	0.1633
Общо пациенти	76 (16.96%)	372 (83.01%)	0.2459

Честотата на носителството на rs5918 (C) бе намерена значително по-висока при пациентите 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, но не и при пациенти от мъжки пол (Таблица 3). Изчисленият риск от инцидент на ДВТ бе по висок при млади жени, носителки (OR=3.117,  $\chi^2=7.393$ ,  $p=0.011$ ), но не и при мъжете от същата възрастова група.

Значително по-висок риск от повтарящ се инцидент се наблюдава при жените ( $\chi^2 = 3.634$ , OR = 2.581,  $p = 0.025$ ), и особено при младите жени ( $\chi^2 = 3.405$ , OR = 2.581,  $p=0.044$ ).

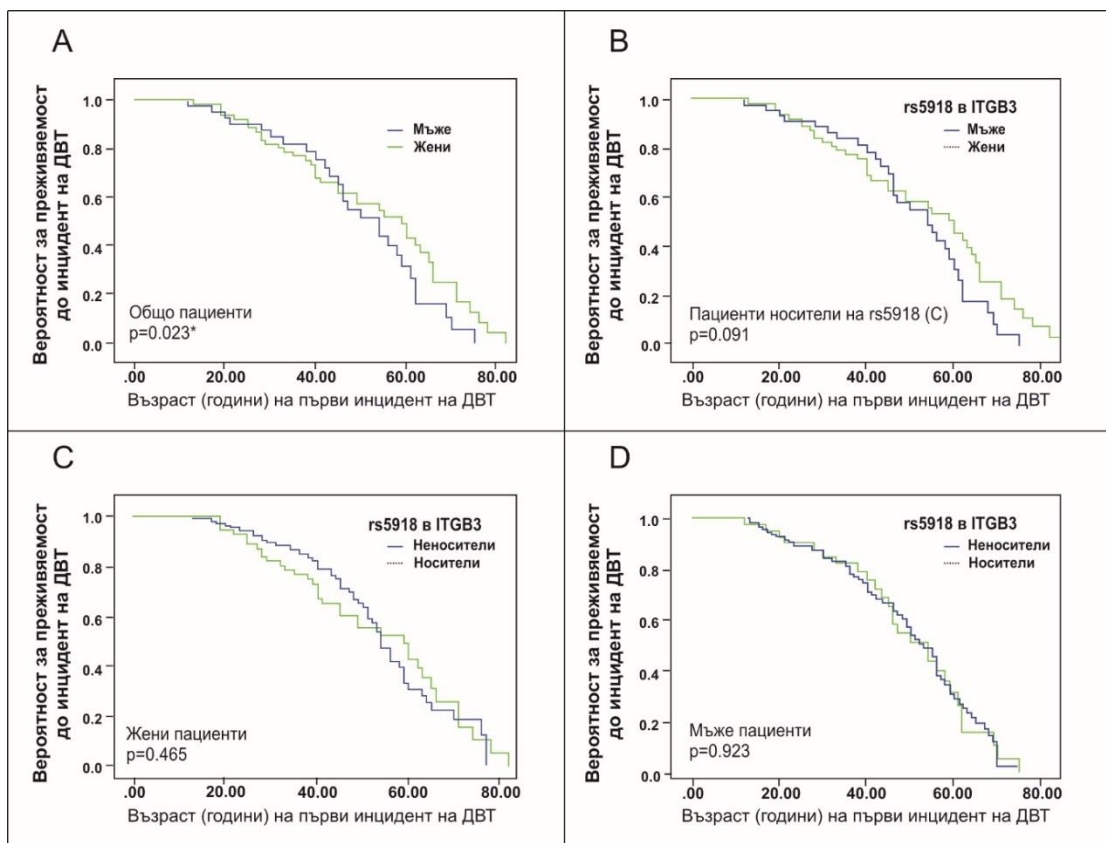
**Таблица 3. Средни стойности на носителство на PLA2, Pearson Chi-Squared, точен тест на Fisher, относителен риск и 95% конфиденциален интервал за носителството rs5918 при пациенти от мъжки и женски пол в сравнение с контролите.**

Статистически стойности PLA1/PLA2	Носителство при пациенти %	Носителство при контроли %	Pearson $\chi^2$	Fisher (p)	OR	95% Конфиденциален интервал
Жени	36.7	20.20	7.565	0.008*	2.289	1.260–4.160
Мъже	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
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

### 4.1.1. Анализ Kaplan-Meier за вероятността от инцидент на ДВТ

#### 4.1.1.1. Анализ Kaplan-Meier за вероятността за „преживяване“ преди инцидент на ДВТ при мъже и жени.

Чрез прилагане на подхода на Kaplan-Meier, ние анализирахме как честотата на носителството на този полиморфизъм е свързана с вероятността от тромботичен инцидент и неговата пенетрантност.



Фигура 1. Вероятността за преживяемост до инцидент на ДВТ при: А) мъжете и жените ( $\chi^2 = 5.190$ ,  $p = 0.023$ ), В) между носители и неносители на rs5918(С) в гена на ITGB3 ( $p=0.091$ ) С) жените носители и неносители на rs5918(С) в гена на ITGB3 ( $p=0.465$ ), D) мъжете носители и неносители на rs5918(С) в гена на ITGB3 ( $p=0.923$ )

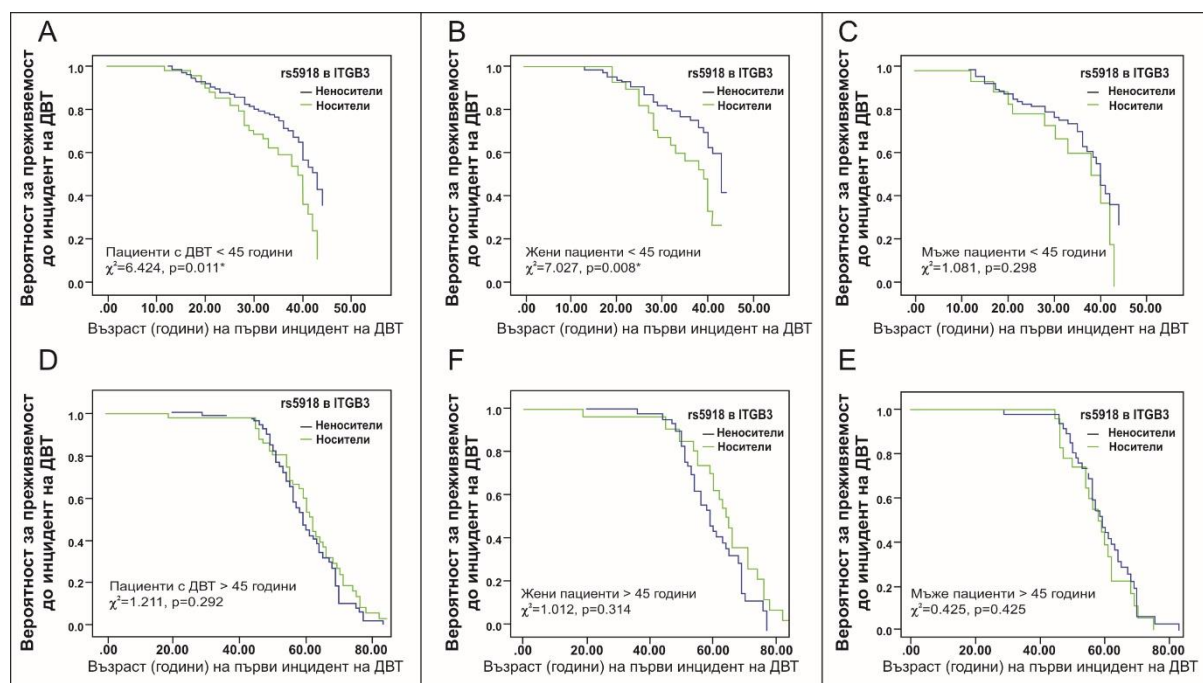
Предварителен многофакторен анализ идентифицира рисковите фактори: носителство на полиморфизъм, възраст, пол, затлъстяване и тютюнопушене като сигнификантни (значителни) или близо до значителните. Въз основа на тези резултати, пациентите бяха разделени на групи по пол и възраст и анализирани чрез метода на Kaplan-Meier за връзка между носителството с други фактори. В нашия случай, анализът на

Kaplan-Meier е използван за оценяване на „вероятно време за преживяване“ преди инцидент на ДВТ (Таблица 4, Фигура 1 и 2).

Значителната разлика между мъжете и жените, свързана с вероятността за по-ранно развитие на ДВТ е установена за всички пациенти ( $\chi^2 = 5.190$ ,  $p = 0.023$ ) Фигура 1 (А). Средната възраст за инцидент на ДВТ (50% вероятност) е подобна в групите мъже/жени за носители и неносители на полиморфизъм. Разликата в средната възраст за инцидент на ДВТ при пациентите и от двата пола, които са носители на rs5918 (С) полиморфизъм, не е значителна; вероятно поради установената с анализ на Breslow тенденция при млади пациенти, обратна на тази при пациентите в напреднала възраст.

#### 4.1.1.2. Анализ по Kaplan-Meier за вероятността от инцидент на ДВТ във възрастови подгрупи на пациенти под 45 години и над 45 години

Пациентите са изследвани в две възрастови подгрупи: под и над 45 години (данни на Breslow анализ).



**Фигура 2.** Вероятността за преживяемост до инцидента на ДВТ при пациенти под 45 години (А, В, С) и над 45 години (D, Е ,F) носители и неносители на rs5918(C) в гена на ITGB3: А) и D) Общо пациенти, Б) и F) жените, С) и Е) мъжете

Значителна разлика във вероятността за по-ранна проява на ДВТ бе намерена в общата група млади пациенти (под 45 години), носители на полиморфизъм rs5918(C) (37.86 г. срещу 34.9 г.;  $\chi^2$  6.424,  $p=0.011$ ).

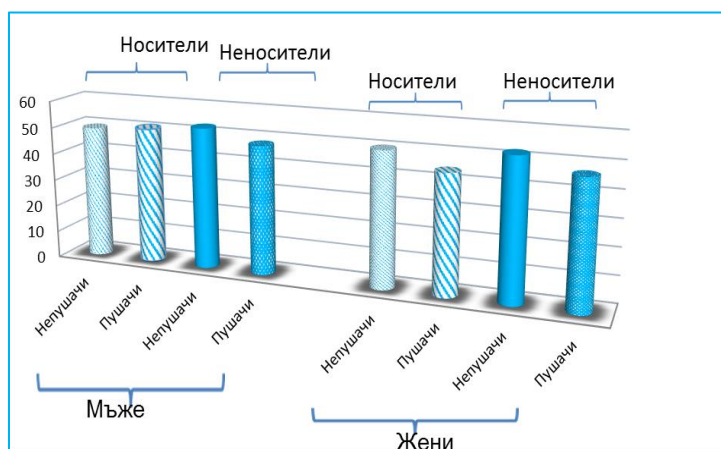
Намерена бе значителна разлика и между средните стойностите за преживяемостта до инцидент на ДВТ при млади жени под 45 години, носители и неносители на PLA2 (39.5 г. срещу 34.5 г.;  $\chi^2$  7.027,  $p=0.008$ ).

#### 4.1.2. Влиянието на тютюнопушенето върху риска за ДВТ инцидент при пациенти носители и неносители на rs5918 (C) полиморфизъм

##### 4.1.2.1. Влиянието на тютюнопушенето върху риска за първия ДВТ инцидент при пациенти носители и неносители на rs5918 (C) полиморфизъм

При жени с ДВТ, които са били пушачи, рискът от ДВТ инцидент е значително по-висок отколкото при непушачите ( $\chi^2 = 4.212$ , OR = 2.244,  $p=0.040$ ). При пушачи мъже, рискът от ДВТ не е значително по-висок, в сравнение с непушачите ( $\chi^2 = 1.646$ , OR = 1.941,  $p=0.200$ ).

Вероятността от по-ранен инцидент на ДВТ при жени, които са били пушачи, е значително по-висока в сравнение с непушачи ( $\chi^2=5.785$ ,  $p=0.016$ ) (Фигура 3). При пациенти от женски пол неносители на rs5918(C)/PLA2, вероятността за по-ранната изява е сигнификантна, докато при носители сигнификантността не е постигната.



Фигура 3. Средни стойности на 50% вероятност за възраст на инцидент на ДВТ, стандартна грешка, 95% конфиденциален интервал, Chi-квадрат и точен тест на Fisher (p) при мъже и жени, носители или неносители на rs5918(C), пушачи и непушачи.

#### ***4.1.2.2. Влиянието на тютюнопушенето върху риска за рекурентен ДВТ инцидент при пациенти носители и неносители на rs5918 (C) полиморфизъм***

При жени с ДВТ пушачи носители на rs5918 (C) полиморфизъм вероятността за по-кратък интервал преди повтарящ се епизод (по-ранна проява на повтарящ се инцидент) е значително по-висока ( $\chi^2=4.679$ ,  $p=0.031$ ), в сравнение с неносители ( $\chi^2 = 1.187$ ,  $p = 0.666$ ).

Подобна тенденция се наблюдава и при мъжете пушачи с ДВТ, носители на rs5918 (C). Вероятността за по-кратък интервал преди повтарящ се епизод ( $\chi^2 = 5.423$ ,  $p = 0.020$ ) е значително по-висока, в сравнение с тези които не са носители ( $\chi^2 = 1.350$ ,  $p = 0.245$ )

#### ***4.1.3. Влиянието на затлъстяването върху риска за ДВТ инцидент при пациенти, носители и неносители на rs5918 (C) полиморфизъм***

##### ***4.1.3.1. Влиянието на затлъстяването върху риска за първия ДВТ инцидент при пациенти, носители и неносители на rs5918 (C) полиморфизъм***

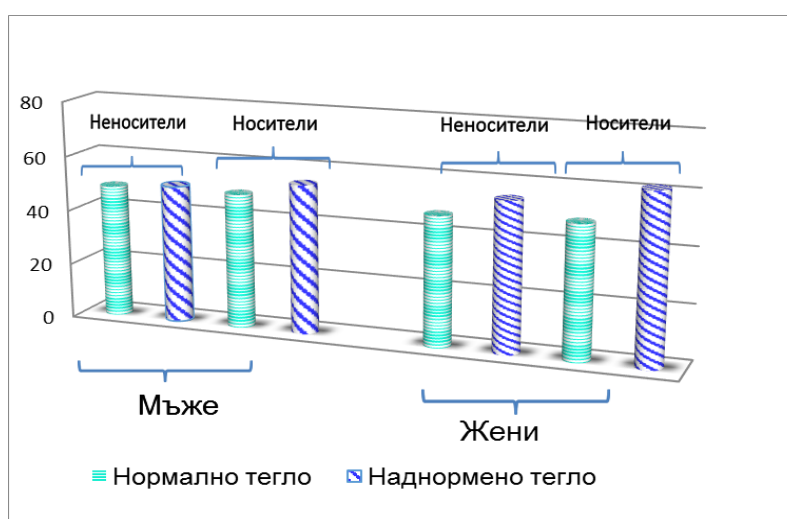
Приблизително 35% от пациентите са със затлъстяване и над 50% с наднормено тегло. При жени пациенти със затлъстяване, вероятността за ДВТ е по-висока и е с по-късна проява на събитието ( $\chi^2 = 5.197$ ,  $p = 0.023$ ) в сравнение с пациентите от женски пол, които са с нормално тегло. При мъже пациенти със затлъстяване, вероятността за ДВТ е по-висока, и е с по-късна проява на събитието ( $\chi^2 = 3.064$ ,  $p = 0.080$ ).

При жените носители на полиморфизма, ефектът е сходен ( $\chi^2=3.678$ ,  $p=0.046$ ) (Фиг.4, Таблица 4). Вероятността от инцидент на ДВТ е значително по-висока при по-млади жени със затлъстяване, носители на rs5918 (C) полиморфизъм, но е незначителна при по-възрастните жени ( $\chi^2=3.592$ ,  $p=0.058$ ;  $\chi^2=4.126$ ,  $p=0.177$ ). Не бе намерена разлика при пациенти от мъжки пол със затлъстяване.

**Таблица 4. Средни стойности, стандартно отклонение, 95% конфиденциален интервал, Chi-квадрат и точен тест на Fisher (p) за 50% вероятност за инцидент при жени и мъже с ДВТ, със затлъстяване и нормално тегло носители или неносители на rs5918 (C) полиморфизъм в ITGB3.**

Пол	rs5918/ PLA2	Наднормено тегло	Средна стойност	Стандартно отклонение	95% CI	$\chi^2$ *	Fisher's (p)*
Жени	0	0	47.234	2.384	42.562 - 51.906	2.091	0.148
		1	54.485	2.859	48.881 - 60.089		
	rs5918 (C)	0	48.46	3.687	41.233 - 55.688	3.678	0.046**
		1	61.7	7.398	47.200 - 76.200		
	Общо жени с ДВТ	0	49.629	1.904	45.897 - 53.361	5.197	0.023**
		1	51.883	3.409	45.202 - 58.565		
Мъже	0	0	48.519	2.798	43.035 - 54.003	0.058	0.809
		1	48.2	4.613	39.159 - 57.241		
	rs5918 (C)	0	49.091	6.077	37.179 - 61.003	0.56	0.454
		1	54.4	2.281	49.929 - 58.871		
	Общо мъже с ДВТ	0	48.422	2.37	43.776 - 53.067	0.384	0.535
		1	51.619	3.338	45.077 - 58.161		

\*  $\chi^2$  Log Rank Mantel-Cox, \*\* Сигнификантна стойност  $p < 0.05$ , 0=Нормално тегло; 1=Наднормено тегло

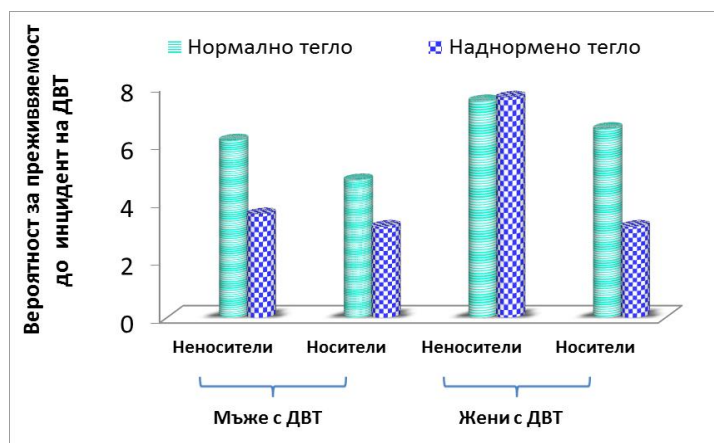


**Фигура 4. Средните стойности на преживяемост, стандартно отклонение и сигнификантност при пациенти със затлъстяване и наднормено тегло преди първи инцидент на ДВТ на пациенти, мъже и жени, носители и неносители на rs5918(C) в гена на ITGB3.**

#### **4.1.3.2. Влиянието на затлъстяването върху риска за рекурентен ДВТ инцидент при пациенти, носители и неносители на rs5918 (C) полиморфизъм**

Значително по-голяма бе вероятността от по-ранен повтарящ се инцидент при пациенти от мъжки пол със затлъстяване, общо ( $\chi^2 = 6.316$ ,

p=0.012) и при пациенти мъже, носители на rs5918 (C) полиморфизъм ( $\chi^2=5.722$ , p=0.017), (Таблица 5).



**Фигура 5.** Вероятност (средни стойности) на преживяемост, стандартно отклонение и сигнификантност при пациенти със затлъстяване и наднормено тегло за интервал до рекурентен инцидент на пациенти с ДВТ, мъже и жени, носители и неносители на rs5918(C)

**Таблица 5.** Средни стойности, стандартно отклонение, 95% конфиденциален интервал, Chi-квадрат и точен тест на Fisher (p) (50% вероятност) за интервал на рекурентен епизод при жени и мъже с ДВТ, със затлъстяване и нормално тегло, носители или неносители на rs5918 (C).

Пол	rs5918 /PLA2	Наднормено тегло	Средна стойност	Стандартно отклонение	95% CI	$\chi^2$ *	Fisher's (p)
Жени	0/	0	7.478	0.789	5.930 - 9.025	0.26	0.61
		1	7.607	2.159	3.376 - 11.838		
	rs5918 (C)	0	6.521	1.04	4.482 - 8.560	2.371	0.074
		1	3.143	1.335	0.526 - 5.760		
	Общо жени с ДВТ	0	7.508	0.78	5.9809.037	1.532	0.216
		1	5.758	0.888	4.017 - 7.499		
Мъже	0	0	6.122	0.733	4.685-7.558	5.722	0.017**
		1	3.571	1.013	1.585-5.558		
	rs5918 (C)	0	4.75	1.365	2.075-7.425	1.315	0.367
		1	3.143	1.388	0.423-5.862		
	Общо мъже с ДВТ	0	5.422	0.616	4.214-6.630	6.316	0.012**
		1	4.088	0.976	2.175-6.001		

\*  $\chi^2$  Log Rank Mantel-Cox , \*\* Сигнификантна стойност p <0.05, 0=Нормално тегло; 1=Наднормено тегло

Вероятността за по-кратък интервал от време преди рецидивиращ инцидент при жени с наднормено тегло, носители на rs5918 (C)



полиморфизъм е по-висока, но не сигнификантно ( $\chi^2=2.371$ ,  $p=0.074$ ). (Фиг.5, Таблица 5.)

#### 4.1.4. Влиянието на хормонална терапия и акушерска анамнеза за по-ранно развитие на ДВТ инцидент при пациенти, носители и неносители на rs5918 (C) полиморфизъм в гена на ITGB (Kaplan-Meier)

При жени носители на полиморфизма rs5918(C) на хормонална терапия, вероятността за ДВТ не бе по-висока, или с по-ранна проява на събитието ( $\chi^2 = 0.836$ ,  $p = 0.305$ ) в сравнение с пациентите от женски пол, които не са на хормонална терапия (Таблица 6). При жени неносители тази разлика също не е значима. ( $\chi^2 = 1.051$ ,  $p = 0.305$ ). Не бе значима и разликата за вероятността за по-кратък интервал от време преди рецидивиращ инцидент, както при носители така и при неносители.

**Таблица 6. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за преживяемост до инцидент на ДВТ, в група пациенти жени, носители и неносители на rs5918 (C) полиморфизъм, на хормонална терапия**

Пол	rs5918 (C) Общо сравнение за Хормонална терапия		Chi-Square	df	Sig.
Жени	0	Log Rank (Mantel-Cox)	1.051	1	.305
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.115	1	.291
	rs5918 (C)	Log Rank (Mantel-Cox)	.836	1	.361
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.120	1	.729

**Таблица 7. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за преживяемост до инцидент на ДВТ, в група пациенти жени, носители и неносители на rs5918 (C) полиморфизъм в гена на ITGB с акушерска анамнеза**

Пол	rs5918 (C) Общо сравнение за Акушерска анамнеза		Chi-Square	df	Sig.
Жени	.0	Log Rank (Mantel-Cox)	18.480	1	.000
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	14.806	1	.000
	rs5918 (C)	Log Rank (Mantel-Cox)	10.572	1	.001
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	11.782	1	.001

При жени пациенти носители на rs5918 (C) и с проблеми по време на бременността и раждане, вероятността за ДВТ е сигнификантно по-висока, и е с много ранна проява на събитието ( $\chi^2 = 10.572$ ,  $p = 0.001$ ) в



сравнение с пациентите от женски пол, които нямат подобни проблеми. При жените носители тази разлика е също значима и сигнификантна ( $\chi^2=18.480$ ,  $p = 0.001$ ).

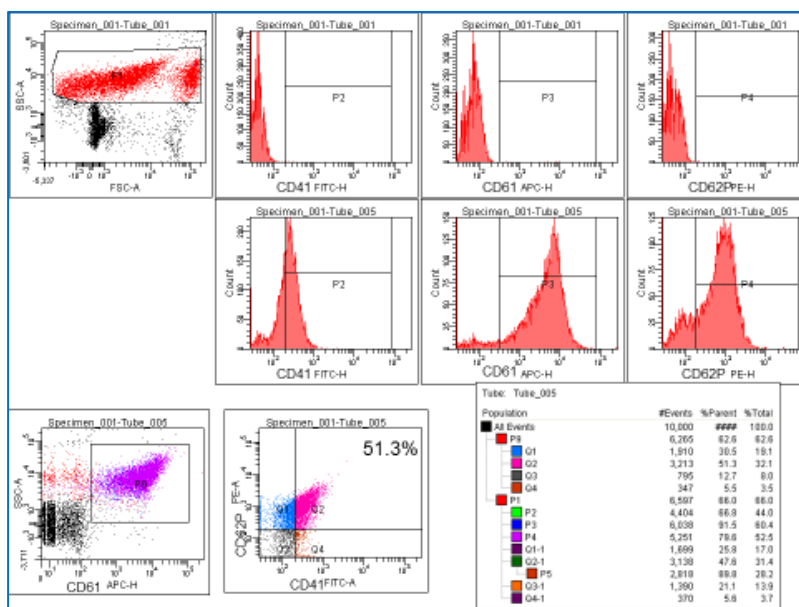
Не е значима и не е сигнификантна разликата за вероятността за по-кратък интервал от време преди рецидивиращ инцидент при носителите и носители на rs5918 (C) (Таблица 8).

**Таблица 8. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за интервал до рекурентен епизод на ДВТ, в група пациенти жени, носители и носители на rs5918 (C) с акушерска анамнеза**

Пол	rs5918 (C) Общо сравнение за Акушерска анамнеза		Chi-Square	df	Sig.
Жени	.0	Log Rank (Mantel-Cox)	1.195	1	.274
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.654	1	.198
	rs5918 (C)	Log Rank (Mantel-Cox)	1.929	1	.165
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	2.559	1	.110

#### 4.1.5. Флоу цитометрично изследване на активността на тромбоцитите

Тромбоцитите изолирани от пациенти с ДВТ са изследвани с флоуцитометричен анализ.

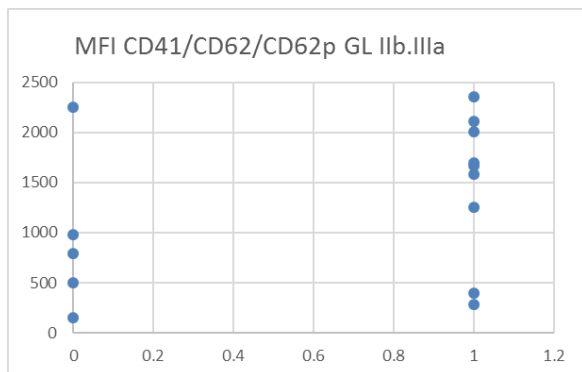


**Фигура 6. Скатер диаграма на флоуцитометрично изследване на тромбоцитите, изолирани от пациент с ДВТ, носител на полиморфизма rs5918 в ITGB3 и 4G/5G полиморфизъм в гена на PAI-1. За измерване на активирането на тромбоцитите, те са белязани с анти-човешки CD41, FITC HIP8; Анти-човешки CD61 (Интегрин бета 3) APC (V); Анти-**

**човешки CD62P PE (K-4).**

Пробите съдържат смес от активирани тромбоцити и такива в покой (фиг. 6). Двойната положителна популация CD41/CD62P (Q2) се характеризира като активирани тромбоцити с MCFI индекс. Комплексът от

CD61-позитивни клетки се комбинира с клетки с CD41 и CD62P. Активираните тромбоцити от пациент с ДВТ, носител на полиморфизма rs5918 в ITGB3 и 4G/5G PAI-1 са 51.3%, докато CD62P положителни (активирани) тромбоцити при здрави индивиди, носители на същия генетичен вариант са около 5%.



**Фигура 6А.** Активността на тромбоцитите, представена като индекс MFI CD41/CD61/CD62p изолирани от пациенти с ДВТ носители (1) и неносители (0) на полиморфизма rs5918 в ITGB3

При изследване на разпределението на активността на тромбоцитите на носителите спрямо неносителите на полиморфизма rs5918 в ITGB3 бе установена обратно пропорционална зависимост между степента на активирането и носителството при пациенти с ДВТ. Pearson Correlation 0.565,  $p=0.032$ .

#### **4.1.6. Изследване на морфологичните и механичните особености на тромбоцитите, чрез атомно-силова микроскопия (АСМ) при здрави индивиди и пациенти с ДВТ. Промени в морфологията и наномеханиката на тромбоцитите при носители на PLA1/A2 в гликопротеин IIb IIIa:**

Различни фактори обуславят тромбоцитната морфология както и физиологичните активности в самите тромбоцити. Повърхността на тромбоцитите е най-богата на гликопротеинови (GPIIb/IIIa) рецептори за свързване с фибриноген и фактор на фон Вилебранд.

Типични изображения на АСМ на тромбоцитите, изолирани от контроли и пациенти с ДВТ, неносители и носители на PLA2 алела в гена за GPIIb/IIIa са представени на Фигура 7. Очевидно е, че тромбоцитите са леко активирани, в следствие от процедурата на изолиране и контакта с покривното стъкло, тъй като филоподите са ясно видими. При активиране

на тромбоцитите настъпва серия от морфологични промени, които включват мембранни издатини, образувани в резултат на събиране на гранули в центъра на клетка и разпространени на повърхността филоподии и ламелоподии.

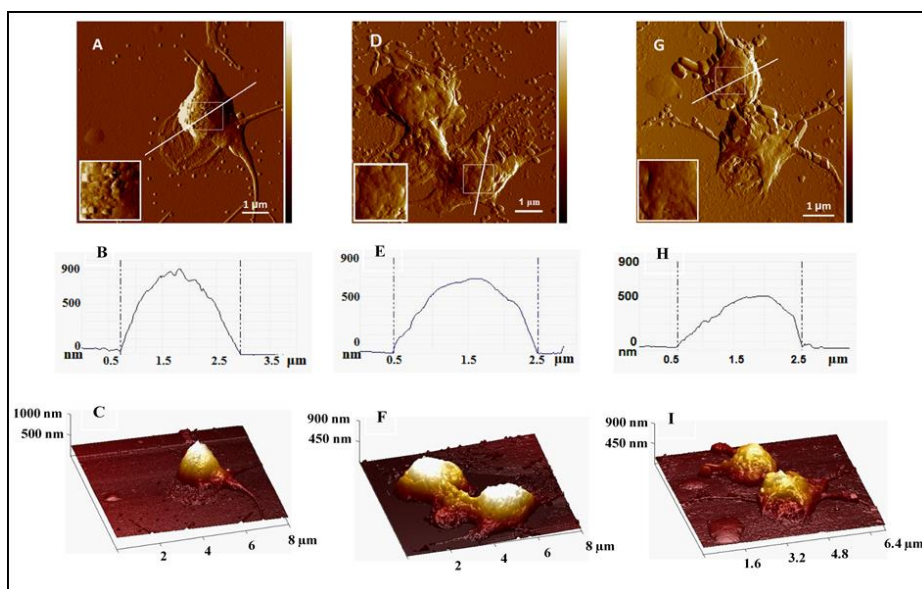
Върху мембраната на тромбоцитите при здрави хора, носители на PLA2 (Фигура 7А), се появяват леки гънки в начален етап на активиране. Тромбоцитът губи своята дисковидна форма и формира филоподии (Фигура 7С). Активираните тромбоцити на носителите на PLA2 здрави индивиди и пациенти с ДВТ, са с по-малка височина в сравнение с тези на контроли-носителите. Често тромбоцитите са слепени един с друг, както се вижда на фигура 7 F и 7 I. Хиалоплазмата на тромбоцитите на пациенти ДВТ е разлята и могат да бъдат разграничени няколко частици с диаметър около 1 микрон, вероятно отделени от хиалоплазмата (Фигура 7 I). Ясно се вижда освобождаването на малки обекти около активираните тромбоцити (Фигура 7), които най-вероятно представляват тромбоцитни микрочастици (РМР) и/или гранули.

Съществена разлика се открива между морфологията и броя на частиците, отделени от тромбоцитите при здрави индивиди, носители и носители на PLA2, както и при пациенти с ДВТ (Фигура 8). Формата на частиците, при здрави контроли е сферична (Фигура 8А, В) и диаметър е в диапазона 110-170 nm за носители на PLA2 (див/нормален алел). При носители на PLA2 диаметърът е много по-голям (полиморфен алел) (200-400 nm). Пациенти с ДВТ се характеризират и с полигонално оформени частици, чиито размери варират в по-широк интервал от 100 nm до 1100 nm.

#### ***4.1.6.1. Топография на тромбоцитите от здрави контроли и пациенти с ДВТ***

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 „разпространение“ 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. Топографските параметри на тромбоцитите са представени на Фигура 9.

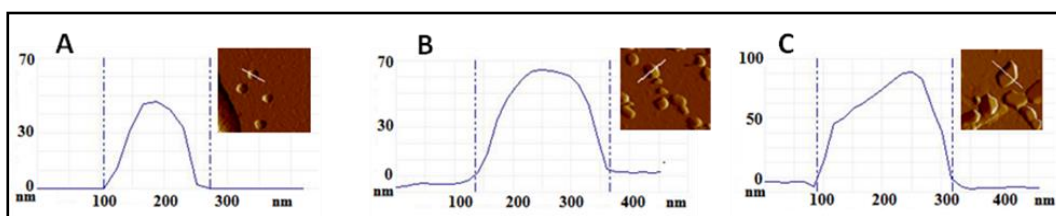


**Фигура 7.** AFM изображения на тромбоцити, получени от здрав индивид не-носител на PLA2 полиморфизъм (A) и носител на PLA2 полиморфизъм (D), и ДВТ пациент носител на PLA2 (G). AFM -2D профил (A, D, G) получен при сканиране XY площ  $8 \times 8 \mu\text{m}^2$ ,  $Z = 900\text{nm}$ . В рамките са представени уголемени снимки на централната зона. Напречно сечение (B, E, H), съответства на белите линии в изображенията A, D и G. AFM -3D топографски снимки (C, F, I) на съответните тромбоцитите в изображения A, D и G.

Тромбоцитите на пациенти с ДВТ, носители и неносители на PLA2 алела имат значително по-малка височина на мембраната в сравнение с контролите, с по-ниски средни стойности на пациентите носители на PLA2 (Фигура 10-1A Таблица 9). Незначителна разлика е установена между площта 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 неносители на PLA2 е

5.2±2.6 μm<sup>2</sup> за носители на PLA2 алела и е 4.4 ± 1.8 μm<sup>2</sup>, и съответно 5.0±2.4 μm<sup>2</sup> и 4.2 ± 1.7 μm<sup>2</sup> за пациенти с ДВТ неносители и носители на PLA2 алела. Площта на тромбоцитите е по-малка при пациенти с ДВТ и здрави индивиди, носители на PLA2, в сравнение с неносителите (Таблица 9).

Стойностите на „грапавост“ определени в централната част на тромбоцитите (на площ от 0.9 x 0.9 nm) са значително по-ниски, 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 неносители на PLA2, така и носители на PLA2 алела (Фигура 8 и Таблица 9).



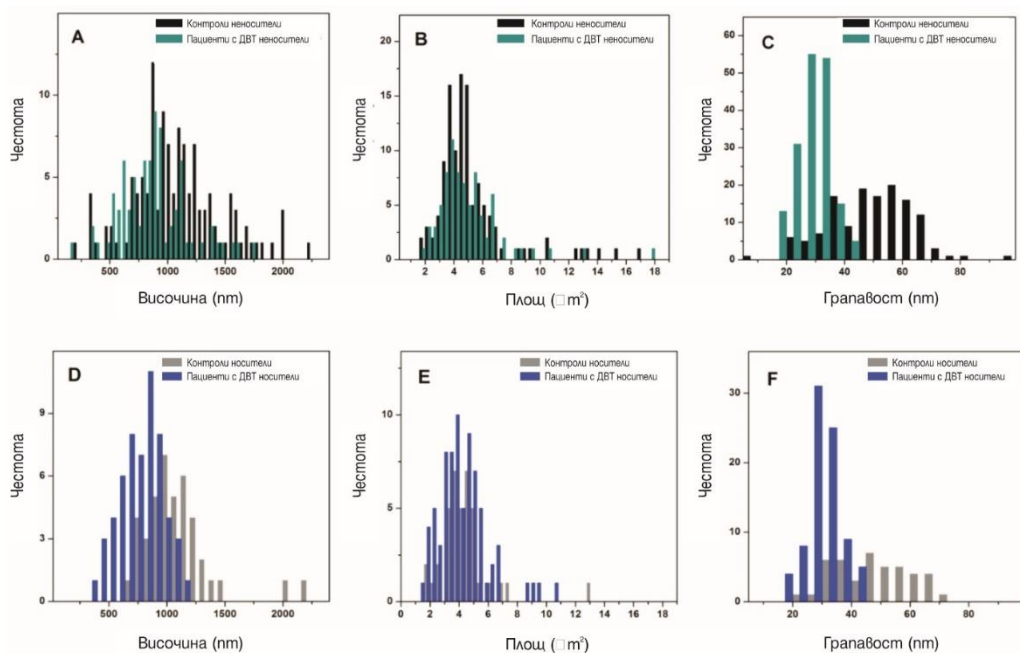
**Фигура 8.** АСМ изображения на микрочастиците (от Фиг. 7), отделени от тромбоцитите на здрави неносители (А), здрави носители (В) и ДВТ пациенти носители на PLA2 (С) и съответните профили.

**Таблица 9.** Средни стойности и стандартни отклонения височината (H), площ, грапавостта (Ra) и Young модул (E) на тромбоцитите изолирани носители и неносители на PLA1 / A2 полиморфизъм при здрави индивиди и пациенти с ДВТ

Изследвани индивиди	Носителство rs5918 (C)	Тромбоцити			
		h (nm)	Площ (nm <sup>2</sup> )	Ra (nm) <sup>b</sup>	E (kPa) <sup>b</sup>
Контроли	0	1021 ± 433	5.2 ± 2.6	49.7 ± 14	198 ± 50
	rs5918 (C)	1072 ± 338	4.4 ± 1.8	48.1 ± 12	359 ± 61
Пациенти с ДВТ	0	865 ± 290	5.0 ± 2.4	28.6 ± 6	341 ± 102
	rs5918 (C)	766 ± 182	4.2 ± 1.7	30.2 ± 6	<b>327 ± 85</b>

#### 4.1.6.2. Модул на Young

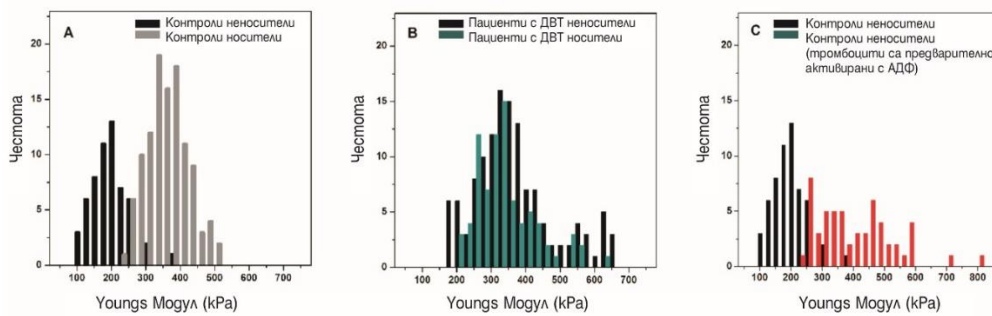
Модула на Young за тромбоцитите беше определен с помощта на уравнение чрез напасване на всяка крива „сила-разстояние“. Тъй като еластичността на човешките тромбоцити варира в широки граници в различните части на клетката, измерванията на параметрите бяха осъществени в централната част на тромбоцитите (около 12 на тромбоцит).



**Фигура 9.** Хистограми на разпределението по размер на тромбоцити, изолирани от здрави индивиди и пациенти с ДВТ: здрави контроли носители (в черно), (панели А – С,) и здрави контроли носители на PLA2 полиморфизъм (тъмно сиво) (панели D - F): пациенти с ДВТ носители (зелено), (панели А – С,) и носители на PLA1 / A2 полиморфизъм (синьо) (панели D - F). (А, D) височина, (В, Е) площ и (С, F) грапавост (Ra).

Фигура 9 илюстрира профилите на модула на Young, получени от тромбоцити на здрави индивиди и пациенти с ДВТ, носители и носители на алел PLA2. Профилите на модула на Young при носителите на PLA2 спрямо носителите са много различни и за групите на здрави индивиди и пациенти с ДВТ. Тромбоцитите при контролната група, изолирани от носители и носители на PLA2, показват относително нормални модели на разпространение на средните стойности на модула на Young (Таблица 9), докато при пациентите с ДВТ е на лице по-неравномерна схема на разпределение.

Стойностите на модула на Young за здрави контроли са  $359 \pm 61$  кРа и  $198 \pm 50$  кРа, съответно за носители и носители на PLA2. По този начин, носителството на PLA2 алела допринася за по-силна промяна в еластичността на мембраните на тромбоцитите и следователно до приблизително два пъти по-голяма еластичност на мембраните на тромбоцитите при здрави индивиди, носители на полиморфизъм.



**Фигура 10.** Хистограми на Young модули измерени за тромбоцити, изолирани от здрави контроли и пациенти с ДВТ, носители и носители на PLA1/A2 полиморфизъм. Здрави контроли, носители (черно, А и С) и носители на PLA1/A2 полиморфизъм (тъмно сиво, А); пациенти ДВТ носители (тъмно синьо, В) и носители на PLA1 / A2 полиморфизъм (тъмно зелено, В); и предварително активирани с ADP тромбоцити от същата здрава контрола носител (червено, С).

За пациенти с ДВТ носители на PLA2, модулет на еластичността на мембраните на тромбоцитите е много по-висок ( $E = 341 \pm 102$  кПа), отколкото при контролите ( $E = 198 \pm 50$  кПа), като се има предвид, че при носителите на PLA2 с ДВТ ( $E = 327 \pm 85$  кПа) стойността е малко по-ниска, в сравнение с тази при контролите ( $e = 359 \pm 61$  кПа).

За да се анализира влиянието на степента на активиране на тромбоцитите, върху механичните им свойства, тромбоцитите изолирани от здрави индивиди (носители на PLA2 алела) бяха предварително третирани с АДФ (Фиг. 10). АДФ е признат с неговия принос за иницирането и разпространението на активирането на тромбоцити на местата на съдово увреждане, като се секретира от тромбоцитните гранули и от повредени 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  $402 \pm 123$  кПа. По отношение на промененото разпределение на модула на Young, профилът на предварително активираните тромбоцити от здрави индивиди наподобява тези на пациентите с ДВТ (Фигура 10-2 В и С). Ние предполагаме, че механизмът за освобождаване на АДФ от тромбоцитите на пациенти с ДВТ е модифициран. Когато настъпва активиране в каскаден



режим, освобождаването на допълнително количество АДФ може да доведе до по-голямо активиране на съседни тромбоцити.

#### **4.2. Значение на носителството на полиморфизъм 4G/5G PAI-1 при пациенти с ДВТ**

Носителството на 4G/5G PAI-1 допринася за нарушено равновесие между фибринолизата и коагулацията, което може да цпособства значително за образуването на тромби. Промяна в плазмената концентрация на PAI-1 е свързана с риск от инсулт, сърдечно-съдови заболявания, ВТЕ, диабет и др., което може да бъде породено от потиснатата фибринолиза.

Фибриновите съсиреци се разтварят от плазмина след активирането му с урокиназа - плазминоген активатор (u-PA) или тъканен плазминогенен активатор (t-PA). Предполага се, че това активиране се регулира от PAI-1 и играе важна роля в патогенезата на заболявания, свързани с тромбоза.

##### **4.2.1. Носителството на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1**

Резултатите от ДНК-тестовете за носителство на 4G/5G в гена на PAI-1 в промотора на гена за PAI-1 при 259 пациенти и 219 контроли, които изследвахме са представени в Таблица 10. Само хомозиготното носителство на полиморфизъм 4G PAI-1 увеличава риска за клинична изява.

Честотата на носителството на полиморфизъм 4G/5 G в гена на PAI-1 в контролите бе различна при жените-18.4% и при мъжете- 22.7%, общо 19.27%. Намерена бе и възрастова разлика в носителството при контроли, с тенденция за намаляване с възрастта. (Таблица 10).

Честотата на носителство на 4G/5G PAI-1, бе намерена сигнификантно по-висока при пациентите, спрямо контролите (31.40% срещу 19.27% ), ( $\chi^2 = 8.530$ ; OR = 1.986,  $p = 0.040$ ) (Таблица 10).



**Таблица 10. Средни стойности на носителство на SND rs1799889 (-) в промотора на PAI-1, Pearson Chi-Squared, точен тест на Фишер, относителен риск/съотношение на шансовете и 95% конфиденциален интервал CI при пациенти от мъжки и женски пол в сравнение с контролите за различни възрастови групи.**

Статистически стойности на rs1799889(-)	Носителство при пациенти %	Носителство при контроли %	Pearson $\chi^2$	Точен тест на Fisher	OR	95% CI	p (Sig.)
Мъже	25.9	22.7	0.222	0.637	1.186	0.583-2.412	0.638
Жени	36.4	18.4	12.079	0.001	2.930	1.577-5.443	0.001
Общо пациенти	31.4	19.27	8.530	0.002	1.986	1.248-3.161	0.04
Мъже <45г.	22.4	25.0	0.122	0.727	.833	0.299-2.319	0.466
Жени <45г.	23.6	19.7	0.230	0.631	1.244	0.509-3.039	0.398
Мъже >45г.	27.5	15.8	1.115 <sup>c</sup>	0.291	2.023	0.537-7.628	0.227
Жени >45г.	44.9	12.4	13.520	0.001	6.848	2.228-21.04	0.001
Общо пациенти <45г.	22.9	21.9	0.021	0.886	1.050	0.536-2.057	0.343
Общо пациенти >45г.	35.8	14.8	11.557	0.001	4.063	1.732-9.533	.001

Сигнификантно по-висока честотата на носителство 4G/5G PAI-1 бе намерена и при пациентите от женски пол, в сравнение с контроли (36.4% срещу 18.4%,  $\chi^2 = 12.079$ , OR = 2.930, p = 0.001), докато при пациенти от мъжки пол, носителството бе с малка и несигнификантна разлика спрямо контролната група мъже (25.9% срещу 22.7%,  $\chi^2 = 0.222$ , OR = 1.186, p = 0.638), (Таблица 10).

Прави впечатление значително по-високото носителство на 4G/5G PAI-1 при пациенти над 45 години. Сигнификантно по-висока честота на носителство 4G/5G PAI-1 бе установена в обща група по-възрастни пациенти (над 45 години) (35.8% при пациенти срещу 14.8% при контроли;  $\chi^2 = 11.557$ , OR = 4.063, p = 0.001). При жените над 45 години разликата между пациенти и контроли бе също сигнификантна: 44.9% при пациенти срещу 12.4% при контроли ( $\chi^2 = 13.520$ , OR = 6.848, p = 0.001).

Алелната честота съгласно Hardy-Weinberg бе изчислена във всички подгрупи пациенти. както следва: за пациентите от женски пол rs1799889(-) за алелите 4G 59.33% и 5G 40.67% (p=0.7653); пациенти от

мъжки пол 53.23% и 46.77% ( $p=0.1364$ ) и в контролите жени: 50.88% и 49.12% ( $p=0.0014$ ); контроли мъже 4G 51.1% 5 G 48.9% ( $p=0.6032$ ) съответно (Таблица 11).

**Таблица 11. Генотип и алелни честоти на 4G/5G PAI- при пациенти и контроли.**

Алелни честоти (%)	4G	5G	p
<b>SND rs1799889 (-)</b>			
Контроли жени	116 (50.88%)	112 (49.12%)	0.0014
Жени с ДВТ	159 (59.33%)	109 (40.67%)	0.7653
Контроли мъже	93 (51.1%)	89 (48.9%)	0.60321
Мъже с ДВТ	132 (53.23%)	116 (46.77%)	0.1364
Общо контроли	190 (51.08%)	182 (48.92%)	0.0273
Общо пациенти	272 (52.51%)	246 (47.49%)	0.002

#### 4.2.2. Анализ Kaplan-Meier за вероятността от инцидент на ДВТ

##### 4.2.2.1. Анализ Kaplan-Meier за вероятността за „преживяване“ преди инцидент на ДВТ при мъже и жени.

Чрез прилагане на статистически анализ на Kaplan-Meier, ние анализирахме как честотата на носителството на този полиморфизъм е свързана с вероятността от тромботичен и неговата пенетрантност инцидент („вероятно време за преживяване“ преди първия или повтарящ се инцидент на ДВТ) (Таблица 12, Фигура 11).

**Таблица 12. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и Sig (p) по Log Rank и Breslow за инцидент на ДВТ (50% вероятност) на общо пациенти и в групи мъже и жени носители и неносители на 4G/5G PAI-1**

4G/5G PAI-1	Общо Сравнение	Chi-Square	df	Sig. (p)
Общо	Log Rank (Mantel-Cox)	2.535	1	0.111
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	0.701	1	0.402
Мъже=1	Log Rank (Mantel-Cox)	0.466	1	0.495
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	0.030	1	0.863
	Log Rank (Mantel-Cox)	2.870	1	0.070
Жени=2	Breslow (Generalized Wilcoxon)	0.839	1	0.360

Значителна, но несигнификантна разлика между носители и неносители на 4G/5G PAI-1 свързана с вероятността за по-ранна изява на

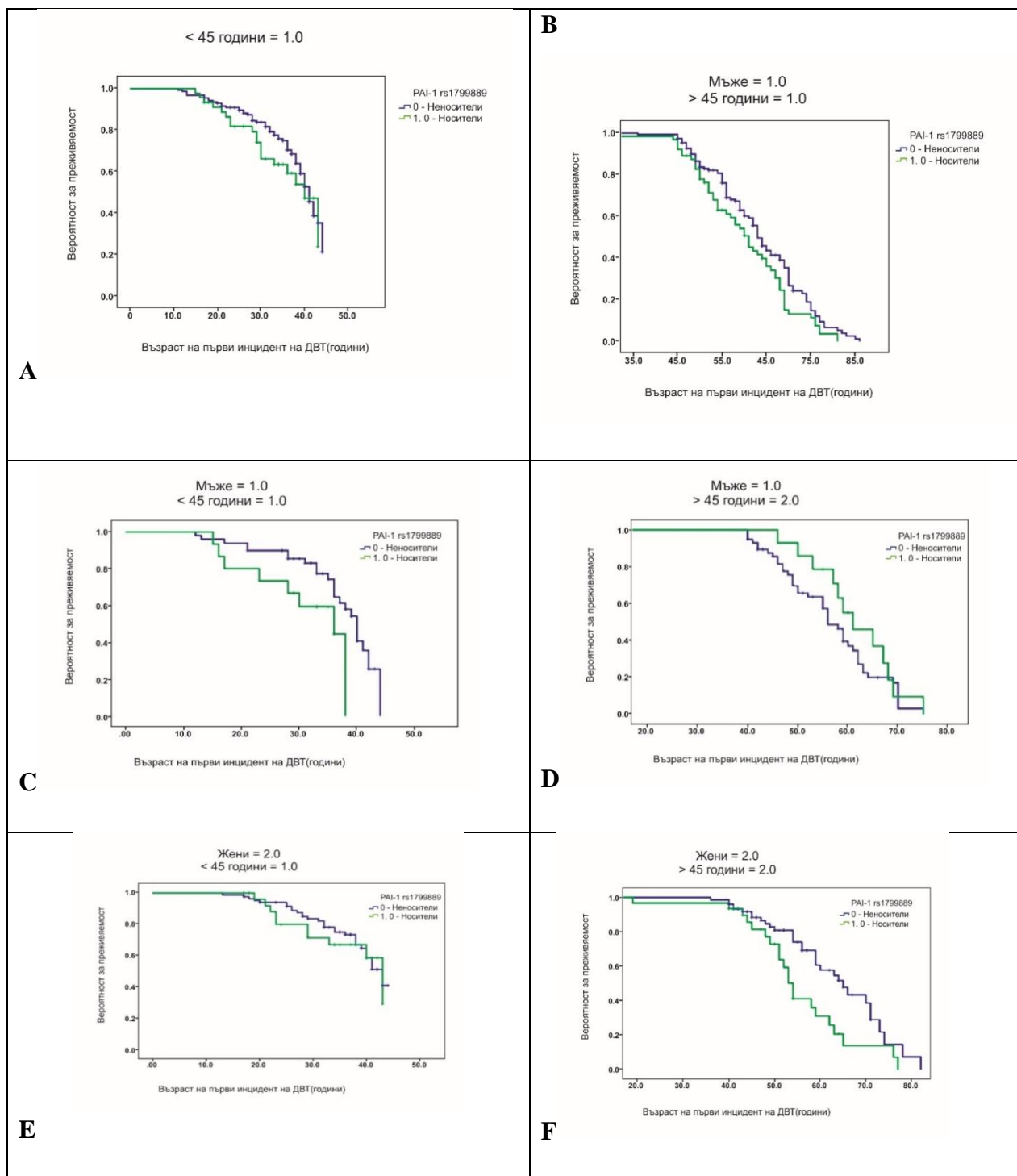
ДВТ инцидент, бе установена в обща група пациенти (53.572 г. срещу 56.05 г.;  $\chi^2 = 2.535$ ,  $p=0.111$ ), при жените (53.179 срещу 57.415 г.,  $\chi^2=2.870$ ,  $p=0.070$ ), но не и при мъжете (54.015 г. срещу 54.791 г.,  $\chi^2=0.466$ ,  $p=0.495$ ) (Таблица 12). Средната възраст за инцидент на ДВТ (50% вероятност) бе близка в група пациенти мъже носители и неносители на полиморфизъм.

#### 4.2.2.2. Анализ по Kaplan-Meier за вероятността от ДВТ инцидент в подгрупи на пациенти под и над 45 години, носители и неносители на 4G/5G PAI-1.

Таблица 13. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за 50% вероятност за инцидент на ДВТ, в групи мъже и жени носители и неносители на 4G/5G PAI-1.

Група	Възраст (год.)s	Общо Сравнение	Chi-Square	df	Sig.
Общо	<45	Log Rank (Mantel-Cox)	1.274	1	0.259
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	2.133	1	0.144
	>45	Log Rank (Mantel-Cox)	5.753	1	0.016
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	4.657	1	0.031
Мъже=1	<45	Log Rank (Mantel-Cox)	1.829	1	0.176
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.731	1	0.188
Жени=2	<45	Log Rank (Mantel-Cox)	0.505	1	0.477
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	0.789	1	0.374
Мъже=1	>45	Log Rank (Mantel-Cox)	0.809	1	0.368
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	0.009	1	0.923
Жени=2	>45	Log Rank (Mantel-Cox)	6.730	1	0.009
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	8.941	1	0.003
<b>Test of equality of survival distributions for the different levels of PAI.</b>					

Резултатите от анализа на пациентите под и над 45 години потвърждават приноса 4G/5G PAI-1 полиморфизма за риск от развитие на ДВТ в по-късната възраст особено при жените.



**Фигура 11. Вероятността за преживяемост до ДВТ инцидент на пациенти под 45 години (А, С и Е) и над 45 години (В, D, F) носители и неносители на SND 4G/5G PAI-1:( А и В) общо пациенти, (С и D) мъже и (Е и F) жени**

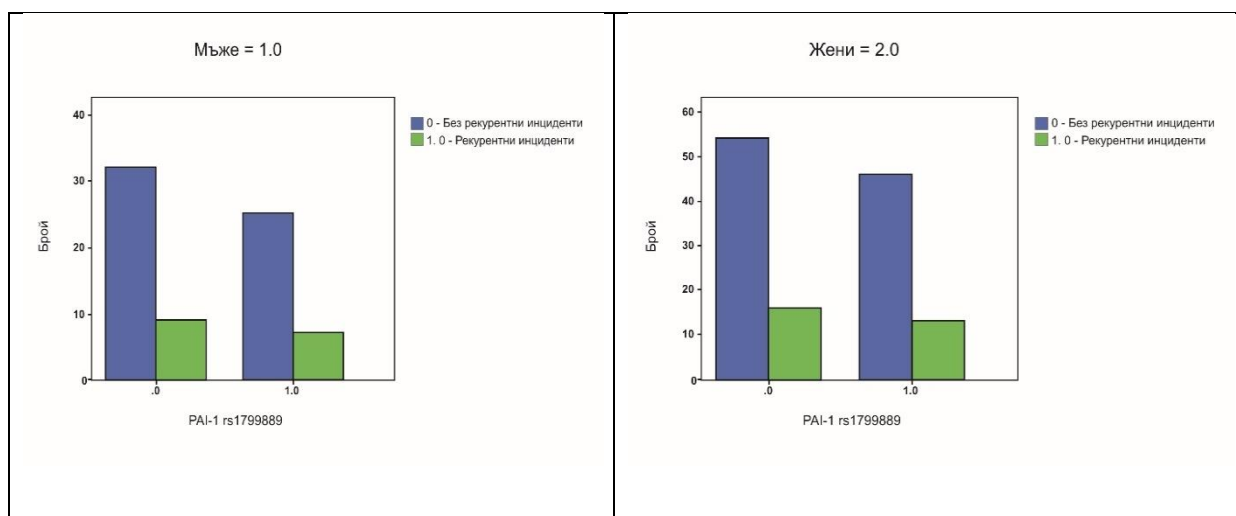
Значителна разлика във вероятността за по-ранна проява на ДВТ бе намерена в общата група пациенти над 45 години, носители 4G/5G PAI-1 (59.449г.носители срещу 63.467г. при неносители,  $\chi^2=5.753$ ,  $p=0.016$ ), а също така и в подгрупа жени над 45 години носители на 4G/5G PAI-1

(59.212 г. срещу 65.725 г.;  $\chi^2=6.730$ ,  $p=0.009$  (Таблица 13 Фигури 11А, В и С).

#### 4.2.3. Повтарящи се/рекурентни тромботични инциденти при носители на rs1799889 (-) полиморфизма

Рекурентността на ДВТ инциденти при носители на тромбофилични мутации една от най-много оспорвани и дискутирани теми.

Честотата на повтарящи се инциденти на ДВТ и БЕ в обща група пациенти носители на 4G/5G PAI-1 бе 22.0%, и бе сходна при мъжете 21.99% и жените и 22.00% съответно (Таблица 1). Не бе установен висок риск за повтарящ се инцидент при пациенти носители на полиморфизъм 4G/5G PAI-1 в сравнение с неносителите (OR = 1.025,  $p=0.954$ ), (Фиг.12), нито в общата група пациенти, нито подгрупите на жените или мъжете (OR 1.003,  $p = 0.994$ ).



Фигура 12. Крос табулации за риск от рекурентен инцидент на ДВТ, (А) мъже и (В) жени, носители и неносители на полиморфизъм 4G/5G PAI-1 в промотора на гена на PAI-1

##### 4.2.3.1. Интервал преди рекурентно събитие

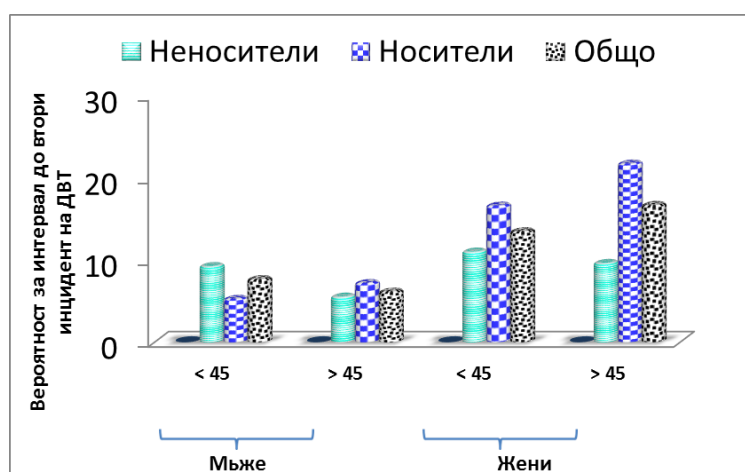
Интервалът преди рекурентното събитие е още един важен показател за клиничната практика.

**Таблица 14. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за интервал до повтарящ се инцидент на ДВТ (50% вероятност), в група пациенти мъже и жени, носители и неносители на полиморфизъм 4G/5G PAI-1**

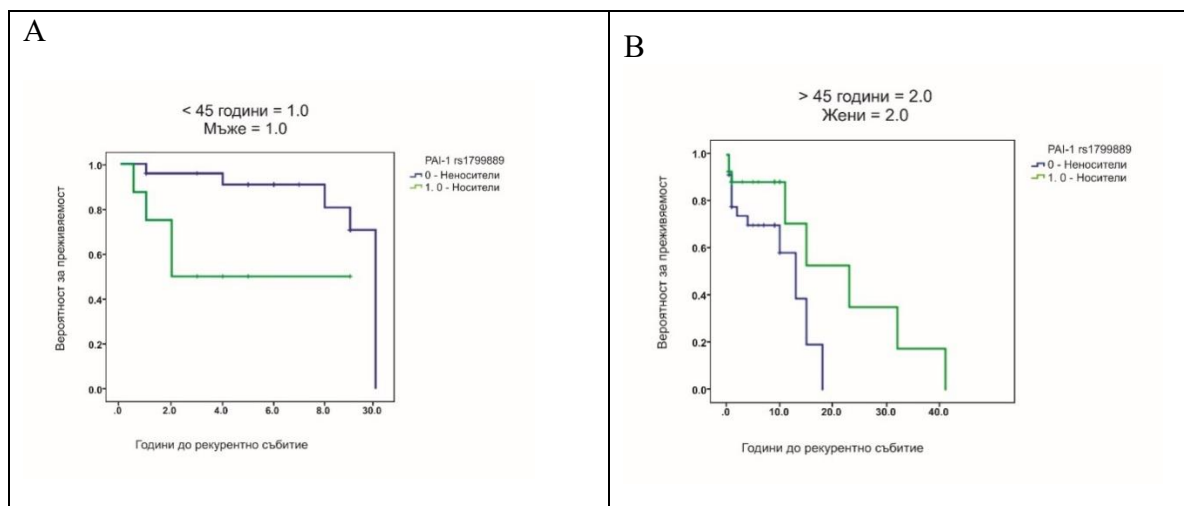
Пол	Възраст (год.)	Общо Сравнение	Chi-Square	df	Sig.
Мъже		Log Rank (Mantel-Cox)	1.993	1	.158
Жени		Log Rank (Mantel-Cox)	3.053	1	.081
Мъже=1	<45=1	Log Rank (Mantel-Cox)	3.306	1	.069
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	2.989	1	.084
	>45=2	Log Rank (Mantel-Cox)	.699	1	.403
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.257	1	.612
Жени=2	<45=1	Log Rank (Mantel-Cox)	.243	1	.622
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.106	1	.744
	>45=2	Log Rank (Mantel-Cox)	4.370	1	.037
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.966	1	.161

Test of equality of survival distributions for the different levels of 4G/5G PAI/nomut.

Не бе установена разлика в интервала (50% вероятност) преди рекурентното събитие в обща група пациенти  $\chi = 0.638$ ,  $p = 0.425$ . При пациенти мъже с рекурентни инциденти носителството несигнификантно намалява периода между двете събития, (11.175 г. срещу 6.119,  $\chi^2 = 1.993$ ,  $p = 0.158$ ). При жените също не бе установена сигнификантна разлика при носителите (12.159 г. срещу 19.292 г.,  $\chi^2 = 3.053$ ,  $p = 0.081$ ) в случая носителството удължава периода между двете събития (Таблица 14).



**Фигура 13. Вероятността за интервал до повтарящ се инцидент на ДВТ (50% вероятност) в обща група пациенти, мъже и жени, носители и неносители на полиморфизъм 4G/5G PAI-1, под и над 45 години**



**Фигура 14. Вероятността за интервал до повтарящ се инцидент на ДВТ (50% вероятност) при пациенти: под (А) и над (В) 45 години, носители и неносители на полиморфизъм 4G/5G PAI-1**

При анализиране в подгрупи мъже жени, под и над 45 години, бе установена разлика при млади мъже под 45 години, но не сигнификантна (9.182 г. при неносители срещу 5.188 г. при носителите,  $\chi^2=3.306$ ,  $p=0.069$ ).

При пациентите от женски пол с повтарящи се инциденти носителството удължава периода между двете събития сигнификантно и особено зачимо при жените над 45 години. (9.566 г. срещу 21.658г. ,  $\chi^2=4.370$ ,  $p=0.037$ ) (Таблица 14 и фигури 13 и 14).

#### **4.2.4. Влияние на тютюнопушене върху риска за инциденти на ДВТ при пациенти носители и неносители на 4G/5G полиморфизъм**

##### ***4.2.4.1. Влияние на тютюнопушене върху риска за по-ранен инцидент на ДВТ при пациенти носители и неносители на 4G/5G полиморфизъм***

Тютюнопушенето е установен рисков фактор за тромботични инциденти.

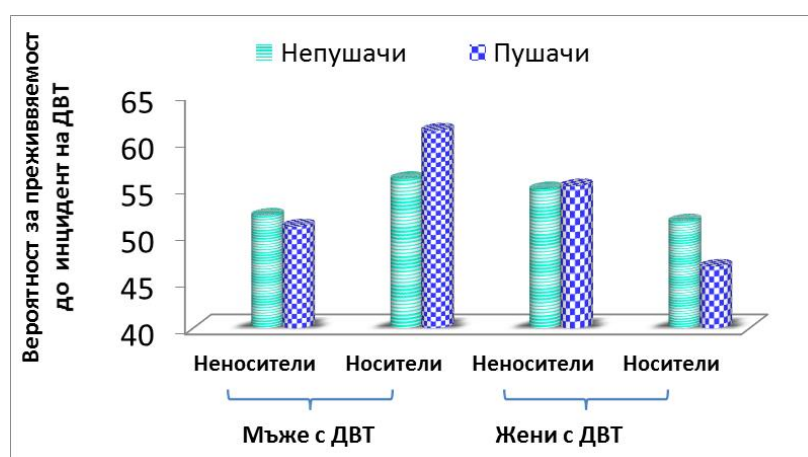
Изследване на значението на тютюнопушенето в комбинация с носителството на тромбофилични мутации и в частност на PAI-1 за развитието на ВТЕ е важна, защото тютюнопушенето сред мъжете и жените все още е често срещано явление.

**Таблица 15. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за 50% вероятност за инцидент на ДВТ, в групи мъже и жени носители и неносители на полиморфизъм 4G/5G PAI-1, пушачи и непущачи.**

Пол	Общо сравнение		Chi-Square	df	Sig.
	Тютюнопушене	PAI-1 4G/5G			
Мъже=1.0	0	Log Rank (Mantel-Cox)	.071	1	.789
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.345	1	.557
	1.0	Log Rank (Mantel-Cox)	1.903	1	.168
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	2.707	1	.100
Жени=2.0	0	Log Rank (Mantel-Cox)	1.106	1	.293
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.122	1	.727
	1.0	Log Rank (Mantel-Cox)	5.100	1	.024
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	2.597	1	.107

\* Непущачи = 0, Пушачи = 1

Вероятността от по-ранен инцидент на ДВТ при жени, които са били пушачи е по-висока в сравнение с непущачи (46.571г.срещу 55.193 г.;  $\chi^2=5.100$ ,  $p = 0.024$ ) (Таблица 15). При пациенти от женски пол неносители вероятността за по-ранната изява е несигнификантна. (54.869 г. срещу 51.429г.,  $\chi^2=1.106$ ,  $p=0.293$ ). (Таблица 15 фигура 15). При мъжете носителството променя възрастта, като удължава периода до проявата, но несигнификантно.



**Фигура 15. Средни стойности на 50% вероятност за възрастта на инцидент на ДВТ, при мъже и жени носители или неносители носители и неносители на полиморфизъм 4G/5G PAI-1, пушачи и непущачи.**



#### 4.2.4.2. Влияние на тютюнопушене върху риска за по-ранно развитие на рекурентен ДВТ инцидент при пациенти носители и неносители на 4G/5G PAI-1

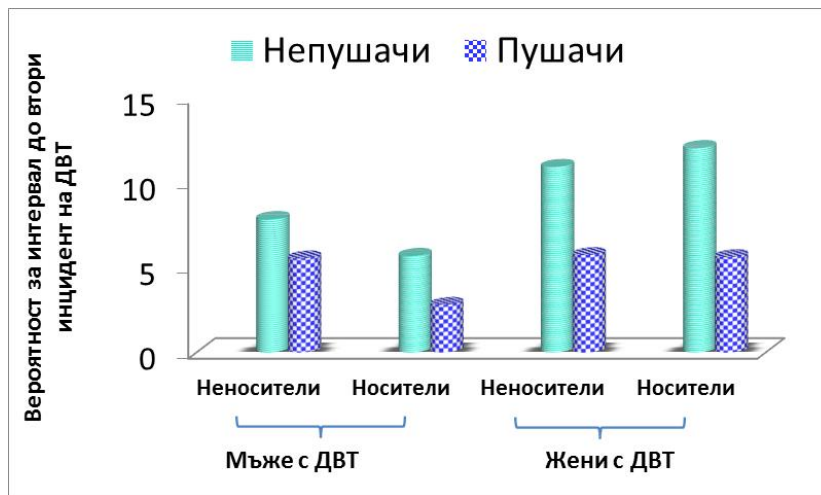
При жени с ДВТ носители 4G/5G PAI-1 и пушачи вероятността за по-кратък интервал преди повтарящ се епизод е значително по-висока със сигнификантна разлика ( $\chi^2 = 8.923$ ,  $p = 0.003$ ), в сравнение с непушачи.

**Таблица 16. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и за интервал до повтарящ се инцидент на ДВТ (50% вероятност) в обща група пациенти носители и неносители на 4G/5G полиморфизъм в гена на PAI-1, пушачи и непушачи.**

Пол	Тютюнопушене		Chi-Square	df	Sig.
Мъже=1.0	.0	Log Rank (Mantel-Cox)	.035	1	.852
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.394	1	.530
	1.0	Log Rank (Mantel-Cox)	4.101	1	.043
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	3.843	1	.050
Жени=2.0	.0	Log Rank (Mantel-Cox)	4.838	1	.028
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	4.778	1	.029
	1.0	Log Rank (Mantel-Cox)	8.923	1	.003
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	8.923	1	.003
PAI-1 4G/5G		* Непушачи = 0, Пушачи = 1			

При жени неносители и пушачи вероятността за по-кратък интервал преди повтарящ се епизод също така е сигнификантна, но е с по-малка разлика интервала ( $\chi^2 = 4.838$ ,  $p = 0.028$ ). (Таблица 16).

При пациенти от мъжки пол с ДВТ носители на 4G/5G PAI-1 полиморфизъм и пушачи вероятността за по-кратък интервал преди повтарящ се епизод е по-висока със сигнификантна разлика само при носители на 4G/5G PAI-1 полиморфизъм ( $\chi^2 = 4.101$ ,  $p = 0.043$ ), (Таблица 16, Фиг. 16).



**Фигура 16.** Средни стойности на 50% вероятност за интервала до рекурентен инцидент на ДВТ, при мъже и жени носители или неносители на полиморфизъм 4G/5G PAI-1 в промотора на гена на PAI-1, пушачи и непушачи.

#### **4.2.5. Влияние на затлъстяване върху вероятността за инцидент на ДВТ при пациенти, носители и неносители на 4G/5G полиморфизъм в гена на PAI-1 с наднормено тегло**

##### ***4.2.5.1. Влияние на затлъстяване върху вероятността за по-ранен инцидент на ДВТ при пациенти носители и неносители на 4G/5G полиморфизъм в гена на PAI-1 с наднормено тегло***

В обща група пациенти със затлъстяване при носителите на 4G/5G полиморфизъм се наблюдава по-късна проява на събитието но несигнификантно ( $56.444 \pm 1.474$  срещу  $61.027 \pm 1.866$  г.;  $\chi^2=1.829$   $p=0.176$ )

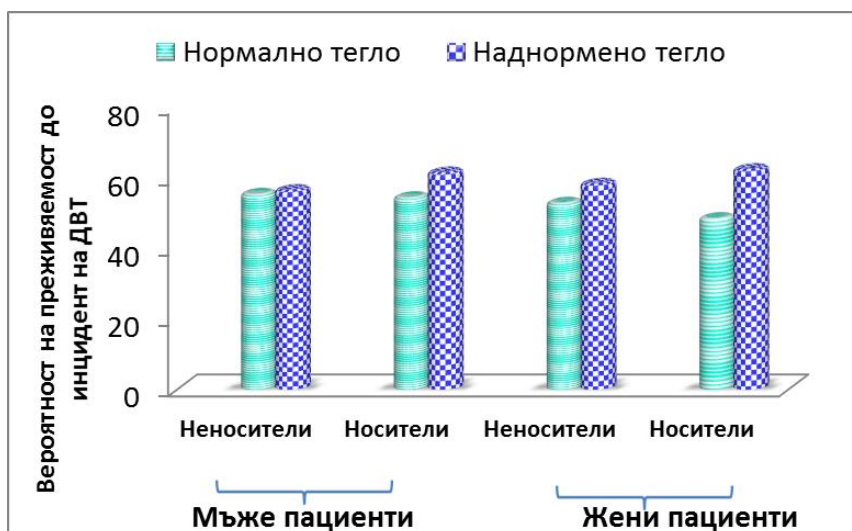
При жените носители на полиморфизма и със затлъстяване, вероятността за ДВТ е по-висока и е с по-късна проява на събитието ( $\chi^2=6.364$ ,  $p=0.012$ ) (Таблица 17, Фиг.17).

При пациенти мъже с наднормено тегло и затлъстяване, ефектът е подобен, вероятността за ДВТ е с по-късна проява на събитието .

Таблица 17. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за преживяемост до инцидент на ДВТ, в групи група пациенти с наднормено и нормално телесно тегло, носители и неносители на 4G/5G полиморфизъм в гена на PAI-1.

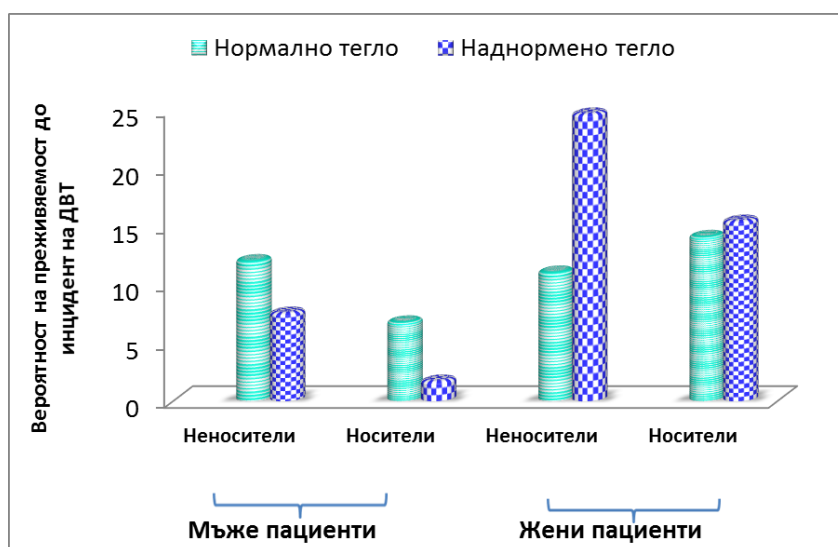
Пол	PAI-1 4G/5G	Общо сравнение Наднормено тегло	Chi-Square	df	Sig.
1.0	0	Log Rank (Mantel-Cox)	0.171	1	0.680
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	0.081	1	0.776
	1.0	Log Rank (Mantel-Cox)	0.023	1	0.880
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	0.276	1	0.599
2.0	0	Log Rank (Mantel-Cox)	2.027	1	0.155
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.416	1	0.234
	1.0	Log Rank (Mantel-Cox)	6.364	1	0.012
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	6.739	1	0.009

Test of equality of survival distributions for the different levels of overweight .



Фигура 17. Средни стойности на 50% вероятност за преживяемост до инцидент на ДВТ, при мъже и жени носители или неносители на полиморфизъм 4G/5G PAI-1 в промотора на гена на PAI-1, с нормално и наднормено тегло.

**4.2.5.2. Влияние на затлъстяване върху вероятността за по-малък интервал преди рекурентен инцидент на ДВТ при пациенти, носители и неносители на 4G/5G полиморфизъм в гена на PAI-1 с наднормено тегло**



Фигура 18. Средни стойности за интервал до повтарящ се инцидент на ДВТ (50% вероятност) при мъже и жени носители и неносители на 4G/5G полиморфизъм на PAI-1 с нормално и наднормено тегло.

Таблица 18. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за интервал до повтарящ се инцидент на ДВТ (50% вероятност) в групи група пациенти, носители и неносители на 4G/5G полиморфизъм в гена на PAI-1 с наднормено и нормално телесно тегло.

Пол	PAI-1 4G/5G	Общо сравнение Наднормено тегло	Chi-Square	df	Sig.
Мъже =1.0	0	Log Rank (Mantel-Cox)	2.578	1	.108
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	2.028	1	.154
	4G/4G	Log Rank (Mantel-Cox)	11.212	1	.007
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	10.346	1	.006
Жени=2.0	0	Log Rank (Mantel-Cox)	3.739	1	.053
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.837	1	.175
	4G/4G	Log Rank (Mantel-Cox)	.160	1	.689
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.150	1	.699

Вероятността за по-кратък интервал преди повтарящ се епизод (години) е сигнификантно по-висока при пациенти от мъжки пол с наднормено тегло (6.782 г. срещу 1.712 г.  $\chi^2=11.212$   $p=0.007$ ) носители на 4G/5G полиморфизъм в гена на PAI-1.

Вероятността за по-кратък интервал преди повтарящ се епизод бе несигнификантно по-висока в подгрупа пациенти от мъжки пол с нормално тегло (12.048 г. срещу 7.548 г.  $\chi^2 = 2.578$ ,  $p=0.108$ ) (Таблица 18).

При жените вероятността за промяна в интервала преди повтарящ се епизод бе близка до сигнификантна при неносителите, като периода до

събитието бе по-дълъг ( $\chi^2 = 3.739$ ,  $p = 0.053$ ) (Таблица 18, Фиг.18). Носителството на 4G/5G полиморфизъм в гена на PAI-1, обаче намалява интервала между събитията и елиминира разликата, като доближава стойностите на пациенти носителите с нормално тегло.

#### 4.2.6. Влиянието на хормонална терапия и акушерска анамнеза за по-ранно развитие на ДВТ инцидент при пациенти, носители и неносители полиморфизъм 4G/5G PAI-1 в промотора на гена на PAI-1 (Kaplan-Meier)

При жени неносители на полиморфизма PAI-1 и на хормонална терапия, вероятността за ДВТ е по-висока и е с ранна проява на събитието, ( $\chi^2 = 2.44$ ,  $p = 0.118$ ) в сравнение с пациентите от женски пол, които не са на хормонална терапия (Таблица 19).

**Таблица 19 Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за преживяемост до инцидент на ДВТ, в група пациенти жени, носители и неносители на 4G/5G полиморфизъм в гена PAI-1, на хормонална терапия**

Пол	PAI-1 4G/5G	Общо сравнение за Хормонална терапия	Chi-Square	df	Sig.
Жени	0	Log Rank (Mantel-Cox)	2.444	1	.118
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.598	1	.206
	4G/4G	Log Rank (Mantel-Cox)	.663	1	.315
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.503	1	.478
Test of equality of survival distributions for the different levels of Hormonal Therapy.					

При жени носители на 4G/5G PAI-1 тази разлика не е значима. ( $\chi^2=0.663$ ,  $p = 0.315$ ). Не е значима и разликата за вероятността за по-кратък интервал от време преди рецидивиращ инцидент, както при носители така и при неносители ( $\chi^2 = 0.439$ ,  $p = 0.577$ ).

При жени пациенти носители на 4G/5G PAI-1 и с акушерска анамнеза, вероятността за ДВТ е по-висока и е с много ранна проява на събитието ( $\chi^2 = 10.937$ ,  $p = 0.001$ ), в сравнение с пациентите от женски пол, които нямат подобни проблеми (Таблица 20). При жени неносители тази разлика е също значима. ( $\chi^2 = 11.326$ ,  $p = 0.001$ ).

**Таблица 20. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за преживяемост до инцидент на ДВТ, в група пациенти жени, носители и неносители на полиморфизъм PAI-1 с акушерска анамнеза**

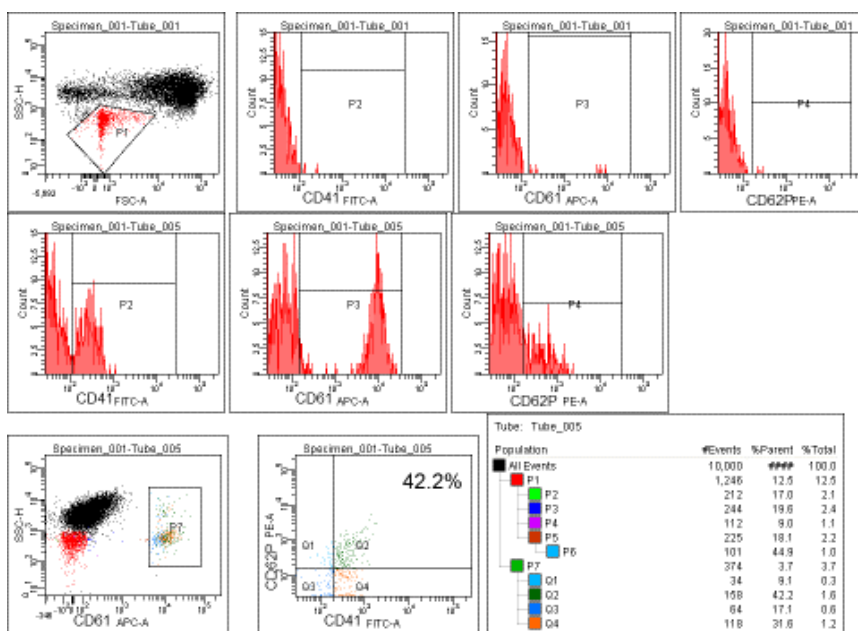
Пол	PAI-1	Общо сравнение за акушерска анамнеза	Chi-Square	df	Sig.
Жени	0	Log Rank (Mantel-Cox)	11.326	1	.001
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	12.917	1	.000
	4G/4G	Log Rank (Mantel-Cox)	10.937	1	.001
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	9.424	1	.002

Не е значима разликата за вероятността от по-кратък интервал до рекурентен инцидент при жени с репродуктивни проблеми носители на 4G/5G полиморфизъм ( $\chi^2 = 1.446$ ,  $p = 0.229$ ).

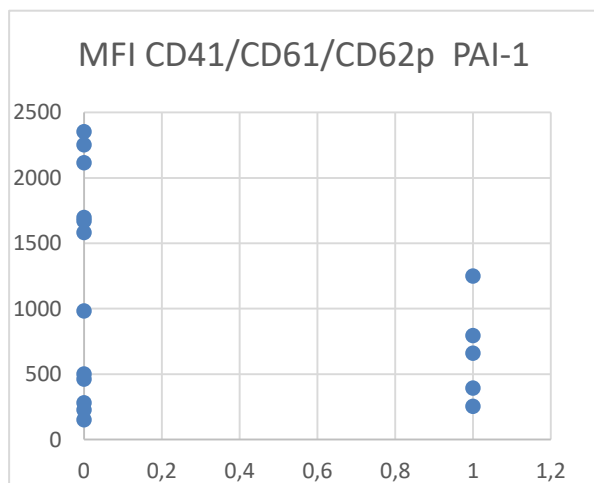
#### 4.2.7. Флуцитометрично изследване на активността на тромбоцитите

При изследване на разпределението на активността на тромбоцитите на носителите спрямо неносителите на 4G/5G полиморфизъм в гена на PAI-1 бяха установени по-ниски стойности на MFI CD41/CD61/CD62p индекса, което предполага по-ниска степен на активирането в сравнение с тази на неносителите на мутацията.

Активността на тромбоцитите, (представена като MFI индекс) изолирани от пациенти с ДВТ носители 4G/5G полиморфизъм е по-ниска от тази на неносителите.



**Фигура 19. Скатер диаграма на флуцитометрично изследване на тромбоцитите, изолирани от ДВТ пациент носител на 4G/5G PAI-1. Тромбоцитите са белязани с анти-човешки CD41, FITC HP8; Анти-човешки CD61 (Интегрин бета 3) APC (V); Анти-човешки CD62P PE (K-4).**



**Фигура 20.** Активността на тромбоцитите, представена като индекс MFI CD41/CD61/CD62p изолирани от пациенти с ДВТ носители (1) и неносители (0) на 4G/5G полиморфизъм в гена на PAI-1.

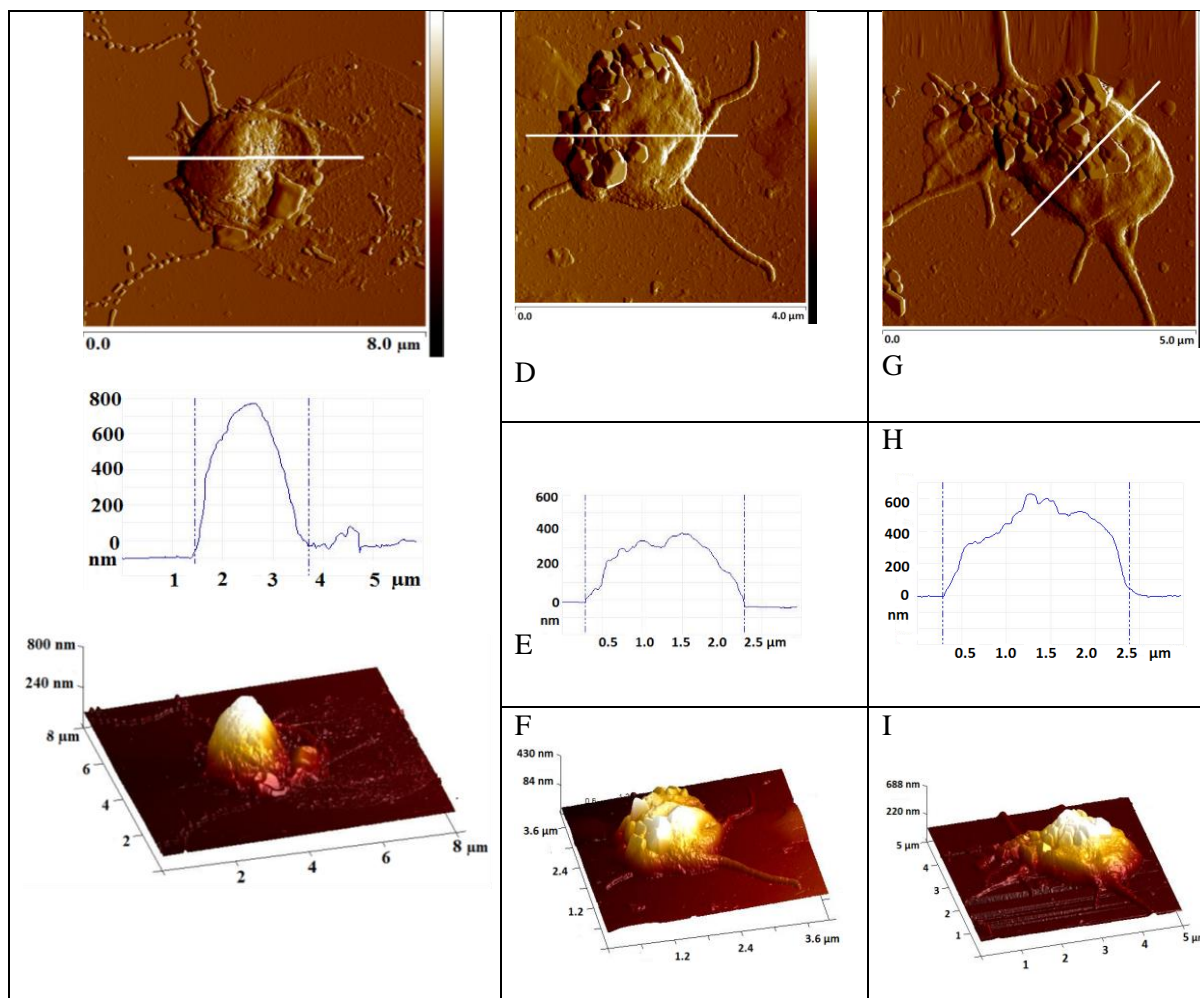
Установена е зависимост между степента на активирането и носителството при пациенти с ДВТ: Pearson Correlation  $r^2 = -0.508^*$ ,  $p = 0.046$ . Корелацията с анексина, т.е. с образуването на микрочастици е много слаба, ( $r^2 = 0.467$ ,  $p = 0.175$ ).

#### **4.2.8. Изследване на морфологичните и механичните особености на тромбоцитите, чрез атомно-силова микроскопия (АСМ) при здрави индивиди и пациенти с ДВТ. Промени в морфологията и наномеханиката на тромбоцитите при полиморфизъм**

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. 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 PAI е  $3.76 \pm 1.0 \mu\text{m}^2$ , която е по-ниска както 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 ( $0.9 \times 0.9 \mu\text{m}$ ).





**Фигура 21.** АСМ изображения на тромбоцити, получени от здрав индивид носител на rs1799889 (-) полиморфизъм в гена на PAI-1 (А, В и С), и ДВТ пациент носител на PLA2 полиморфизъм (D - H). Скалата е посочено във всеки панел. АСМ -2D профил (A, D, G) получен при сканиране XY площ 8x8  $\mu\text{m}^2$ , Z = 900nm. В рамките са представени уголемени снимки на централната зона. Напречно сечение (B, E, H), съответства на бели линии в изображенията A, D и G. АСМ -3D топографски снимки (F, I) на съответните тромбоцитите в изображения A, D и G.

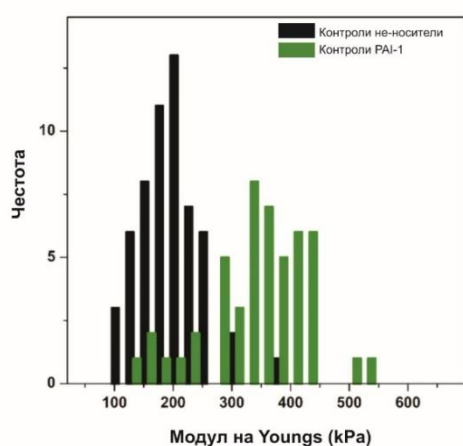
Грападостта отразява състоянието на тромбоцита. Ра има много близки стойности за всички ДВТ пациенти (28–30 nm), независимо от носителството на мутация. Тази стойност е значително по-ниска от измерената за здрави индивиди.

Стойностите на модула на Young за здрави контроли са  $371 \pm 67$  kPa и  $198 \pm 50$  kPa, съответно за носители и неносители на rs1799889 (-) полиморфизъм. Носителството на rs1799889 (-) полиморфизъм допринася за по-изразена промяна в еластичността на мембраните на тромбоцитите при здрави индивиди, носители на полиморфизъм.



**Таблица 21. Средни стойности и стандартни отклонения височината (H), площ, грапавостта (Ra) и Young модул (E) на тромбоцитите изолирани носители и неносители на rs1799889 (-) полиморфизъм пациенти с ДВТ**

Изследвани индивиди	Носителство		Тромбоцити	
	rs1799889 (-)	h (nm)	Площ (mm <sup>2</sup> )	Ra (nm) <sup>b</sup>
Контроли	0	1021 ± 433	5.2 ± 2.6	49.7 ± 14
Пациенти с ДВТ	0	865 ± 290	5.0 ± 2.4	28.6 ± 6
	rs5918 (C)	771 ± 150	3.76 ± 1.0	29.3 ± 3.9



**Фигура 22. Хистограма на Young модули измерени за тромбоцити, изолирани от здрави контроли, носители и неносители на носител на rs1799889 (-) полиморфизъм в гена на PAI.**

### 4.3. Значение на носителството на FVL полиморфизъм (rs6025) в гена на Фактор V при пациенти с ДВТ

Leiden мутация (FVL) или rs6025 (1691G>A) полиморфизъм причинява състояние на APC резистентност, тъй като засяга едно от целевите места за APC, нарушавайки ефективността на разграждане на FVa медирано от APC.

#### 4.3.1. Носителството на FVL

Наличието на FVL алел увеличава риска за венозна тромбоза 7.5кратно при хетерозиготни носители и до 80кратно при хомозиготи. Това е установен факт и нашите резултати са от потвърдителен характер.

**Таблица 22. Средни стойности на носителство на FVL, Pearson Chi-Squared, , точен тест на Фишер, относителен риск/съотношение на шансовете и 95% конфиденциален интервал CI при пациенти от мъжки и женски пол в сравнение с контролите и за различни възрастови групи.**

Статистически стойности на носителство на FVL	Пациенти %	Контроли %	Pearson $\chi^2$	Fisher (p)	OR	95% Конфиденциален интервал	p
FVL Мъже	24.1%	7.7%	8.727c	.003	3.818	1.499-9.727	.003
FVL Жени	21.1%	8.1%	7.835d	.006	3.030	1.357-6.763	.005
FVL Общо	22.5%	7.9%	16.761a	.001	3.376	1.840-6.194	.001
Мъже <45	30.6	9.8	6.055	0.014	4.048	1.264-12.963	0.019
Жени <45	21.3	7.0	5.164	0.023	3.568	1.134-11.228	0.030
Общо <45	25.3	8.2	11.259	0.01	3.794	1.680-8.566	0.001
Мъже >45	21.3	5.3	2.638	0.104	4.857	.605-39.023	0.137
Жени >45	21.0	10.0	2.254	0.133	2.391	.747-7.650	0.142
Общо >45	21.1	8.5	4.732	0.03	2.891	1.073-7.791	0.036

Честотата на носителството на FVL бе намерена значително по-висока както в общата група пациенти с ДВТ ( $\chi^2=16.761$   $p=0.001$ ) така и при пациенти от мъжки ( $\chi^2 = 8.727$   $p=0.003$ ), и от женски пол и ( $\chi^2=7.835$   $p=0.006$ ), в сравнение с контролите (Таблица 22). Изчисленият риск за инцидент на ДВТ бе по-висок при млади мъже и жени (OR=3.794,  $p=0.001$ ), носители на полиморфизъм, в сравнение с мъже и жени от по-възрастната група, където за общата група пациенти рискът беше сигнификантен (OR = 2.891,  $p = 0.036$ ), но не и за отделни групи пациенти (Таблица 22).

Хомозиготното носителството на FVL е доста рядко в общата популация, по-ниско от 1%. При нашите контроли е около 0.3%, общо в изследваната група е около 0.8%.

Алелната честота съгласно Hardy-Weinberg бе изчислена и представена на Таблица 23.

**Таблица 23. Генотип и алелни честоти на FVL полиморфизъм при пациенти и контроли.**

Алелни честоти FVL (%)	A	G	p
Контроли жени	13 (5.65)	217 (94.35%)	0.0043
Жени с ДВТ	29 (10.82%)	239 (89.18%)	0.6996
Контроли мъже	11 (5.29%)	197 (94.71%)	0.1651
Мъже с ДВТ	32 (12.8)	218 (87.2%)	0.0939
Общо контроли	24 (5.48)	414 (94.52%)	0.0921
Общо пациенти	61(11.78%)	457 (88.22%)	0.08071
Общо участници	85 (8.91%)	869 (91.09%)	0.0699

#### 4.3.2. Анализ Kaplan-Meier за вероятността от инцидент на ДВТ

##### 4.3.2.1. Анализ Kaplan-Meier за вероятността за „преживяване“ преди инцидент на ДВТ при мъже и жени.

Чрез прилагане на подхода на Kaplan-Meier за статистически изчисления бе установена значителната разлика свързана с вероятността за по-ранна изява на ДВТ инцидент между носители и неносители на FVL. В обща група пациенти бяха намерени следните сртойности (50.406 г. срещу 56.304 г.,  $\chi^2 = 3.327$ ,  $p=0.058$ ), и при мъжете (47.783 г. срещу 55.966 г.,  $\chi^2=5.913$ ,  $p = 0.015$ ) но не и при жените (52.928 г. срещу 56.596 г.,  $\chi^2=0.330$ ,  $p=0.566$ ) (Таблица 24).

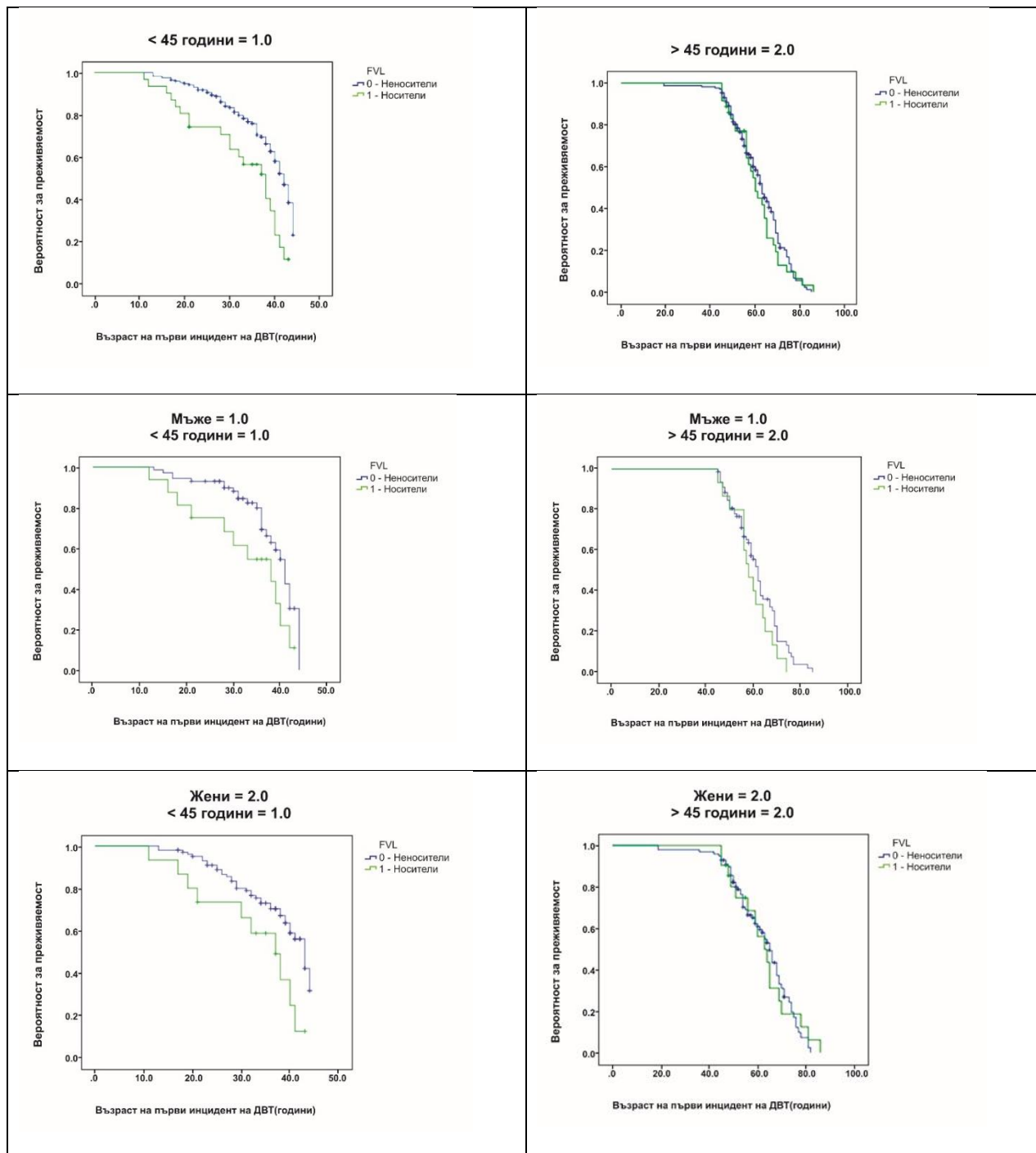
**Таблица 24. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за преживяемост до инцидента на ДВТ, в групи мъже и жени носители и неносители на FVL.**

Изследвани индивиди	FVL	Средна стойност				Медиана			
		Стойност	С.О.	95% Конфиденциален интервал		Стойност	С.О.	95% Конфиденциален интервал	
Общо	0	56.304	1.024	54.297	58.310	59.000	1.857	55.360	62.640
	FVL=1	50.406	2.352	45.796	55.015	56.000	3.795	48.563	63.437
	Общо	55.267	.940	53.424	57.110	58.000	1.334	55.385	60.615
Мъже=1	0	55.966	1.436	53.152	58.780	59.000	2.088	54.907	63.093
	FVL=1	47.783	3.210	41.493	54.074	50.000	5.211	39.786	60.214
	Общо	54.414	1.310	51.846	56.982	57.000	1.370	54.315	59.685
Жени=2	0	56.596	1.445	53.763	59.429	59.000	3.238	52.653	65.347
	FVL=1	52.928	3.456	46.153	59.702	56.000	7.442	41.414	70.586
	<b>Общо</b>	56.044	1.341	53.415	58.672	59.000	2.757	53.597	64.403

a. Estimation is limited to the largest survival time if it is censored. \* С.О. – Стандартно отклонение

Средната възраст за инцидент на ДВТ (50% вероятност) бе близка в групите жени носители и неносители на FVL.

**4.3.2.2. Анализ по Kaplan-Meier за вероятността от инцидент на ДВТ във възрастови подгрупи на пациенти под 45 години и над 45 години, носители и неносители на FVL**



**Фигура 23. Вероятността за преживяемост до ДВТ инцидент на пациенти под 45 години (А, В, С) и над 45 години (D, E, F) носители и неносители на FVL: А) и D) общо пациенти, В) и F) жени, С) и E) мъже**

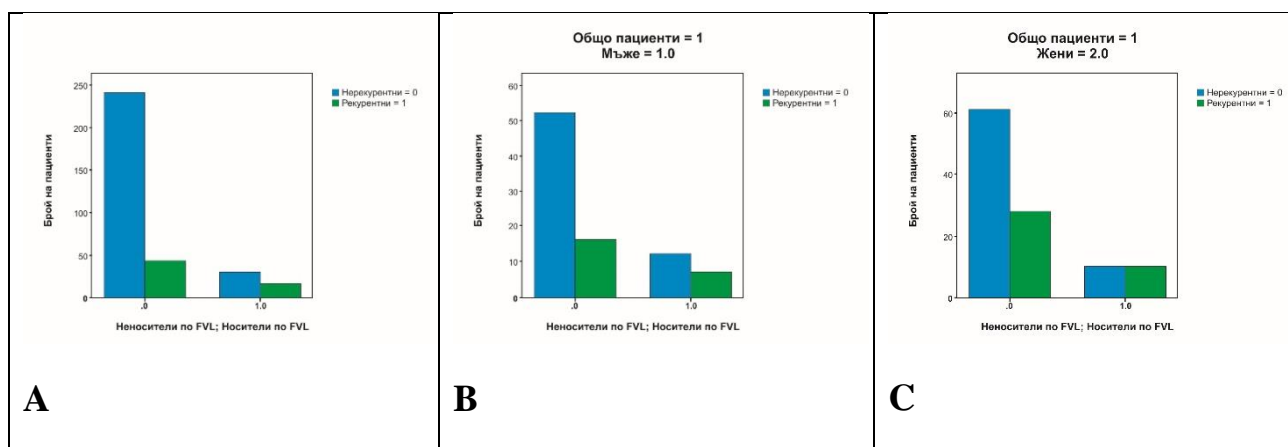
Значителна разлика във вероятността за по-ранна проява на ДВТ бе намерена в общата група млади пациенти (под 45 години), носители на и неносители FVL полиморфизъм (38.232 г. срещу 32.461 г.;  $\chi^2 = 10.215$ ,  $p=0.001$ ), а също така и в двете подгрупи на млади жени (38.120 г. срещу 32.498 г.,  $\chi^2=6.129$ ,  $p=0.013$ ) и мъже носители на FVL( 38.15 г. срещу 32.43 г.;  $\chi^2=4.347$ ,  $p=0.037$ ), (Фиг 23 А, В и С).

Не бяха открити значителни разлики за преживяемостта до инцидент/по-ранен инцидент на ДВТ в обща група пациентите над 45 години.

#### 4.3.3. Повтарящи се/рекурентни събития на ВТЕ

Повтарящо се/рекурентно събитие на ВТЕ е изключително важен фактор с оглед съответстваща стратегия за лечение и профилактика. Рекурентността на ДВТ инциденти при носители на фактор Leiden е една от най-много оспорвани и дискутирани теми.

Честотата на повтарящи се инциденти на ДВТ и БЕ в обща група пациенти бе 35.4% (15.1% при неносители), и бе по-висока при жените в сравнение с мъжете 38.5% и 31.3% съответно. Общо при пациенти носители на FVL полиморфизъм, честотата на повтарящи се тромботични инциденти бе значително и сигнификантно по-висока спрямо не носители на FVL ( $\chi^2 = 6.747$ ,  $p=0.017$ , OR = 2.559,  $p = 0.011$ ).



Фигура 24. Крос табулации за риск от рекурентен инцидент на ДВТ, (А) в обща група пациенти, (В) мъже и (С) жени, носители и неносители на FVL

Сигнификантно по-висок е и рискът от повтарящ се инцидент при жените носители и особено при младите жени ( $\chi^2=5.252$ ,  $p=0.022$ ;  $OR=2.917$ ,  $p=0.026$ ). (Таблица 27).

**Таблица 25. Pearson Chi-Square ( $\chi^2$ ), Odds ratio и p (Sig) за риск от рекурентен инцидент на ДВТ, в група пациенти, носители и неносители на полиморфизъм FVL**

Статистически стойности за рекурентни инциденти при носители на FVL	Носителство при пациенти %	Pearson $\chi^2$	Fisher's Exact Test (p)	OR	95% Конфиденциален интервал	(p)
FVL Мъже	31.3%	1.804	0.179	2.178	0.905-7.260	0.151
FVL Жени	38.5%	5.252	0.022	2.917	1.883 -8.636	0.026
FVL Общо	35.4%	6.747	0.017	2.559	0.987 -6.092	0.011

#### 4.3.3.1. Интервал преди рекурентно събитие

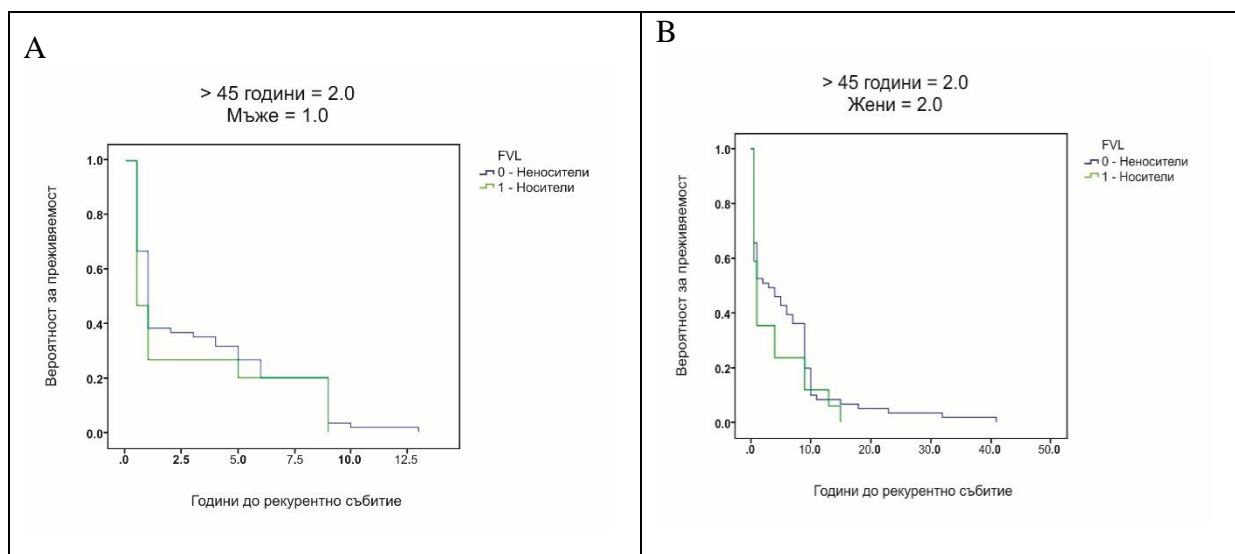
При анализиране на вероятност за по-ранен рекурентен епизод при носители и неносители на FVL полиморфизъм не бе намерена сигнификантна разлика в интервала преди следващото събитие в подгрупите на мъжете и общо пациентите. Обаче при жените разликата бе значима и близка до сигнификантност ( $\chi^{2B}=3.113$ ,  $p=0.078$ ). (Таблица 26).

**Таблица 26. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за преживяемост до рекурентен инцидент на ДВТ, в група пациенти мъже и жени, носители и неносители на полиморфизъм FVL**

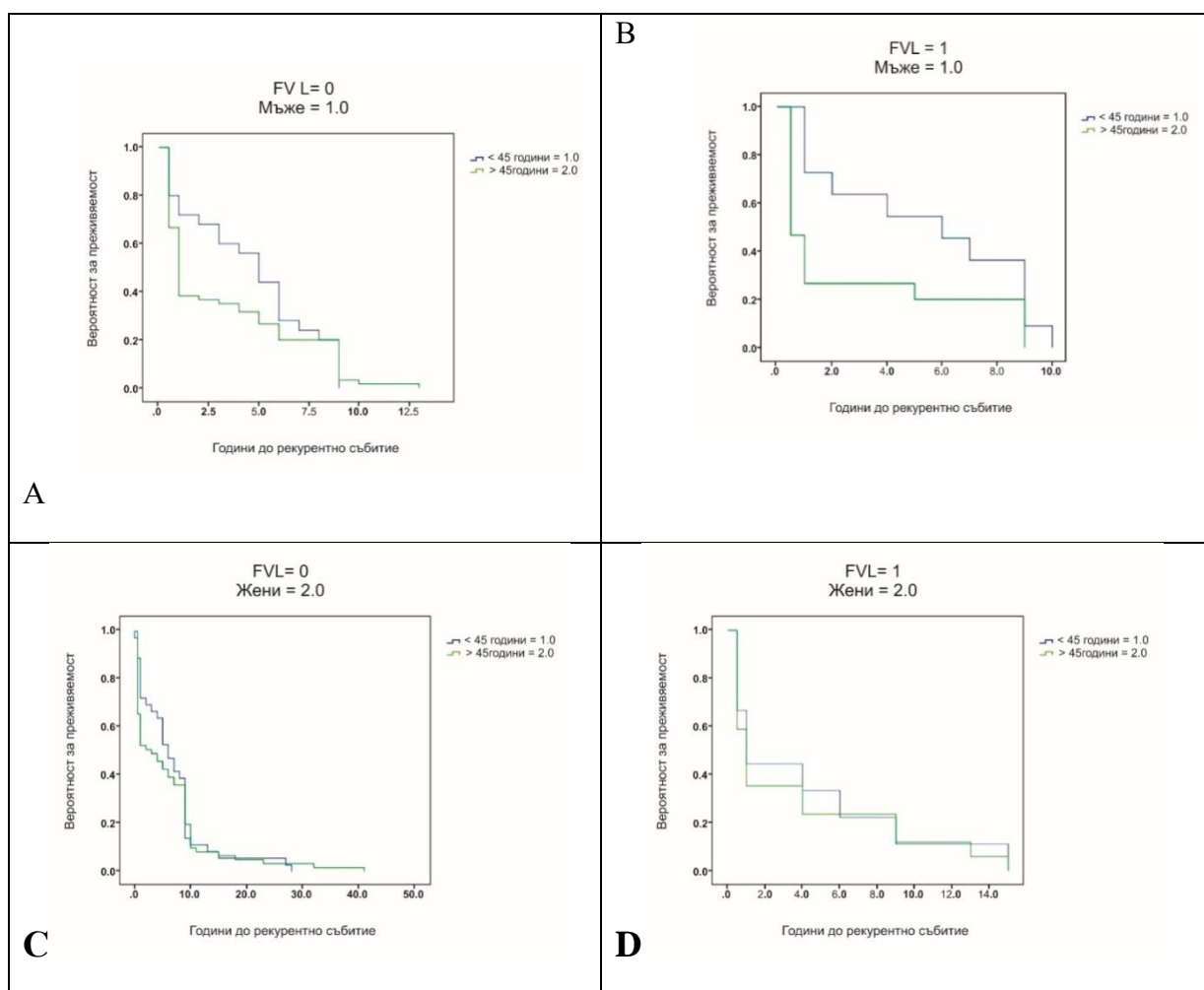
Пол	Общо сравнение	Chi-Square	df	Sig.
<b>Общо</b>	Log Rank (Mantel-Cox)	1.369	1	.242
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.716	1	.190
<b>Мъже=1</b>	Log Rank (Mantel-Cox)	.137	1	.712
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	.016	1	.901
<b>Жени=2</b>	Log Rank (Mantel-Cox)	2.531	1	.112
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	3.113	1	.078

При анализиране на възрастова зависимост (над и под 45 години) на вероятност на по-ранен рекурентен епизод при носители и неносители на FVL полиморфизъм не бе намерена сигнификантна разлика в интервала преди следващото събитие, нито в подгрупите на мъжете нито на жените,

нито общо при пациентите. Обаче при жените разликата бе значима и близка до сигнификантност ( $\chi^2_{B}=2.356, p=0.096$ ).



**Фигура 25 А.** Вероятността за преживяемост до рекурентен ДВТ инцидент на пациенти: мъже (А) и жени (В) над 45 години, носители и неносители на FVL



**Фигура 25 В.** Вероятността за преживяемост до рекурентен инцидент на ДВТ при пациенти под 45 години срещу над 45 години: мъже (А и В) и жени (С и D) неносители (А и С) и носители (В и D) на FVL

При анализиране във всяка една подгрупа на млади спрямо по-възрастните пациенти, намерихме сигнификантно по-малък интервал при млади мъже носители **на полиморфизъм FVL** в сравнение с по-възрастните мъже носители ( $\chi^2=3.546$ ,  $p=0.060$ ,  $\chi^2_B=6.421$ ,  $p=0.011$ ). (Таблица 25)

**Таблица 27. към фигура 40 В Вероятността за преживяемост до повтарящ се / рекурентен инцидента на ДВТ (Chi-Square) при пациенти под 45 години срещу над 45 години: мъже и жени, неносители и носители на полиморфизъм FVL**

Пол	FVL	Общо сравнение			
		на пациенти под и над 45 години	Chi-Square	df	Sig.
Мъже=1	0	Log Rank (Mantel-Cox)	.770	1	<b>.380</b>
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	3.168	1	<b>.075</b>
	FVL =1	Log Rank (Mantel-Cox)	3.546	1	<b>.060</b>
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	6.421	1	<b>.011</b>
Жени=2	0	Log Rank (Mantel-Cox)	.136	1	<b>.712</b>
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.759	1	<b>.185</b>
	FVL =1	Log Rank (Mantel-Cox)	.119	1	<b>.730</b>
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.173	1	<b>.678</b>

#### 4.3.4. Влияние на тютюнопушене върху риска за инциденти на ДВТ при пациенти носители и неносители на FVL полиморфизъм

При мъже пушачи с ДВТ, рискът от инцидент на ДВТ е по-висок отколкото при непушачите но не сигнификантно ( $\chi^2 = 2.048$ , OR = 4.500,  $p = >0.05$ ). При пациентите от женски пол, рискът при пушачите в сравнение с непушачите няма подобно значение, ( $\chi^2 = 0.343$ , OR = 2.100,  $p>0.05$ ).

**Таблица 28. Честота на ДВТ събития при мъже и жени, пушачи и непушачи, носители на FVL**

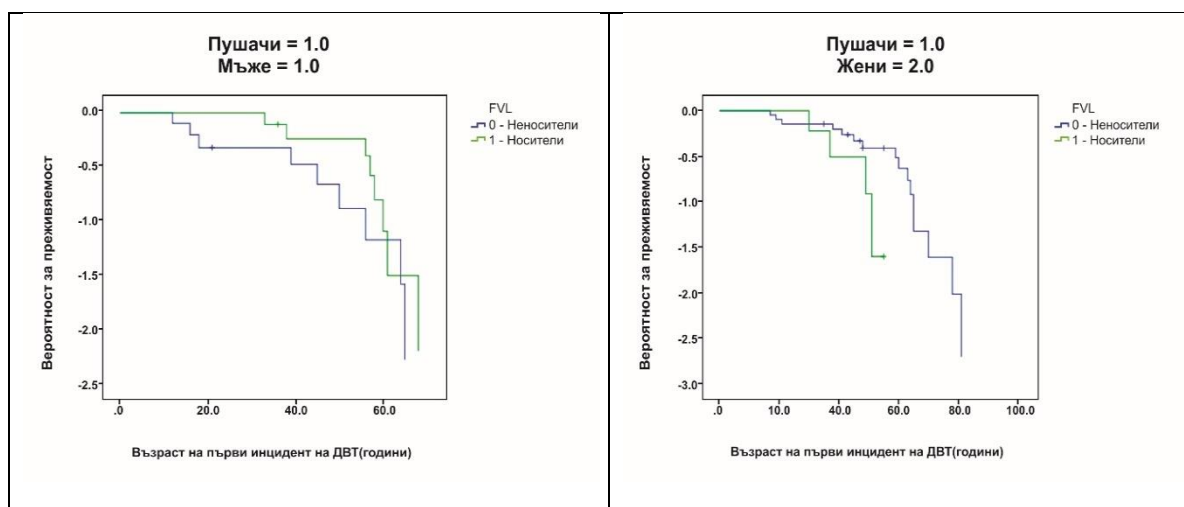
Пол	Общо сравнение (FVL, тютюнопушене)	Log Rank (Mantel-Cox) Chi-Square	Sig.	OR
Мъже	Пушачи	2.048	0.152	4.500 <b>0.177</b>
Жени	Пушачи	0.343	0.558	2.100 <b>0.556</b>

##### 4.3.4.1. Влияние на тютюнопушене върху риска за по-ранен инцидент на ДВТ при пациенти носители и неносители на FVL полиморфизъм

Тютюнопушенето намалява средната възраст на инцидента при неносителите на FVL, но при носителите няма подобен ефект, не се



наблюдава акумулативно действие на мутацията и тютюнопушенето. По-скоро се проявява само един рисков фактор. Таблица 29.



**Фигура 26. Вероятността за преживяемост до инцидента на ДВТ при пациенти мъже (А) и жени(В), пушачи и непушачи**

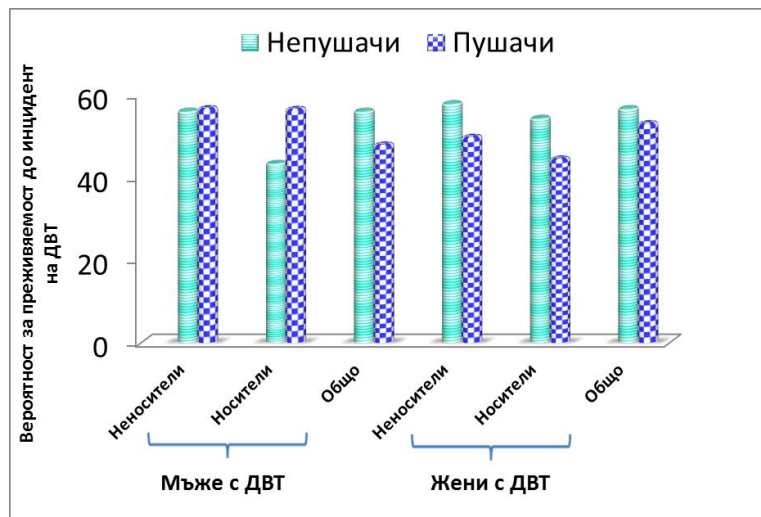
Вероятността за времеви интервал до първи инцидент на ДВТ при мъжете и жените се различава.

**Таблица 29. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за инцидент на ДВТ (50% вероятност), в обща група мъже и жени носители и неносители на полиморфизъм, пушачи и непушачи**

Тютюнопушене		Общо сравнение по FVL		
		Chi-Square	df	p (Sig.)
<b>0</b>	Log Rank (Mantel-Cox)	3.029	1	.082
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	6.930	1	.008
<b>1</b>	Log Rank (Mantel-Cox)	.055	1	.815
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	.040	1	.842

При жените тютюнопушенето намалява възрастта на инцидента и при носителите и при неносителите на FVL, но не се постига сигнификантност ( $\chi^2= 2.512$ ,  $p=0.113$  при носители и пушачи,  $\chi^2=2.055$ ,  $p=0.152$  неносители и пушачи). При мъжете самото носителство на FVL намалява възрастта, но не и при пушачите ( $\chi^2 = 1.530$ ,  $p^B = 0.216$ ).

Вероятността за по-ранен инцидент на ДВТ мъже пушачи е висока само при носители на FVL, и то само по Breslow (в по-млада възраст), но не сигнификантно.



**Фигура 27.** Средни стойности на 50% вероятност за възрастта на инцидент на ДВТ, при мъже и жени, носители или неносители на FVL полиморфизъм, пушачи и непушачи.

#### ***4.3.4.2. Влиянието на тютюнопушене върху риска за по-ранно развитие на ДВТ инцидент при пациенти носители и неносители на FVL полиморфизъм (Kaplan-Meier) във възрастови подгрупи под 45 години и над 45 години***

Вероятността за инцидент на ДВТ при мъжете пушачи и непушачи е по-висока при носители на FVL спрямо неносители, но само при по-млади пациенти <45 години (сигнификантно за непушачи и несигнификантно за пушачи ( $\chi^2 = 4.232$ ,  $p = 0.04$  срещу  $\chi^2 = 2.504$ ,  $p = 0.114$ ). Вероятността за интервала до първи инцидент на ДВТ при мъже пушачи не е значима при мъже над 45 години.

Вероятността за по-ранен инцидент на ДВТ при жените пушачи е по-висока при носители на FVL спрямо неносители, но само при по-млади пациенти < 45 години и несигнификантно ( $\chi^2 = 2.527$ ,  $p = 0.112$ ), но не и в групата на по-възрастни пациенти.

#### ***4.3.4.3. Влияние на тютюнопушене върху риска за по-ранно развитие на рекурентен ДВТ инцидент при пациенти носители и неносители на FVL полиморфизъм***

Вероятността за по-кратък интервал преди повтарящ се епизод е сигнификантно по-висока при пушачи в обща група пациенти (4.469 г.  $\pm$  1.040 г.) срещу непушачи (6.279 г.  $\pm$  0.483 г.) ( $\chi^2 = 4.426$ ,  $p^B = 0.035$ ) при

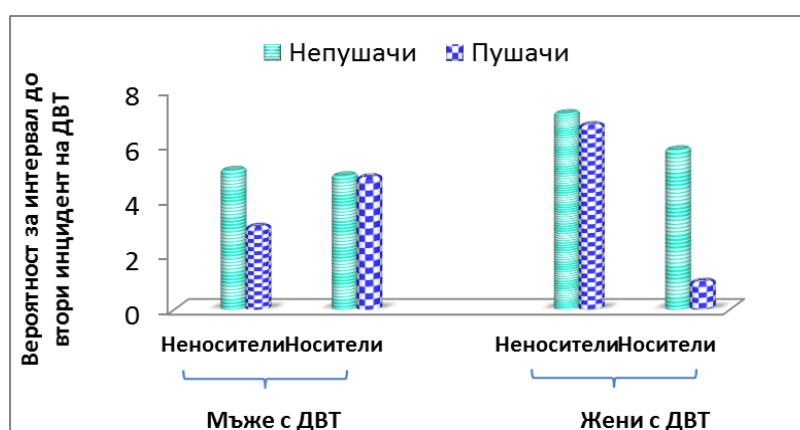
неносители на FVL. При носители на FVL ( $5.450 \pm 1.104$ ) срещу  $4.429 \pm 1.616$ ) разликата е малка, и не е значима (Таблица 30, Фиг. 28).

**Таблица 30. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за 50% вероятност за инцидент на ДВТ в обща група пациенти носители и неносители на FVL полиморфизъм, пушачи и непушачи.**

Тютюнопушене		Общо сравнение	Chi-Square	df	p (Sig)
0	Log Rank (Mantel-Cox)		.187	1	.666
	Breslow (Generalized Wilcoxon)		1.014	1	.314
1	Log Rank (Mantel-Cox)		.076	1	.782
	Breslow (Generalized Wilcoxon)		.072	1	.789

Test of equality of survival distributions for the different levels of FV.

\*Непушачи = 0, Пушачи = 1



**Фигура 28. Средни стойности (50% вероятност) за интервал до рекурентен инцидент на ДВТ при мъже и жени, пушачи и непушачи, носители или неносители на FVL.**

Връзката между вероятността за по-кратък интервал преди повтарящ се епизод (години) и ефекта тютюнопушенето при носители на FVL полиморфизъм е разгледана в подгрупите на жени и мъже с ДВТ.

При жените комбинирания ефект на носителство на FVL полиморфизъм и тютюнопушенето значително намалява интервала до рекурентния епизод, но не сигнификантно ( $\chi^2 = 2.167$ ,  $p=0.100$ ).

При пациентите пушачи, от мъжки пол, вероятността за по-кратък интервал преди повтарящ се епизод ДВТ е по-висока при пушачи неносители, в сравнение с пушачи носители.

#### 4.3.5. Влияние на затлъстяване върху вероятността за по-ранен инцидент на ДВТ при пациенти носители и неносители на FVL полиморфизъм

При пациенти мъже с наднормено тегло и затлъстяване, вероятността за ДВТ също е по-висока, и е с по-късна проява на събитието ( $\chi^2 = 4.038$ ,  $p = 0.052$ ) в сравнение с пациентите от мъжки пол, които са с нормално тегло. При жени носители на полиморфизма, ефектът е подобен (Таблица 31).

В обща група пациенти с наднормено тегло и затлъстяване се наблюдава по-късна проява на събитието при пациенти с ДВТ (53.233 год. спрямо 58.541 год.;  $\chi^2$  B= 4.557,  $p^B = 0.032$ ) която е със сигнификантна разлика (по Breslow).

**Таблица 31. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank за риск от инцидент на ДВТ, в групи мъже и жени носители и неносители на FVL полиморфизъм, наднормено и нормално тегло.**

Пол	Наднормено тегло	Общо Сравнение FVL	Chi-Square	Sig.	OR	
Мъже=1	Наднормено= 1		4.038	0.042	7.500	<b>0.052</b>
Жени=2	Наднормено =1		.316	.574	1.625	<b>0.556</b>

##### 4.3.5.1. Влияние на затлъстяване върху вероятността за по-ранен инцидент на ДВТ при пациенти носители и неносители FVL полиморфизъм с наднормено тегло

**Таблица 32. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за преживяемост до инцидента на ДВТ, в групи група пациенти със затлъстяване и нормално телесно тегло, носители и неносители на FVL.**

FVL Общо Сравнение		Chi-Square	df	Sig.
FVL=0	Log Rank (Mantel-Cox)	2.024	1	.155
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	4.577	1	.032
FVL=1	Log Rank (Mantel-Cox)	.715	1	.398
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	.422	1	.516

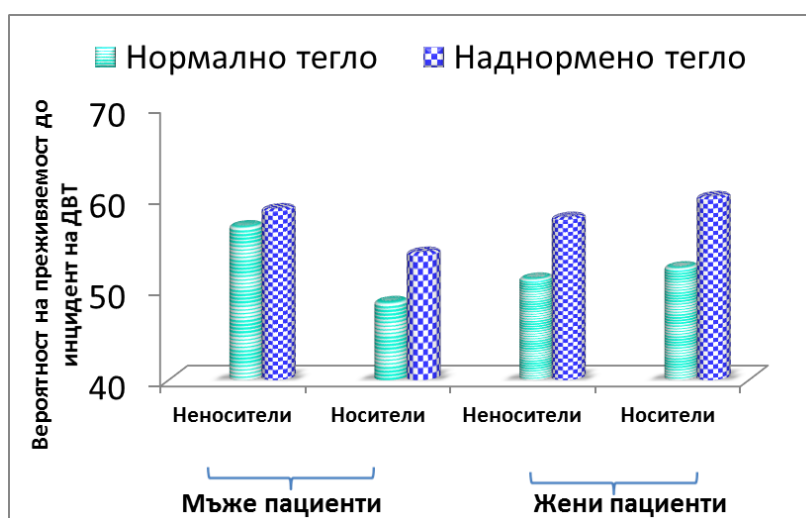
**Таблица 33. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за преживяемост до инцидента на ДВТ, в групи група пациенти мъже и жени, носители и неносители на полиморфизъм FVL, със затлъстяване и нормално телесно тегло.**

Пол			Chi-Square	df	Sig.
Мъже=1	0	Log Rank (Mantel-Cox)	.033	1	.856
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.099	1	.754
	FVL=1	Log Rank (Mantel-Cox)	.033	1	.856
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.297	1	.586
Жени=2	0	Log Rank (Mantel-Cox)	2.750	1	.097
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	4.259	1	.039
	FVL=1	Log Rank (Mantel-Cox)	1.570	1	.210
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.260	1	.610

Test of equality of survival distributions for the different levels of Затлъстяваненаднормено.

При пациенти с наднормено тегло и носители на FVL полиморфизъм носителството допринася за по ранна проява на ДВТ инцидент (50.785 срещу 55.929,  $p > 0.05$ ) но без сигнификантна разлика (Таблица 32).

Вероятността за по-ранна проява на ДВТ инцидент е сигнификантно по-висока при жени със затлъстяване, неносители на FVL полиморфизъм, но е несигнификантно по-висока при жени със затлъстяване, които са носители на FVL полиморфизъм (Фиг.29, Таблица 33).



**Фигура 29. Средни стойности на 50% вероятност за възрастта на инцидент на ДВТ, при мъже и жени с нормално и наднормено тегло, носители или неносители на FVL полиморфизъм.**

**4.3.5.2. Влияние на затлъстяване върху вероятността за по-малък интервал преди рекурентен инцидент на ДВТ при пациенти носители и неносители на FVL полиморфизъм с наднормено тегло.**

Вероятността за по-кратък интервал преди повтарящ се епизод (години) е по-висока в обща група пациенти с наднормено тегло неносители на FVL полиморфизъм ( $\chi^2=4.863$ ,  $p=0.027$ ), и несигнификантно по-висока в група на носителите ( $\chi^2 = 2.327$ ,  $p = 0.107$ .) (Таблица 34, Фиг. 29).

**Таблица 34. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за преживяемост до рекурентен инцидент на ДВТ, в група пациенти , носители и неносители на полиморфизъм FVL, със затлъстяване и нормално телесно тегло.**

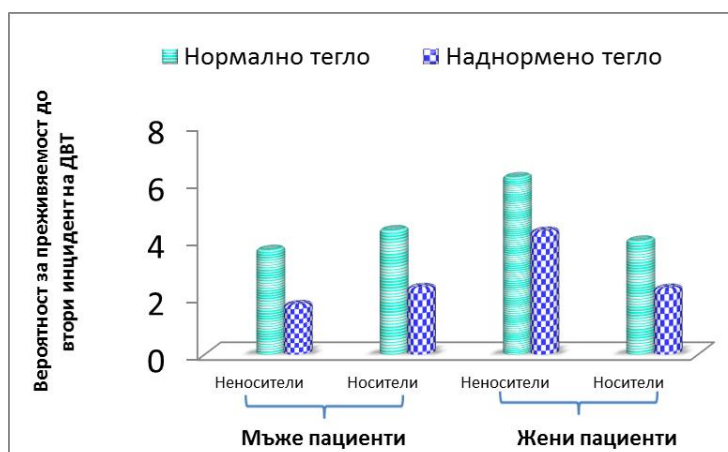
FVL	Общо сравнение Нормално и наднормено телесно тегло.	Chi-Square	df	Sig.
0	Log Rank (Mantel-Cox)	4.863	1	.027
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	9.450	1	.002
FVL=1	Log Rank (Mantel-Cox)	2.327	1	.107
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.617	1	.203

При пациентите от мъжки пол с наднормено тегло, вероятността за по-кратък интервал преди повтарящ се епизод ДВТ е малко по-висока, но несигнификантно в сравнение с това на пациентите с нормално телесно тегло, при носителите на полиморфизъм ( $\chi^2 = 1.474$ ,  $p=0.225$ ) и при, неносители ( $\chi^2 = 1.726$ ,  $p=0.189$ ) (Таблица 35).

**Таблица 35. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за преживяемост до рекурентен инцидент на ДВТ, в група пациенти мъже и жени, носители и неносители на FVL, със затлъстяване и нормално телесно тегло.**

Пол	FVL	Общо сравнение Нормално и наднормено телесно тегло	Chi-Square	df	Sig.
Мъже=1	0	Log Rank (Mantel-Cox)	1.726	1	0.189
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	2.087	1	0.149
	FVL=1	Log Rank (Mantel-Cox)	1.474	1	0.225
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	0.780	1	0.377
Жени=2	0	Log Rank (Mantel-Cox)	2.727	1	0.099
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	7.608	1	0.006
	FVL=1	Log Rank (Mantel-Cox)	1.067	1	0.302
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.058	1	0.304

Докато при пациенти от женски пол с наднормено тегло, носители на FVL, влиянието на високо телесно тегло е добре изразено, но не сигнификантно ( $\chi^2 = 2.727$ ,  $p=0.099$ ), особено в млада възраст ( $\chi^2^B = 7.608$ ,  $p^B=.006$ ) (Таблица 35). Обаче при жените с носителство на FVL полиморфизъм и наднормено тегло комбинирания ефект е значително по-нисък ( $\chi^2 = 1.067$ ,  $p=0.302$ ), (Табл. 35, Фиг. 30 ).



Фигура 30. Средни стойности и стандартна грешка за 50% вероятност за интервал до повтарящ се инцидент на ДВТ при мъже и жени с нормално и наднормено тегло, носители или неносители на FVL полиморфизъм.

#### 4.3.6. Влиянието на хормонална терапия и акушерска анамнеза за по-ранно развитие на ДВТ инцидент при пациенти носители и неносители на FVL полиморфизъм (Kaplan-Meier)

Таблица 36. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за преживяемост до инцидента на ДВТ, в групи група жени на хормонална терапия, носители или неносители на FVL полиморфизъм.

Пол	FVL Общо сравнение		Chi-Square	df	Sig.
	Хормонална терапия				
Жени	0	Log Rank (Mantel-Cox)	0.324	1	0.569
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.000	1	.993
	FVL=1	Log Rank (Mantel-Cox)	19.000	1	.000
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	19.000	1	.000

При жени пациенти носители на FVL, които бяха и на хормонална терапия, вероятността за ДВТ е с много по-ранна проява на събитието ( $\chi^2=19.00$ ,  $p=0.000$ ) в сравнение с пациентите от женски пол, които не са на

хормонална терапия (Таблица 36), обаче при пациенти неносители на полиморфизма, тази разлика не е значима. ( $\chi^2 = 0.324$ ,  $p = 0.569$ )

**Таблица 37. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за преживяемост до инцидента на ДВТ, в групи група жени с акушерска анамнеза, носители или неносители на FVL полиморфизъм.**

Пол	FVL Общо сравнение За акушерска анамнеза		Chi-Square	df	Sig.
Жени	0	Log Rank (Mantel-Cox)	23.948	1	.000
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	23.932	1	.000
	FVL=1	Log Rank (Mantel-Cox)	12.680	1	.000
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	12.291	1	.000

При жени пациенти носители на FVL полиморфизъм с акушерска анамнеза, вероятността за по-ранна проява на инцидента на ДВТ е по-голяма ( $\chi^2 = 12.680$ ,  $p = 0.000$ ) в сравнение с пациентите от женски пол, които не са имали проблеми около бременността или раждането (Таблица 37).

**Таблица 38. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за преживяемост до инцидента на ДВТ, в групи група жени с акушерска анамнеза, носители или неносители на FVL полиморфизъм.**

Пол	Възраст (год)	FVL Общо сравнение За акушерска анамнеза		Chi-Square	df	Sig.
Жени	<45	0	Log Rank (Mantel-Cox)	2.033	1	0.154
			Breslow (Generalized Wilcoxon)	2.565	1	0.109
		1.0	Log Rank (Mantel-Cox)	2.598	1	0.107
			Breslow (Generalized Wilcoxon)	2.400	1	0.121
	>45	0	Log Rank (Mantel-Cox)	5.484	1	0.019
			Breslow (Generalized Wilcoxon)	7.578	1	0.006
		1.0	Log Rank (Mantel-Cox)			
			Breslow (Generalized Wilcoxon)			

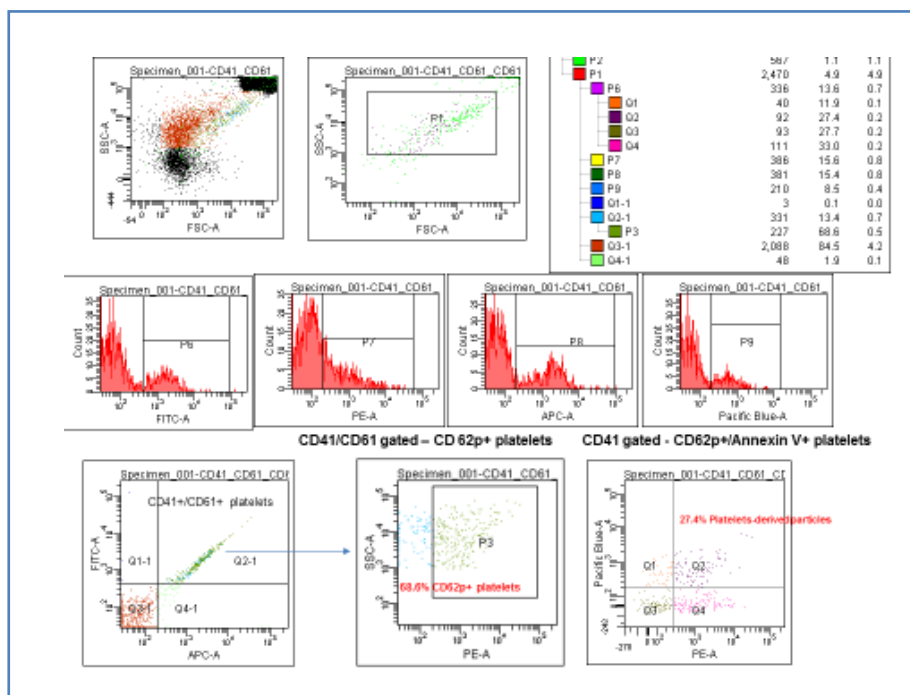
При жени неносители на FVL полиморфизъм с проблеми около бременността и/или раждането тази разлика е още по-голяма. ( $\chi^2=23.948$ ,  $p=0.000$ ).



### 4.3.7. Флоуцитометрично изследване на активността на тромбоцитите изолирани от контрола носител на полиморфизъм FVL

Тромбоцитите изолирани от пациенти с ДВТ носители на полиморфизъм FVL са изследвани с флоуцитометричен анализ. Пробите съдържат смес от активирани тромбоцити и такива в покой (фиг. 31).

Двойната положителна популация CD41/CD62P (Q2) се характеризира като активирани тромбоцити с MCFI индекс.



Фигура 31. Скатер диаграма на флоуцитометрично изследване на тромбоцитите изолирани от пациенти с ДВТ носител на FVL. Тромбоцитите са белязани с античовешки моноклонални антители: античовешки CD41, FITC HIP8; Античовешки CD61 (Интегрин бета 3) APC (V); Античовешки CD62P PE (K-4).

От 30 проби анализирани с флоуцитометричен анализ трима пациенти са били носители на FVL. Прави впечатление по-ниският процент тромбоцити (13.4% позитивни по CD41 и CD61) при пациент носител на FVL, представен на скатер диаграмата. За сметка на това се наблюдава високата степен на активиране на тромбоцитите (68.6%).

При пациенти носители на FVL процента на частиците също е висок в сравнение с пациенти неносители на FVL със ДВТ и на базата на по-малкия процент CD41 позитивни клетки. Тромбоцитните частици са

27.4%, изчислени на базата на процента CD41(13.6%) позитивни клетки, позитивни за CD62p и Annexin V.

#### **4.3.8. Изследване на морфологичните и механичните особености на тромбоцитите, чрез АСМ при здрави индивиди и пациенти с ДВТ. Промени в морфологията и наномеханиката на тромбоцитите при FVL**

Основните цитоскелетни процеси на ремоделиране в тромбоцитите при активиране и тяхното наномеханично взаимодействие с околната среда са все още недостатъчно изследвани, поради ограниченията за морфологична и механична оценка на функцията на тромбоцитите.

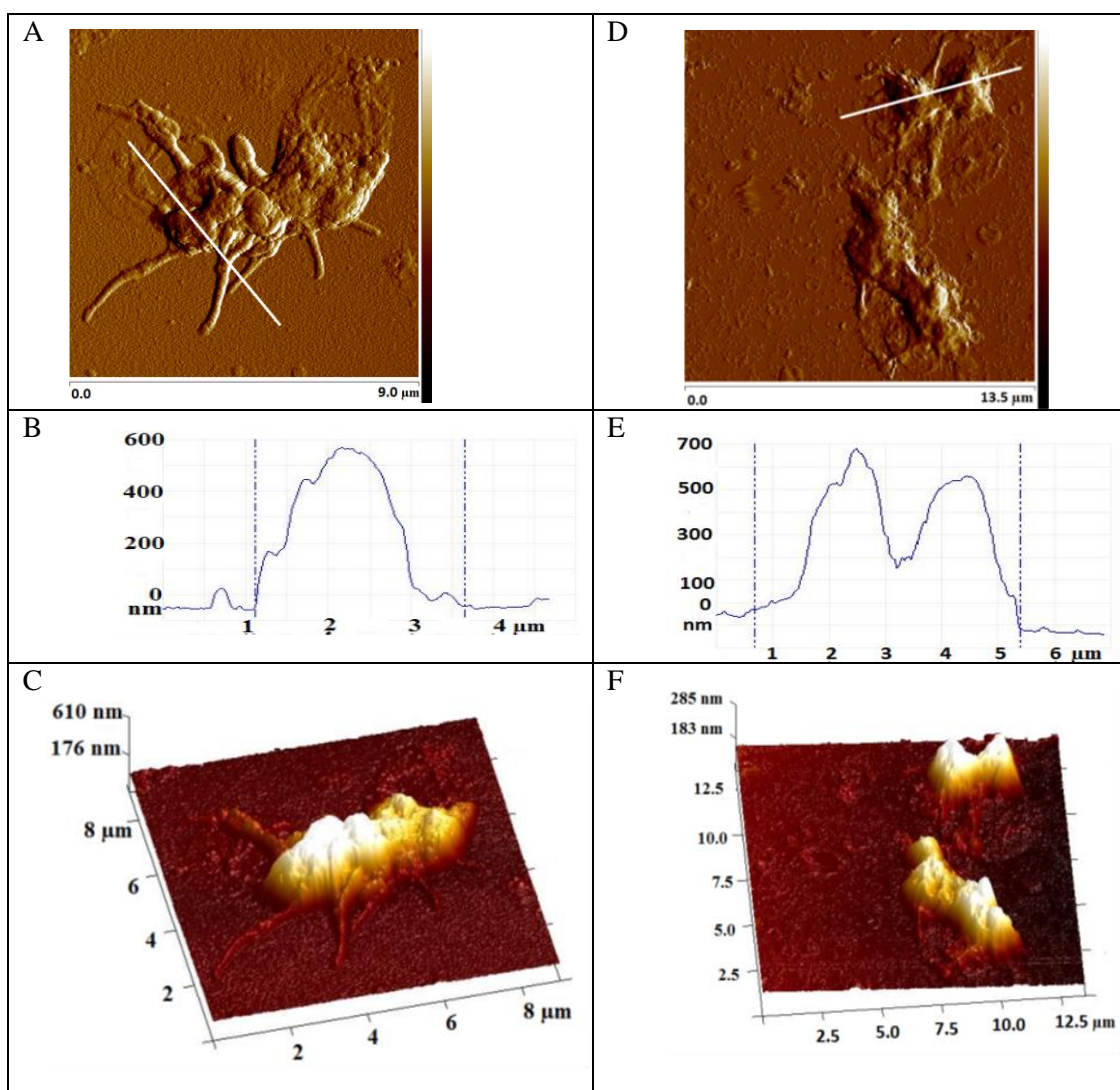
##### ***4.3.8.1. Топография на тромбоцитите на здрави контроли и пациенти с ДВТ***

При активиране тромбоцитите претърпяват редица морфологични промени, преминаващи през няколко фази, които се окачествяват с определени морфологични характеристики. Носителството на определени полиморфизми се отразява върху процеса кръвосъсирването и вероятно допринася за активирането на тромбоцити. Изследваните тромбоцити от ДВТ пациенти имат сходни АСМ характеристики, за параметрите като височина, площ и грапавостта (Ra) на мембраната. При носителство на FVL средната площ на тромбоцитите, изолирани от ДВТ пациенти, носители на FVL е съответно  $4.86 \pm 1.6$  и  $4.67 \pm 1.7 \mu\text{m}^2$ , и е близка до тази на контролите.

Измерените височини на тромбоцити, изолирани от ДВТ пациенти имат сходни стойности, но отклонението от средната им стойност също е значително по-голямо при пациенти, носители на FVL. Предполагаме, че това вариране вероятно се дължи на обстоятелството, че отделните тромбоцити са в различна степен на активиране. При комбинираното носителство височината намалява още повече.

Друг важен параметър за състоянието на активиране на тромбоцитите е грапавостта (Ra) на мембраната, измерена в централната

част на тромбоцита, която отразява състоянието на тромбоцита. Ра има близки стойности за всички ДВТ пациенти (28 – 30nm). Тази стойност е значително по-ниска от измерената за здрави индивиди.



**Фигура 32.** АСМ изображения на тромбоцити, получени от ДВТ пациент -носител на FVL полиморфизъм (A) и скомбинирано носителство на FVL и PLA2 (D). Скалата е посочено във всеки панел. АСМ -2D профил (A, D) получен при сканиране XY площ 8x8  $\mu\text{m}^2$ , Z = 900nm. В рамките са представени уголемени снимки на централната зона. Напречно сечение (B, и E), съответства на бели линии в изображенията A и D. АСМ -3D топографски снимки (C, и F) на съответните тромбоцитите в изображения A и D .

#### 4.4. Значение на носителството на полиморфизъм 20210 G>A (rs1799963) в гена на протромбина - Фактор II при пациенти с ДВТ

Полиморфизъм 20210 G>A (rs1799963) в гена на протромбина (Фактор II) е втори по значимост тромбофиличен полиморфизъм. Roort и сътр. през 1996 г. установяват връзката между носителството на

полиморфизма и повишените нива на Фактор II (FII) в кръвта, което е причина за повишена склонност към тромбообразуване.

#### 4.4.1. Честотата на носителството 20210 G>A полиморфизъм

Носителството на 20210 G>A алел увеличава риска за венозна тромбоза от 2 до 5кратно при хетерозиготни носители. Хомозиготното носителство на полиморфизма 20210 G>A се среща много рядко. При пациенти с ВТЕ носителството на този полиморфизъм варира между 5% и 15%, стигайки 20 % при селектирани пациенти с фамилна тромбофилия. Нашите резултати за честотата на носителството при пациенти с ДВТ са от потвърдителен характер.

**Таблица 39. Средни стойности на носителство на 20210 G>A полиморфизъм, 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.**

Статистически стойности на носителство на 20210 G>A	Пациенти %	Контроли %	Pearson $\chi^2$	Fisher (p)	OR	95% Конфиденциален интервал	p
Мъже	11.2%	3.8%	3.339	.049	3.155	.868-11.464	0.032
Жени	9.4%	1.8%	6.183 <sup>c</sup>	.013	5.638	1.616-32.380	.013
Общо пациенти	10.2%	2.6%	9.542	.001	4.201	1.961- 11.569	.001
Мъже <45	11.1%	4.0%	1.631	0.198	3.00	0.719-17.356	0.220
Жени <45	12.8	1.4 %	6.648	0.010	10.390	1.208-8.934	0.033
Общо <45	12.0	2.5	7.647	0.006	5.434	1.448 -20.396	0.012
Мъже >45	11.3 %	3.8	0.694	0.363	2.408	0.287-20.208	0.418
Жени >45	7.2	2.6	1.068	0.282	2.961	0.344-2.548	0.323
Общо >45	9.3	3.4	2.127	0.144	2.928	0.649-13.213	0.167

Честотата на носителството на 20210 G>A бе намерена значително по-висока както в общата група пациенти ( $\chi^2 = 9.542$ , OR= 4.201, p = 0.001) така и при мъжете ( $\chi^2= 3.339$ , OR=3.155, p=0.049) и жените ( $\chi^2 =6.183$ , OR=5.638, p = 0.013) в сравнение с контролите (Таблица 39). Изчисленият риск от инцидента на ДВТ бе по-висок при млади мъже и жени (OR = 5.434, p = 0.012), носители на 20210 G>A, в сравнение с мъже и жени от по-

възрастната група, където рискът беше несигнификантен (OR=2.928, p=0.167).

Алелната честота по Hardy-Weinberg е представена в Таблица 40.

**Таблица 40. Генотип и алелни честоти на 20210 G>A полиморфизъм при пациенти и контроли съгласно Hardy-Weinberg.**

Алелни честоти	20210 А	20210 G	p
Контроли жени	4 (1.745)	226 (98.26%)	0.84953
Жени с ДВТ	12 (4.48%)	256 (95.52%)	0.5874
Контроли мъже	4 (1.92%)	204 (98.08%)	0.8215
Мъже с ДВТ	14 (5.6%)	236 (94.4%)	0.5072
Общо контроли	8 (1.83)	430 (98.17%)	0.7831
Общо пациенти	27 (5.23%)	489 (94.77%)	0.3751
Общо участници	35 (3.67%)	919 (96.33%)	0.4055

#### 4.4.2. Анализ Kaplan-Meier за вероятността от инцидент на ДВТ

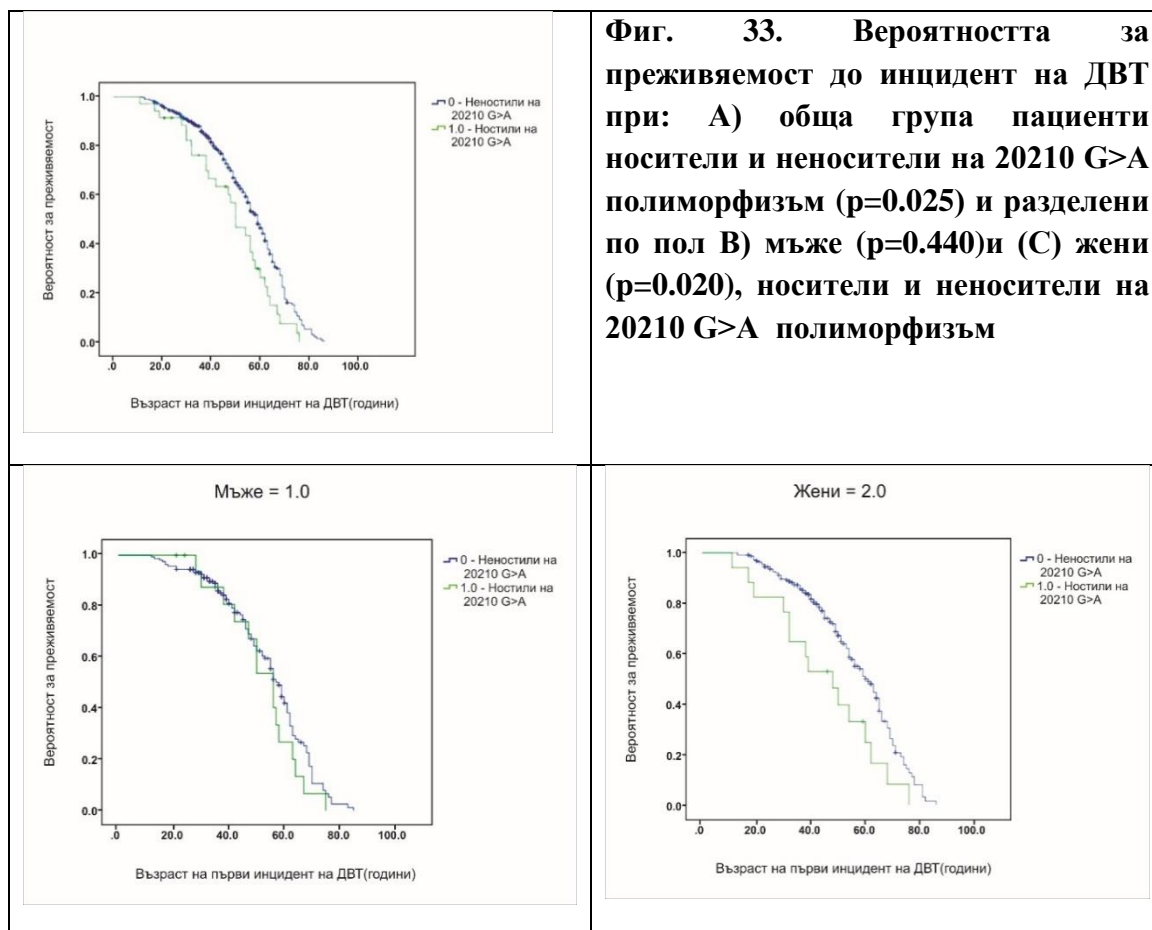
##### 4.4.2.1. Анализ Kaplan-Meier за вероятността за „преживяване“ преди инцидент на ДВТ при мъже и жени.

С подхода Kaplan-Meier установихме значителната разлика между носители и неносители на 20210 G>A полиморфизъм за вероятността от по-ранна изява на ДВТ инцидент в обща група пациенти (49.270 г. срещу 55.859г.,  $\chi^2=5.023$ , p=0.025) и в групата на пациенти от женски пол (45.286г. срещу 56.862 г.,  $\chi^2 = 5.371$ , p=0.020) (Фиг. 33 А, Таблица 41).

**Таблица 41. Вероятността за преживяемост до инцидент на ДВТ,  $\chi^2$  и по Log Rank и Breslow в групи мъже и жени носители и неносители на FII20210 G>A**

Изследвани индивиди	Общо Сравнение			
	20210 G>A	Chi-Square	df	Sig.
Общо	Log Rank (Mantel-Cox)	5.023	1	0.025
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	4.312	1	0.038
Мъже	Log Rank (Mantel-Cox)	0.595	1	0.440
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	0.122	1	0.727
Жени	Log Rank (Mantel-Cox)	5.371	1	0.020
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	7.137	1	0.008

В групата на пациенти от мъжки пол не бе намерена сигнификантна разлика (52.922 г. срещу 54.598 г.,  $\chi^2 = 0.595$ , p = 0.440).

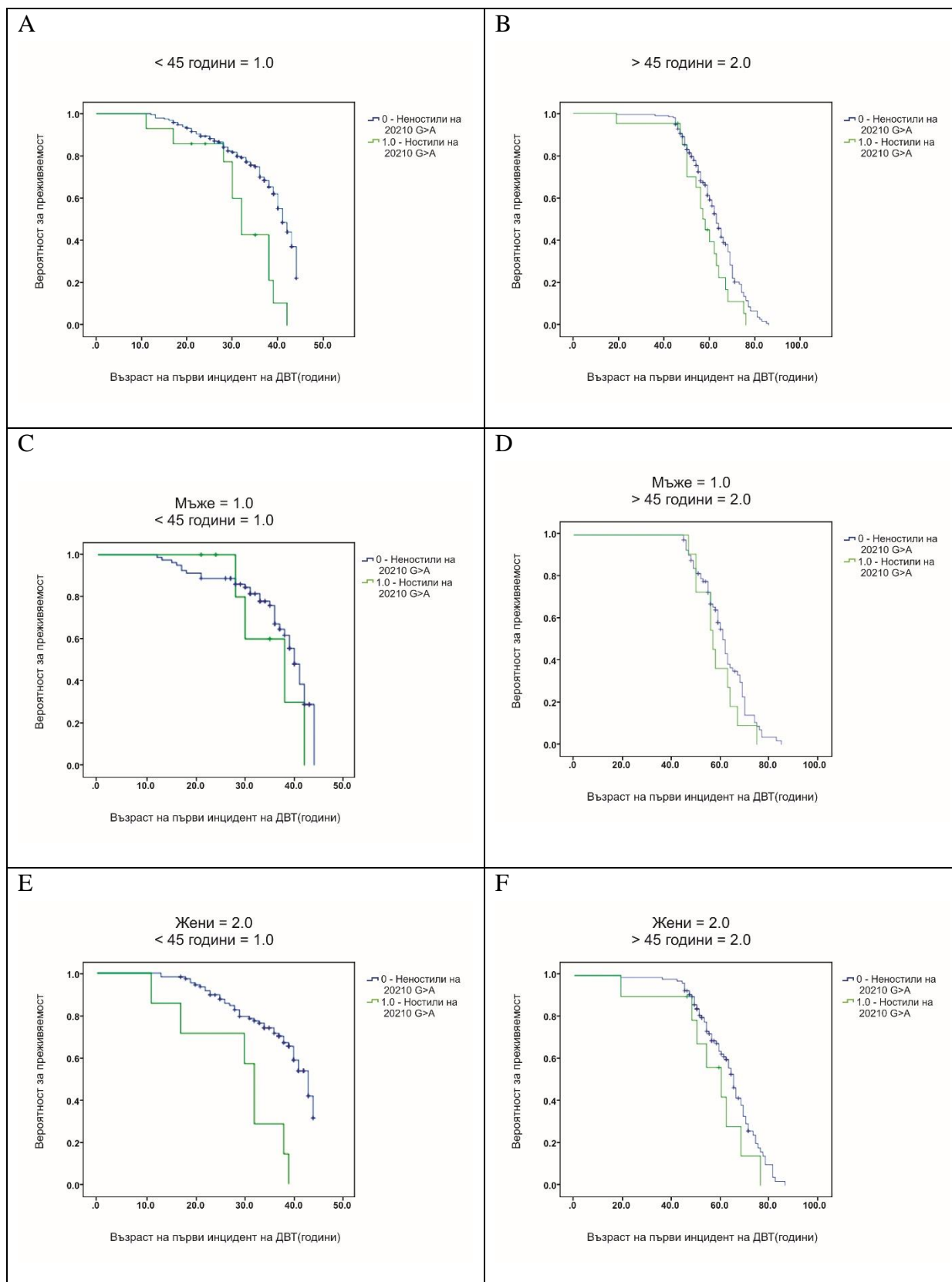


**Фиг. 33. Вероятността за преживяемост до инцидент на ДВТ при: А) обща група пациенти носители и неносители на 20210 G>A полиморфизъм ( $p=0.025$ ) и разделени по пол В) мъже ( $p=0.440$ )и (С) жени ( $p=0.020$ ), носители и неносители на 20210 G>A полиморфизъм**

#### 4.4.2.2. Анализ по Kaplan-Meier за вероятността от инцидент на ДВТ във възрастови подгрупи на пациенти под и над 45 години, носители и неносители на 20210 G>A

**Таблица 42. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и Sig.(p) по Log Rank и Breslow за инцидент на ДВТ (50% вероятност) в групи мъже и жени носители и неносители на 20210 G>A, разделени по възраст**

Възраст (год.)	Изследвани индивиди	Общо Сравнение	Chi-Square	Df	Sig.
<45=1	Общо	Log Rank (Mantel-Cox)	4.273	1	.039
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.765	1	.382
		Log Rank (Mantel-Cox)	1.921	1	.166
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.421	1	.233
<45=1	Мъже=1	Log Rank (Mantel-Cox)	1.189	1	.276
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.472	1	.492
	Жени=2	Log Rank (Mantel-Cox)	6.228	1	.013
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	4.198	1	.040
>45=2	Мъже=1	Log Rank (Mantel-Cox)	2.118	1	.146
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.925	1	.336
	Жени=2	Log Rank (Mantel-Cox)	.004	1	.952
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.138	1	.710



**Фиг. 34. Вероятността за преживяемост до ДВТ инцидент на пациенти под 45 години (А, С, Е) и над 45 години (В, D, F) носители и неносители на полиморфизъм 20210G>А в протромбиновия ген: (А и В) общо пациенти, (С) и D) мъже, (Е) и F) жени.**



Значителна разлика във вероятността за по-ранна проява на ДВТ бе намерена в общата група млади пациенти (под 45 години), носители на 20210G>A (37.614г. срещу 33.454 г.;  $\chi^2=4.273$ ,  $p=0.039$ ), а също така и подгрупа на млади жени носители на 20210G>A (37.795 г. срещу 31.333 г.,  $\chi^2=6.228$ ,  $p=0.013$ ) но не и в подгрупите на мъжете (35.60 г. срещу 37.171г.;  $\chi^2=1.189$ ,  $p=0.276$ ) (Фиг. 34 А, С и Е, Таблица 42). Не бе открита значителна разлика във вероятността за по-ранна проява на ДВТ инцидент в обща група пациенти над 45 години носители на 20210 G>А полиморфизъм (58.386г. срещу 62.541г.,  $\chi^2=1.9211$ ,  $p=0.166$ ).

#### 4.4.3. Повтарящи се/ рекурентни тромботични инциденти при носители на 20210 G >A

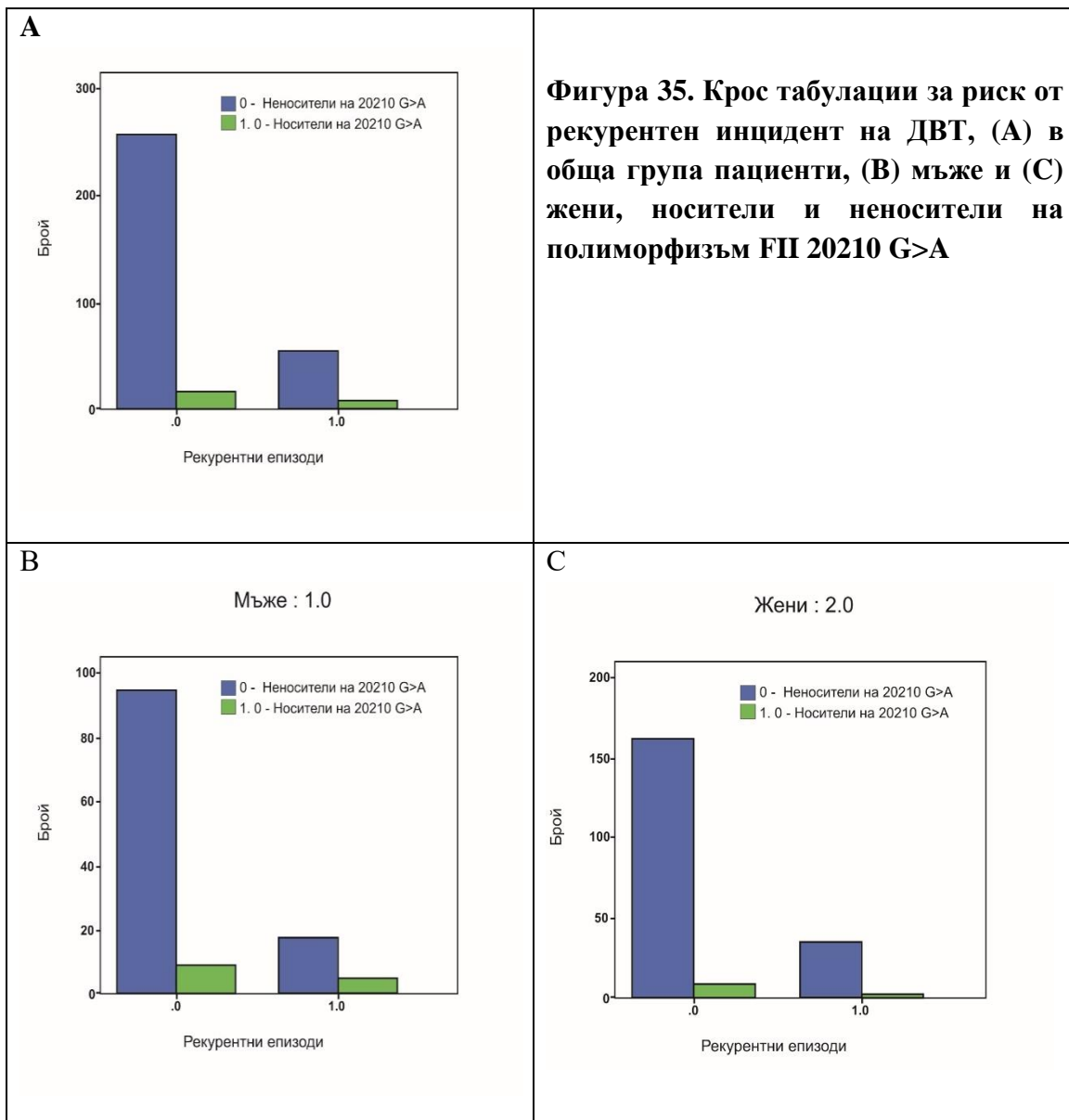
##### 4.4.3.1. Анализ на риска за рекурентен инцидент на ДВТ при мъже и жени.

Честотата на повтарящи се тромботични инциденти в обща група пациенти носители на 20210 G >A бе 12.26%, и бе значително по-висока при мъжете, отколкото при жените (21.7% спрямо 7.5%). Значително и сигнификантно беше по-висок и рискът от повтарящ се инцидент при мъжете носители на 20210 G >A в гена на протромбина ( $\chi^2=3.288$ , OR=2.932,  $p=0.032$ ), и особено при мъже над 45 години ( $\chi^2=3.122$ , OR=3.600,  $p=0.07$ ) (Таблицы 43).

**Таблица 43. Pearson Chi-Square ( $\chi^2$ ), Odds ratio и p (Sig) за риск от рекурентен инцидент на ДВТ, в група пациенти, носители и неносители на полиморфизъм 20210 G>A**

Статистически стойности на	Пациенти %	Pearson $\chi^2$	Fisher (p)	OR	95% Конфиденциален интервал	p
Мъже	21.8%	3.288	.070	2.932	.880-9.771	0.032
Жени	7.5%	0.509	.475	1.642	0.416-6.488	0.479
Общо пациенти	12.6%	3.145	0.072	2.199	0.904- 5.351	0.082
Мъже <45	11.1%	0.145	0.704	1.563	0.154-15.819	0.706
Жени <45	5.9%	0.143	0.706	1.917	0.187-19.593	0.583
Мъже >45	28.6 %	3.122	0.07	3.600	0.817-15.856	0.009
Жени >45	8.7	0.149	0.742	1.022	0.889-1.176	0.742



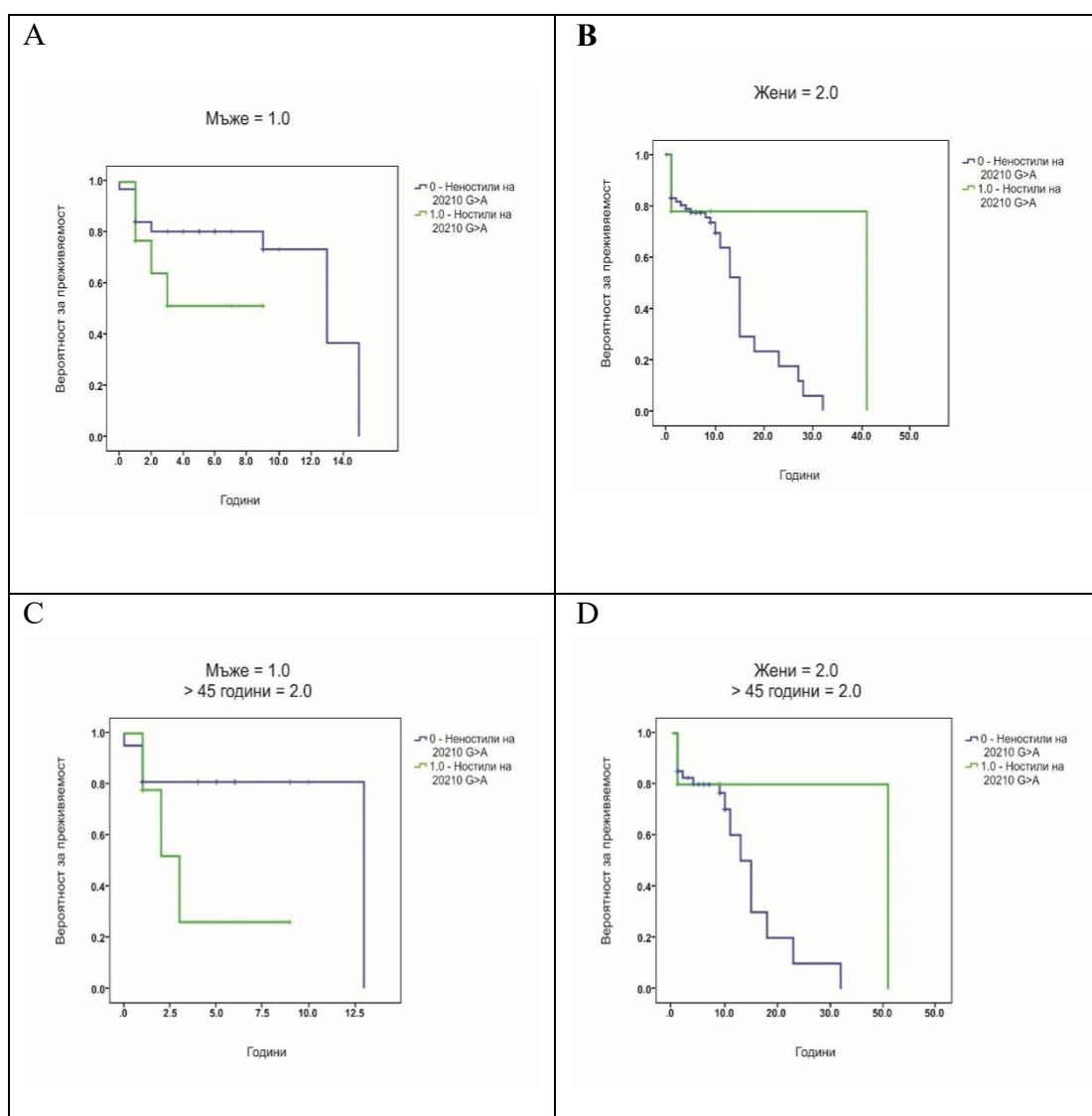


#### 4.4.3.2. Анализ по Kaplan-Meier за вероятността от рекурентен инцидент на ДВТ във възрастови подгрупи на пациенти мъже и жени, носители и неносители на 20210 G>A

При изследване на вероятността за по-кратък интервал до повтарящ се инцидент с анализ по **Kaplan-Meier** при пациенти носители на полиморфизъм 20210G>A в протромбиновия ген, значима разлика бе установена само при мъжете. Не бе намерена сигнификантна разлика в годините между инциденти на ВТЕ при жените, нито в общата група пациенти. Въпреки че в общата група пациенти Chi-Square ( $\chi^2$ )= 3.080 по Breslow има по-висока стойност, но не сигнификантна.

**Таблица 44. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и Sig.(p) по Log Rank и Breslow за рекурентен инцидент на ДВТ(50% вероятност), в групи мъже и жени носители и неносители на полиморфизъм.**

Пол събития	Общо сравнение на рекурентни	Chi-Square	df	Sig.(p)
Общо	Log Rank (Mantel-Cox)	0.672	1	0.412
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	3.080	1	0.079
Мъже=1	Log Rank (Mantel-Cox)	3.046	1	0.081
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	2.571	1	0.109
Жени=2	Log Rank (Mantel-Cox)	0.247	1	0.619
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	0.303	1	0.582



**Фигура 36. Вероятността за преживяемост до повтарящ се / рекурентен инцидент на ДВТ при пациенти е (А) мъже и (В) жени под (С) и над (D) 45 години, носители и неносители на полиморфизъм 20210 G>A**

При анализиране връзката между вероятността за преживяемост до рекурентен инцидент при пациенти носители на полиморфизъм 20210G>A и възрастта с Kaplan-Meier, бе установено, че само пациенти от мъжки пол над 45 години имат по-кратък интервал до рекурентен епизод, но несигнификантно. При жените над 45 години протромбиновия полиморфизъм не допринася за скъсяването на интервала, поскоро ефекта е противоположен. (Таблица 43 Фигура 36).

#### **4.4.4. Влияние на тютюнопушене върху инциденти на ДВТ при пациенти носители и неносители на 20210 G>A полиморфизъм**

При мъже с ДВТ, които са били пушачи, рискът от инцидент на ДВТ е по-висок отколкото при непушачите но не-сигнификантно ( $\chi^2 = 2.048$ , OR = 4.500,  $p > 0.05$ ). При пациентите от женски пол, рискът при пушачите няма подобно значение, в сравнение с непушачите ( $\chi^2 = 0.343$ , OR = 2.100,  $p > 0.05$ ). Това отчасти може да се дължи на сравнително малка група пациенти пушачи от една страна и ниска честота на полиморфизъма от друга страна.

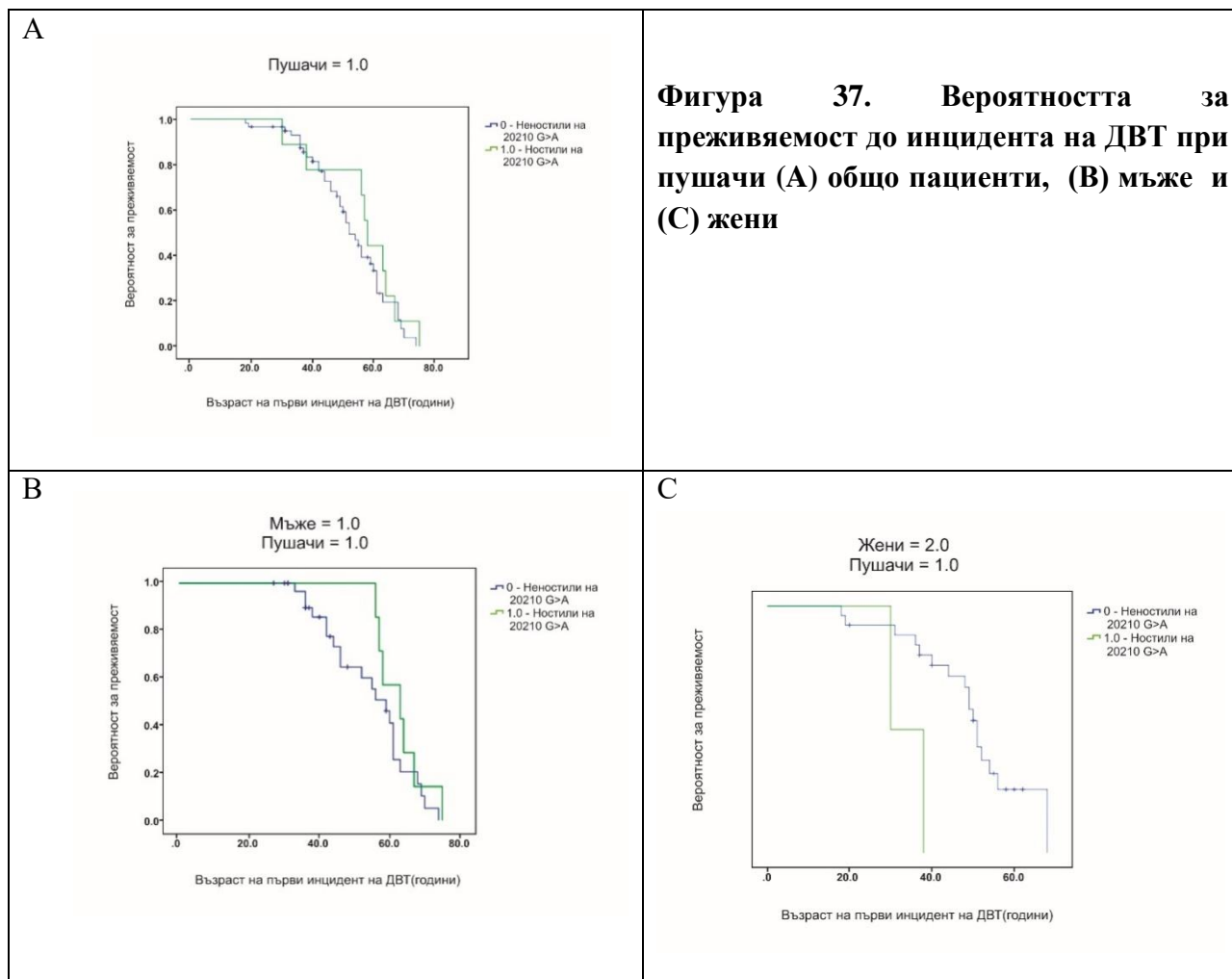
##### **4.4.4.1. Влияние на тютюнопушене върху риска за по-ранен инцидент на ДВТ при пациенти носители и неносители на 20210 G>A полиморфизъм**

При анализиране връзката между вероятността за преживяемост до ДВТ инцидент с Kaplan-Meier при всички пациенти пушачи, бе установено, че пациентите от женски пол пушачи имат по-ранна изява на инциденти ( $\chi^2 = 6.156$ ,  $p = 0.013$ ). При мъжете ефектът на тютюнопушене е по-слаб. (Таблица 45).

**Таблица 45. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и Sig.(p) по Log Rank и Breslow за 50% вероятност за инцидент на ДВТ, в група на пушачи мъже и жени**

Пол	Общо сравнение	Chi-Square	df	Sig.
1	Log Rank (Mantel-Cox)	.179	1	.672
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.903	1	.168
2	Log Rank (Mantel-Cox)	6.156	1	.013
	Breslow (Generalized Wilcoxon)	3.216	1	.073

**4.4.4.2 Влияние на тютюнопушене върху вероятността за по-ранно развитие на ДВТ инцидент при пациенти носители и неносители на 20210 G>A полиморфизъм (Kaplan-Meier)**



**Фигура 37. Вероятността за преживяемост до инцидента на ДВТ при пушачи (А) общо пациенти, (В) мъже и (С) жени**

**Таблица 46. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и Sig.(p) по Log Rank и Breslow за 50% вероятност за инцидент на ДВТ, в група на мъже и жени, носители и неносители на полиморфизъм пушачи и непушачи**

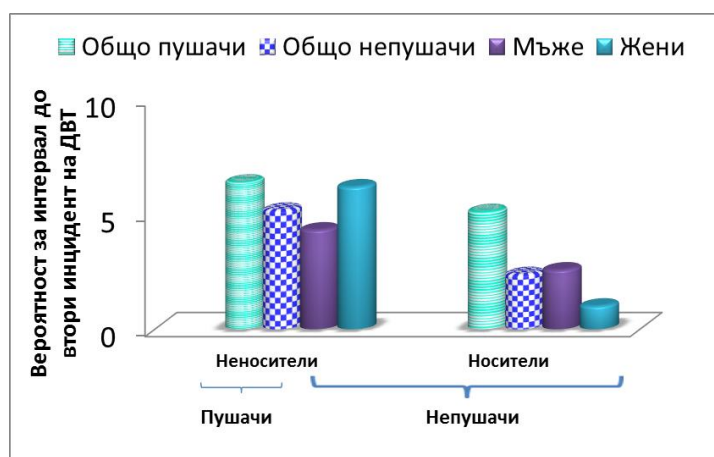
Пол	20210G>A	Общо сравнение по Тютюнопушене	Chi-Square	df	Sig.
Мъже	0	Log Rank (Mantel-Cox)	1.142	1	.285
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.147	1	.701
	20210G>A	Log Rank (Mantel-Cox)	6.206	1	.001
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	8.500	1	.001
Жени	0	Log Rank (Mantel-Cox)	2.911	1	.088
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.938	1	.333
	20210G>A	Log Rank (Mantel-Cox)	2.600	1	.107
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	1.852	1	.174

Test of equality of survival distributions for the different levels of тютюнопушене.

При пациенти от мъжки пол, пушачи, носители на 20210G>A спрямо непушачи разликата бе сигнификантна ( $\chi^{2B}=6.206$ ,  $p=0.001$ ). При пациенти пушачи неносители практически нямаше разлика с непушачи ( $\chi^{2B}=1.142$ ,  $p=0.285$ ) (Таблица 46). При пациенти от женски пол носители на 20210G>A и пушачи вероятността за по-ранен инцидент на ДВТ в сравнение с непушачи, бе несигнификантна ( $\chi^2=2.600$ ,  $p=0.107$ ) (Таблица 46), както и при неносителите ( $\chi^2=2.911$ ,  $p=0.088$ ).

Общо в подгрупите пациенти разделени по пол и по възраст се наблюдава тенденцията за по-ранно събитие при пациенти пушачи и носители на полиморфизъм.

#### 4.4.4.3 Влияние на тютюнопушене за развитие на рекурентен ДВТ инцидент при пациенти носители и неносители на 20210 G>A полиморфизъм



**Фигура 38.** Вероятност за по-кратък рекурентен инцидент на ДВТ ( 50%), в група на пушачи мъже и жени, във възрастови подгрупи, носители и неносители на полиморфизъм

Вероятността за по-кратък интервал от време преди рецидивиращ инцидент е по-висока в обща група пациенти носители на полиморфизъм 20210G>A. При мъжете пушачи носители в сравнение с непушачи интервала е също по-кратък.

При носителите на полиморфизъм FII 20210G>A интервалът между рекурентни събития е много малък, въпреки това още по-вече се скъсява при пациенти пушачи. При жени пушачи носители на 20210G>A имат

по-кратък интервал, но поради малобройната група на носителите, статистическата достоверност за данните не се постига. (Фигура 38. )

#### 4.4.5. Влияние (вероятност по Kaplan-Meier) на наднормено и нормално тегло върху риска за по-ранно развитие на ДВТ инцидент при пациенти носители и неносители на 20210 G>A

При пациентки със затлъстяване, вероятността за ДВТ е по-висока, но е с по-късна проява на събитието ( $\chi^2 = 8.821$ ,  $p = 0.003$ ) в сравнение с пациентите от женски пол, с нормално тегло (Таблица 47).

**Таблица 47. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и Sig.(p) по Log Rank и Breslow за 50% вероятност за инцидент на ДВТ, в група на носители и неносители на полиморфизъм с нормално и наднормено тегло**

Пол	20210G>A	Общо сравнение	Chi-Square	df	Sig.
За наднормено тегло					
1.0	.0	Log Rank (Mantel-Cox)	3.064	1	.080
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.747	1	.388
	1.0	Log Rank (Mantel-Cox)	.717	1	.397
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.164	1	.686
2.0	.0	Log Rank (Mantel-Cox)	8.821	1	.003
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	8.318	1	.004
	1.0	Log Rank (Mantel-Cox)	2.645	1	0.066
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.332	1	.565

При жени носители на 20210G>A, възрастта на първия епизод намалява, което показва силния ефект на полиморфизма. Общо при пациенти от женски пол с наднормено тегло проявата на ДВТ инцидент е значително по-ранна ( $\chi^2=3.678$ ,  $p=0.046$ ). При мъже пациенти със затлъстяване, вероятността за ДВТ е по-висока, и е с по-късна проява на събитието ( $\chi^2=3.064$ ,  $p=0.080$ ). Няма разлика в годините при пациенти от мъжки пол със затлъстяване носители на 20210G>A.

##### 4.4.5.1. Влияние (Kaplan-Meier) на наднормено и нормално тегло върху риска за по-ранно развитие на рекурентен ДВТ инцидент при пациенти носители и неносители на 20210 G>A

Вероятността за по-кратък интервал от време преди рецидивиращ инцидент е по-висока при пациенти с наднормено тегло неносители в

сравнение с нормално тегло носители (4.69 г. срещу 6.773 г.,  $\chi^2=0.5.419$ ,  $p=0.020$ ). При носителите на FII20210G>A интервалът до рекурентен инцидент е много малък, въпреки това още по-вече се скъсява при пациенти с наднормено тегло (3.857г. срещу 3.0г.)

Вероятността за по-кратък интервал от време преди рецидивиращ инцидент е по-висока при мъжете с наднормено тегло носители в сравнение с нормално тегло носители ( $\chi^2=3.229$ ,  $p=0.072$ ). При носителите на полиморфизъм 20210G>A интервала е много малък, въпреки това още по-вече се скъсява при пациенти с наднормено тегло.

**Таблица 48. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за по-ранен рекурентен инцидент на ДВТ, в група пациенти мъже и жени, носители и носители на FII 20210G>A, с наднормено и нормално телесно тегло.**

Пол	FII 20210G>A	Общо сравнение за наднормено тегло	Chi-Square	df	Sig.
	0	Log Rank (Mantel-Cox)	5.419	1	0.020
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	4.967	1	0.026
	20210G>A	Log Rank (Mantel-Cox)	0.071	1	0.791
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	0.054	1	0.816
Мъже=1	0	Log Rank (Mantel-Cox)	3.229	1	.072
	20210G>A	Log Rank (Mantel-Cox)	.852	1	.356
Жени=2	0	Log Rank (Mantel-Cox)	1.305	1	.253
	20210G>A	Log Rank (Mantel-Cox)	1.000	1	.317

\*0=Нормално тегло, 1=Наднормено тегло

При жени носители на 20210G>A рекурентните епизоди са рядки и не се постига статистическата достоверност за данните.

#### **4.4.6. Влияние (Kaplan-Meier) на хормонална терапия и акушерска анмнеза за по-ранно развитие на ДВТ инцидент при пациенти носители и носители на 20210 G>A**

При жени пациенти носители на полиморфизма 20210G>A и на хормонална терапия, вероятността за ДВТ е по-висока, и е с много ранна проява на събитието ( $\chi^2=9.00$ ,  $p=0.003$ ) в сравнение с пациентите от женски пол, които не са на хормонална терапия (Таблица 49), обаче при жени носители тази разлика не е значима. ( $\chi^2=1.150$ ,  $p=0.284$ ). Не е

значима и разликата за вероятността за по-кратък интервал от време преди рецидивиращ инцидент както при носители така и при неносители.

**Таблица 49. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за преживяемост до инцидент на ДВТ, в група пациенти жени, носители и неносители на полиморфизъм FII 20210G>A, на хормонална терапия**

Пол	20210G>A	Общо сравнение за Хормонална терапия	Chi-Square	df	Sig.
Жени	.0	Log Rank (Mantel-Cox)	1.150	1	.284
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	.230	1	.631
	20210G>A	Log Rank (Mantel-Cox)	9.000	1	.003
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	9.000	1	.003

**Таблица 50. Chi-Square ( $\chi^2$ ) и p (Sig) по Log Rank и Breslow за вероятността за преживяемост до инцидент на ДВТ, в група пациенти жени, носители и неносители на полиморфизъм FII 20210G>A, с акушерска анмнеза**

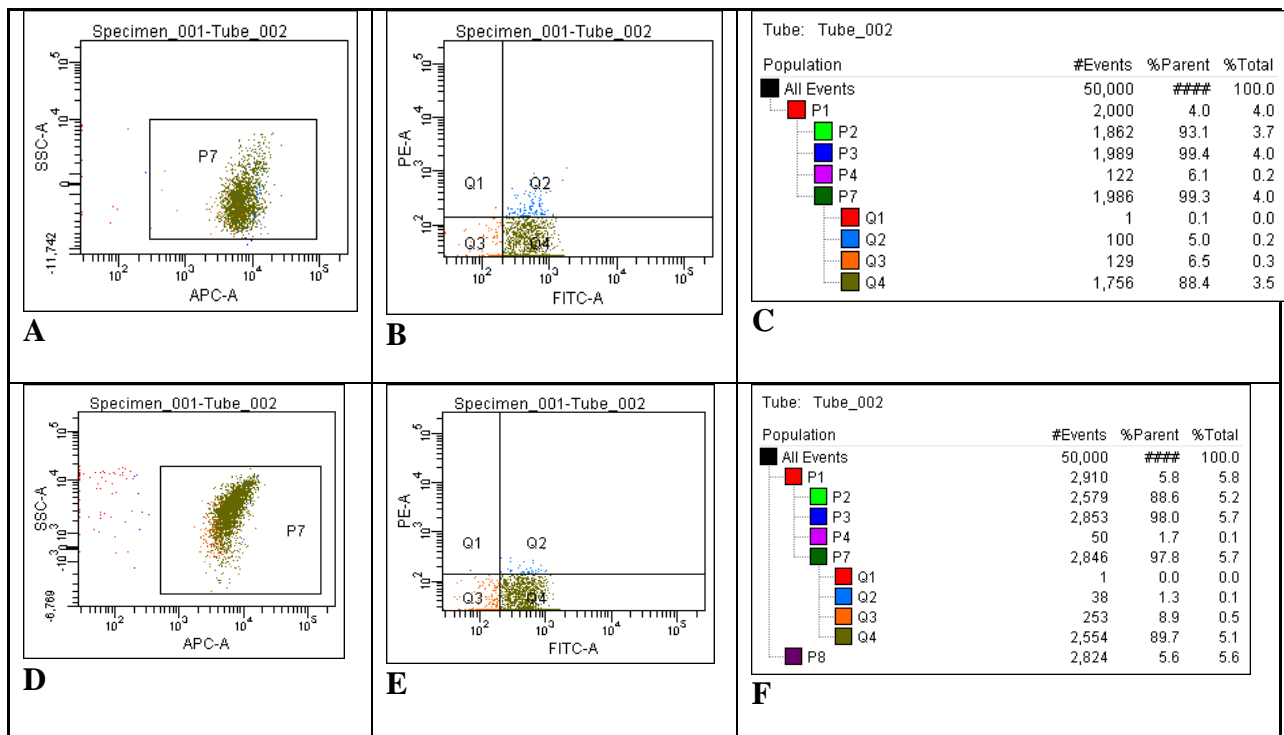
Пол	20210G>A	Общо сравнение за с акушерска анмнеза	Chi-Square	df	Sig.
Жени	.0	Log Rank (Mantel-Cox)	10.039	1	.002
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	11.343	1	.001
	20210G>A	Log Rank (Mantel-Cox)	7.340	1	.007
		Breslow (Generalized Wilcoxon)	7.105	1	.008

При жени носители на 20210G>A и с акушерска анмнеза, вероятността за ДВТ е по-висока, и е с по-ранна проява на събитието ( $\chi^2=7.340$ ,  $p=0.007$ ) в сравнение с пациентите от женски пол, които нямат подобни проблеми (Таблица 50). При жените неносители тази разлика е още по-значима. ( $\chi^2=10.039$ ,  $p=0.002$ ). Не е значима и разликата за вероятността за по-кратък интервал от време преди рецидивиращ инцидент както при носители така и при неносители.

#### **4.4.7. Флоуцитометрично изследване на активността на тромбоцитите изолирани от контрола носител на полиморфизъм 20210G>A гена на протромбина**

Изследвани са проби на тромбоцитите изолирани от здрави индивиди с метода на флоуцитометрия: на носител на полиморфизъм 20210G>A гена на протромбина, и неносител на същия полиморфизъм. Двойната положителна популация CD41/CD62P (Q2) се характеризира като активирани тромбоцити (Фиг. 39).





**Фигура 39.** Скатер диаграма на флоуцитометрично изследване на тромбоцитите изолирани от здрав индивид (A, B и C) носител на 20210G>A, (D, E и F) неносител на 20210G>A. Тромбоцитите са белязани с анти-човешки CD41, FITC ННР8; Анти-човешки CD61 (Интегрин бета 3) APC (V); Анти-човешки CD62P PE (K-4).

Активираните тромбоцити от здрав индивид, неносител 20210G>A полиморфизъм наброяваха 1.3%, докато CD62P положителни (активирани) тромбоцити при здрави индивиди, носители на вариант А алел на 20210G>A полиморфизъм бяха 5%. Поради ниската честота на протромбиновата мутация, в групата на изследваните пациенти с ДВТ с метода на флоуцитометрия не бяха открити проби на носители на 20210G>A.

#### 4.4.8. Изследване на морфологичните и механичните особености на тромбоцитите, чрез АСМ при здрави индивиди. Промени в морфологията и наномеханиката на тромбоцитите с 20210 G>A

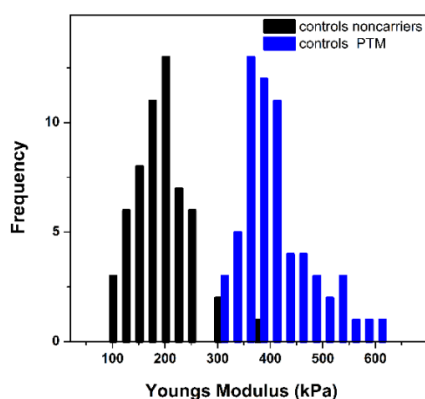
Основните цитоскелетни процеси на ремоделиране в тромбоцитите при активиране и тяхното наномеханично взаимодействие с околната среда са все още недостатъчно изследвани, поради ограниченията за морфологична и механична оценка на функцията на тромбоцитите.

Промените дължащи се на повишена концентрация на тромбин в различни етапи от активирането на тромбоцитите могат да бъдат

допълнителни характеристики за регулиране на морфологията и функцията на тромбоцитите.

#### **4.4.8.1. Топография на тромбоцитите от здрави контроли и пациенти с ДВТ**

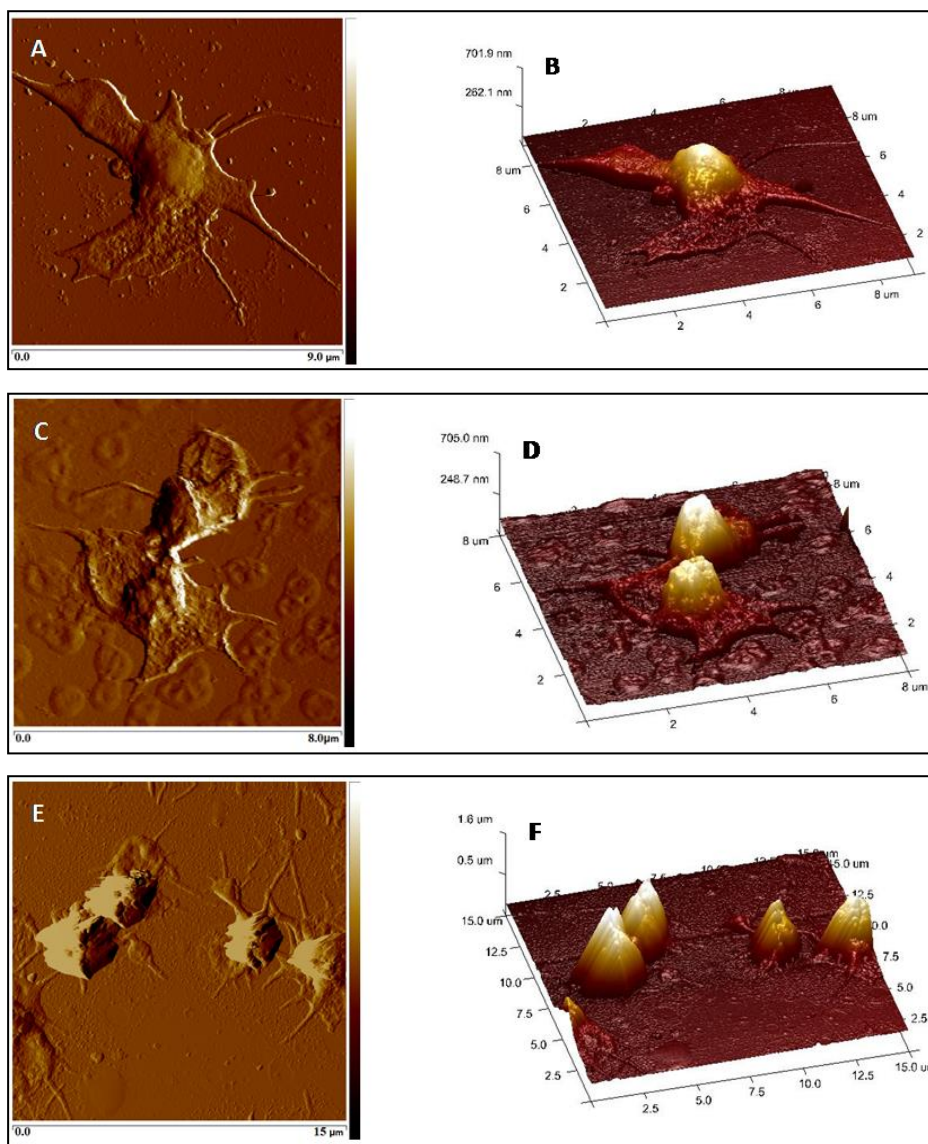
В това изследване ние комбинирахме АСМ и флоуцитометрия за оценка на промените в тромбоцитната еластичност и активирането им при здрави индивиди, носители и неносители на 20210G>A, и импакта на протромботичната мутация. Модулът на Young на тромбоцитите, изолирани от носители на вариант А алел на полиморфизъм на протромбина 20210G>A е значително по-висок в сравнение с контролните неносители -  $407 \pm 69$  кРа срещу  $197 \pm 49$  кРа, съответно ( $p < 0.05$ ).



**Фигура 40.** Диаграма за представяне на модул на Young определен при тромбоцити, получени от здрави контроли, носители на вариант А алел на протромбиновата мутация 20210 G >A (черно) и на носители на мутацията (червено).

#### **4.4.8.2. АСМ изображения на тромбоцити на носители 20210G>A**

Морфологичните промени като мембранни издатини, образуване на филоподии или псевдоподи и разпространението им по повърхността на тромбоцита се наблюдава и в двете проби вид носител и неносител на 20210A полиморфизъм (Фиг. 41 А, В, С и D).



**Фигура 41.** АСМ изображения на активирани тромбоцити, получени от здрав субект, носител на 20210G>A, наблюдавани върху покривно стъкло.

(А) АСМ -2D профил със сенка-ефект на пряно приготвени тромбоцити, получени от здрав индивид носител на 20210G>A

(С) АСМ -2D профил на пряно приготвени тромбоцити, получени от здрав индивид носител на 20210G>A.

(Е) АСМ -2D профил на пресни тромбоцити, получени от същия индивид (носител на 20210G>A в присъствието на  $Mg^{2+}$  йони, (инхибиране на агрегацията).

(В, D, F) АСМ -3D топографски снимки на съответните тромбоцитите от снимки А, С и Д.

Въпреки това, състоянието на активиране е по-ускорена и напреднала при носителите на протромбиновият полиморфизъм 20210A. Наличието на  $Mg^{2+}$  йони инхибира процеса на агрегация и забавя ефекта на активиране (Фиг. 41 F и E).

#### **4.5 Проучване на носителството на тромбофилични полиморфизми: A1/A2 (rs5918ITGB3) в гена на тромбоцитен гликопротеин IIb/IIIa, 4G/5G (4G/5G PAI-1 в гена на PAI-1, Фактор V Лайден (rs6025) и FII20210G>A (rs1799963) в гена на протромбина при жени с репродуктивни неудачи. Анализ на приноса на тези генетични фактори за ранна проява, рекурентни инциденти и активността на тромбоцитите**

Загубата на бременността/плода е сравнително честа патология. Сред причините и рискови фактори за фетална загуба редом с тромбофилиите са някои хромозомни аномалии, генетични синдроми, плацентни аномалии, инфекции, антифосфолипиден синдром, майчините заболявания като диабет и хипертония, възпаление и аномалии на множествената бременност.

Спонтанна загуба на клинично установена интраутеринна бременност, преди фетуса да достигнал жизнеспособност се определя като спонтанен аборт, като се уточнява че се касае за спонтанно загиване на ембриона или фетуса преди 20 г.с. и тегло под 500 гр. Загубата на плода след 20 седмица, и тегло над 500 гр. се приема за мъртво раждане.

##### **4.5.1 Характеристика на пациенти по клинични показатели:**

От изследваните 4862 жени с репродуктивни проблеми 2955 жени бяха с поне 1 неуспешна бременност; от които 2799 са имали уточнена гестационна седмица на събитието. От тях 1545 бяха диагностицирани със спонтанен аборт (СПА), 1021 с мисед аборт(МА) и 233 с мъртво раждане (МР) (след 20 гестационна седмица). Загубите на плода (ЗП) са били 1933 СПА, 1194 МА (общо до 20 седмица) и 233 МР. Загубите на плода са били диагностицирани от лекуващия лекар. МА са били доказвани с ехографска находка или с патоанатомичен анализ в началните гестационни седмици. Поради повтарящи се инциденти при някои от жените, общо събитията/броят на загубите на плода са 3358, което е повече от броя пациенти със ЗП – 2799. В таблицата 97 са представени броя на СПА, МА

и МР инциденти и съответния брой на пациенти, разпределени по лунарни месеци.

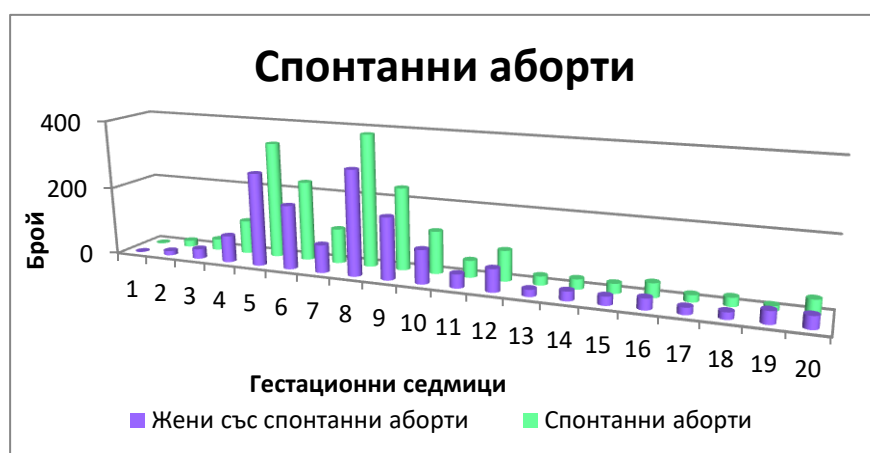
**Таблица 51. Броя на СПА инциденти, МА инциденти и МР и съответен брой на пациенти, разпределени по г.с. и лунарни месеци**

Лунарни месеци	I триместър				II триместър			III триместър			Общо
	1	2	3	4	4-5	6	7	8	9-10		
Гестационни седмици	1-4	5-8	9-12	13-16	17-20	21-24	25-28	29-32	33-36	37-40	1-40
СПА събития	149	1057	499	124	104						1933
Жени със СПА	124	843	384	104	90						1545
МА събития		658	452	68	16						1194
Жени с МА		533	409	63	16						1021
МР събития						104	46	32	38	13	233
Жени с МР						104	46	32	38	13	233
Общо събития	149	1715	951	192	122	104	46	32	38	13	3358
Общо жени със ЗП	124	1376	793	167	106	104	46	32	38	13	2799

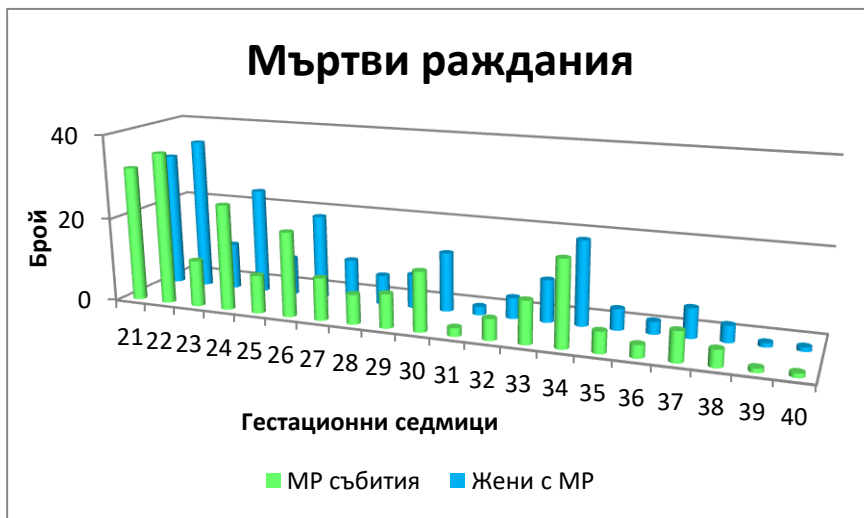
Най-големия брой инциденти е наблюдаван през първите двата месеца (от 1-до 8 гестационна седмица) на първия триместър. Първите гестационни седмици не са дадени формално, тъй като в изследването са били включени и жените с асистираната репродукция, когато датата на зачеването е точно определена.

По-подробните данни за събитията – разпределението на спонтанните аборти, мисед аборти и мъртви ражданията в гестационните седмици са

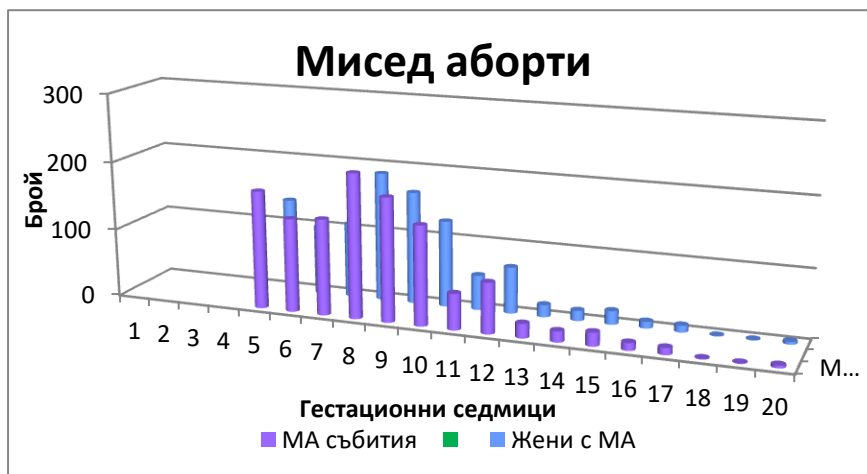
предстаени на фигурите 42, 43 и 44.



**Фигура 42. Броя на СПА инциденти и съответен брой на пациенти, разпределени по гестационни седмици**



Фигура 43. Броя на MR инциденти и съответен брой на пациенти, разпределени по гестационни седмици



Фигура 44. Броя на MR инциденти и съответен брой на пациенти, разпределени по гестационни седмици.

Най-големия брой инциденти се наброява през 5-6 и 8-9 г.с.. за СПА, като МА инциденти преимущественно се наблюдават през 8-9-10 седмица.

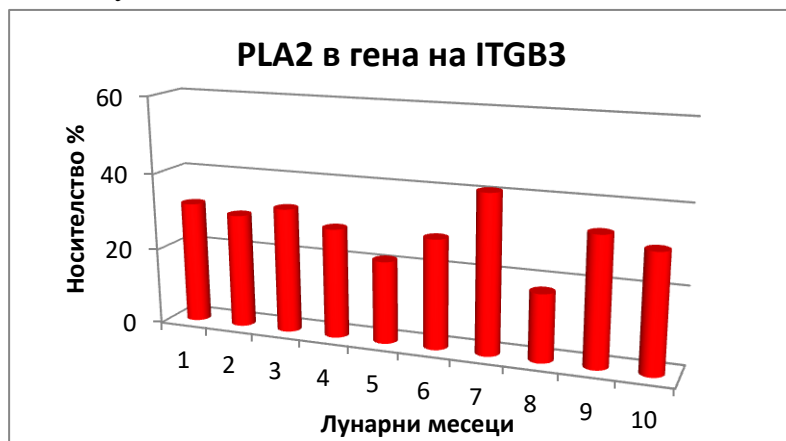
#### 4.5.2 Носителството на протромботични полиморфизми при жени със загуби на плода

Влиянието на тромбофилия и върху бременността се изследва активно през последните декади. И наследената и придобитата тромбофилия са свързани с повишен риск от ВТЕ, както и с повишен риск от загуба на бременност и неблагоприятни акушерски резултати.

Тромбофилията обхваща група от разнообразни коагулационни нарушения, които потенцират предразположение към тромботични събития като например ДВТ и белодробен емболизъм.

Относително високата честота на носителство на генетичните дефекти за тромбофилия в общата популация и първоначалните съобщения за асоциацията им с неблагоприятен изход на бременността за майката и плода, насочиха в последните години интереса на акушер-гинеколози, генетици и други към тази научна област.

#### **4.5.2.1. Носителството на PLA2/A1 в гена на GPIIb/IIIa при жени със загуби на плода**



Фигура 45. Носителство на тромбофилична мутация PLA2 в гена на ITGB3 при жени с репродуктивни проблеми от 1 до 10 лунарни месеци.

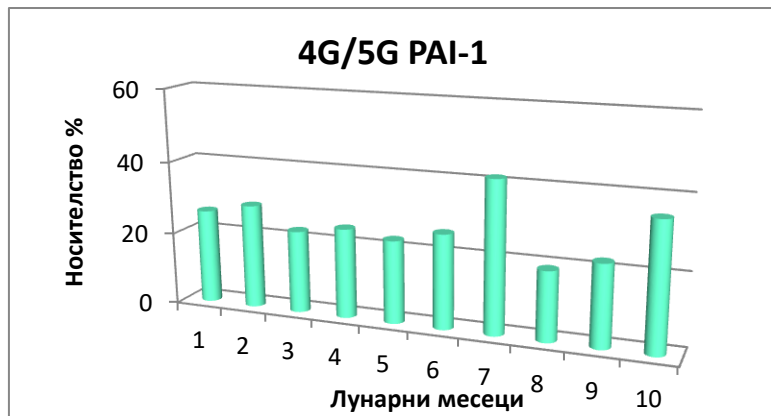
Полиморфизъм PLA1/A2 в гена на GPIIb/IIIa е сред рисковите фактори за развитие на артериални и венозни тромбози. Връзка между носителството на PLA1/A2 и СПА беше намерена сигнификантна за целия период от 40 г.с. (Таблица 52), въпреки че не беше сигнификантна за всеки лунарен месец или гестационна седмица. Връзката беше сигнификантна или близка до сигнификантна за периодите от 5 до 9 г.с. и 11,12 г.с. така и за период от 15 до 17 г.с. Стойностите на OR и  $\chi^2$  за тези периоди са в границите между 1.549 и 2.668 за OR, и 3.489 и 13.413 за  $\chi^2$ , което показва че в тези периоди носителството допринася за ЗП.

#### **4.5.2.2. Носителството на 4G/5G в гена на PAI-1 при жени със загуби на плода**

Връзка между носителството на 4G/5G в гена на PAI-1 и СПА при жените беше сигнификантна както за целия период от 40 г.с. (Таблица 104), въпреки че не беше сигнификантна за всеки лунарен месец или гестационна седмица. Връзката беше сигнификантна или близка до сигнификантна за периодите от 5 до 8та г.с.. така и за период от 25 до



27г.с. Само хомозиготно носителство на 4G алел се изследва като рисков фактор.

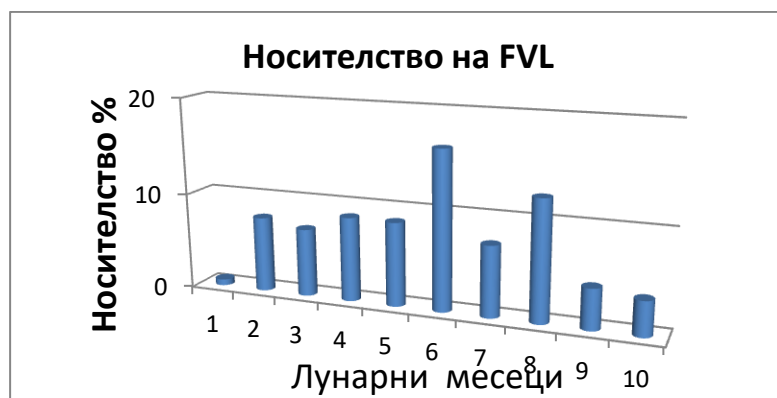


Фигура 46. Носителство на тромбофилична мутация 4G/5G в гена на PAI-1 при жени с репродуктивни проблеми от 1 до 10 лунарни месеци.

Стойностите на OR и  $\chi^2$  за тези периоди са в границите между 1.515 и 6.061 за OR, и 1.332 и 11.294 за  $\chi^2$ , което показва че в тези периоди носителството допринася за ЗП. Носителството на 4G/5G нараства и през последния лунарен месец, обаче стойностите на OR и  $\chi^2$  са ниски, което показва че връзката е слаба.

#### 4.5.2.3. Носителството на FVL при жени със загуби на плода

Полиморфизъм FVL е най-силния рисков фактор за развитие на венозни тромбози, по тази причина го изследвахме и използвахме за сравнение с други тромбофилични фактори при жени с репродуктивни неудачи.



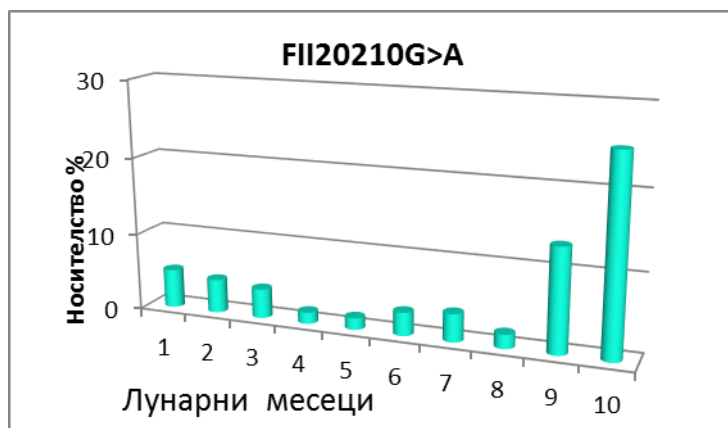
Фигура 47. Носителство на FVL полиморфизъм при жени с репродуктивни проблеми в различни лунарни месеци.



**Връзка между носителството на FVL и СПА при жените не беше сигнификантна за целия период от 40 г.с. (Таблица 52). Връзката беше сигнификантна или близка до сигнификантна за периодите от 20 до 22та г.с. така и през 29 гестационна седмица. Стойностите на OR и  $\chi^2$  за тези периоди са в границите между 2.868 и 6.074 за OR, и 5.551 и 20.966 за  $\chi^2$ , което показва че в тези периоди носителството допринася за ЗП, то е сигнификантно и за целия бия лунарен месец. Носителството е сигнификантно по-ниско (1.8% срещу 7.2% при контролите) през първия лунарен месец OR и  $\chi^2 = 4.819$ .**

#### ***4.5.2.4 .Носителството на 20210G>A в гена на протромбина при жени със загуби на плода***

Полиморфизъм на **20210G>A** в гена на протромбина е втория по значение рисков фактор за развитие на венозни тромбози, по тази причина го изследвахме и използвахме за сравнение с други тромбофилични фактори при жени с репродуктивни неудачи.

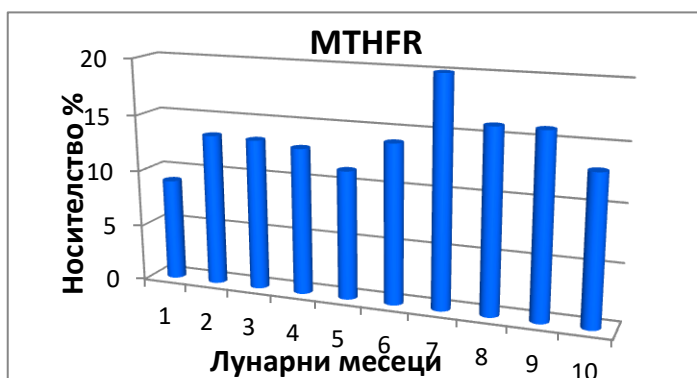


**Фигура 48. Носителство на тромбофилична мутация 20210 G>A в промотора на гена на протромбина при жени с репродуктивни проблеми в различни лунарни месеци.**

Връзка между носителството на 20210 G>A и СПА беше сигнификантна за целия период от бременността. (Таблица 52), въпреки че не беше сигнификантна за всеки лунарен месец. Връзката беше сигнификантна или близка до сигнификантна за периодите от 4 до 7а г.с.. така и през 34-35 г.с. Стойностите на OR и  $\chi^2$  за тези периоди са в границите между 1.800 и 17.050 за OR, и и 2.963 и 18.919 за  $\chi^2$ , което показва че в тези периоди носителството допринася за загубите на плода.

#### 4.5.2.5. Носителството на MTHFR 679 C>T при жени със загуби на плода

Връзка между носителството на полиморфизъм 677C>T в гена на MTHFR и спонтанни аборти при жените беше сигнификантна за целия период от 40 г.с. Само хомозиготно носителство на 677C>T полиморфизъм се изследва като рисков фактор



Фигура 49. Носителство на тромбофилична мутация MTHFR при жени с репродуктивни проблеми от 1 до 10 лунарни месеци.

Връзката беше сигнификантна или близка до сигнификантна за периодите от 4 до 9та г.с. така и през 31-38 г.с.. Стойностите на OR и  $\chi^2$  за тези периоди са в границите между 1.431 и **9.33** за OR , и **3.716** и 7.310 за  $\chi^2$ , което показва че в тези периоди носителството допринася за ЗП. Носителството е сигнификантно и за първите три лунарни месеца, а също така и близко до сигнификантност през 7 и 8 л. м..

#### 4.5.2.6. Носителството на тромбофилични мутации при жени със загуби на плода в съответни лунарни месеци

Таблица 52. Честота на носителство на PLA2, 4G/5G PAI-1, FVL, 20210 G>A и MTHFR, Pearson $\chi^2$ , точен тест на Fisher, относителен риск и 95% конфиденциален интервал при жени с репродуктивни проблеми от 1 до 40 г.с.

Генетичен фактор	Честота в контроли %	Честота при пациенти със ЗП %	Pearson Chi-Squared	Fisher's Exact Test	Mantel-Haenszel Odds Ratio	95% Конфиденциален интервал	Asymp. Sig.(p)
FVL	7.2	7.4	0.111a	.739	1.045	0.044-0.132	0.739
PROTHR	2.8	4.5	11.242a	0.001	2.109	1.350-3.295	.001
MTHFR	9.6	12.6	7.555	0.006	1.361	1.092-1.697	.006
PLA1/A2	20.6	29.1	12.772a	.001	1.583	1.229-2.040	.048
4G/5G PAI-1	19.8	26.8	20.495a	0.001	1.515	1.264-1.815.	0.001

Таблица 53. Честота на носителство на PLA2, 4G/5G PAI-1, FVL, 20210 G>A и MTHFR, Pearson $\chi^2$ , точен тест на Fisher, относителен риск и 95% конфиденциален интервал при жени с репродуктивни проблеми от 1 до 4 г.с.

Генетичен фактор	Честота в контроли %	Честота при пациенти ЗП 1-4 г.с. %	Pearson Chi-Squared	Fisher's Exact Test	Mantel-Haenszel Odds Ratio	95% Конфиденциален интервал	Asymp. Sig.(p)
FVL	7.2	1.8	4.819a	.028	.233	.056-.960	.044
PROTHR	2.8	4.5	1.906a	.141	1.593	.606-4.193	.145
MTHFR	9.7	16.1	4.731a	.030	1.791	1.053-3.048	.032
PLA1/A2	19.5	31.7	3.419a	.064	1.921	.952-3.875	.068
4G/5G PAI-1	19.8	26.0	2.044a	.153	1.423	.876-2.312	.155

Таблица 54. Честота на носителство на PLA2, 4G/5G PAI-1, FVL, 20210 G>A и MTHFR, Pearson $\chi^2$ , точен тест на Fisher, относителен риск и 95% конфиденциален интервал при жени с репродуктивни проблеми от 5 до 8 г.с.

Генетичен фактор	Честота в контроли %	Честота при пациенти ЗП 5-8 г.с. %	Pearson Chi-Squared	Fisher's Exact Test	Mantel-Haenszel Odds Ratio	95% Конфиденциален интервал	Asymp. Sig.(p)
FVL	7.2	7.7	.170a	.680	1.071	.773-1.485	.680
20210 G>A	2.8	4.6	4.331a	.037	1.630	1.025-2.594	.039
MTHFR	9.7	12.4	4.206a	.040	1.327	1.012-1.739	.041
PLA1/A2	19.4	29.1	11.655a	.001	1.701	1.252-2.312	.001
4G/5G PAI-1	19.8	28.3	17.053a	.000	1.593	1.276-1.989	.000

Таблица 55. Честота на носителство на PLA2, 4G/5G PAI-1, FVL, 20210 G>A и MTHFR, Pearson $\chi^2$ , точен тест на Fisher, относителен риск и 95% конфиденциален интервал при жени с репродуктивни проблеми от 9 до 12 г.с.

Генетичен фактор	Честота в контроли %	Честота при пациенти ЗП 9-12 г.с. %	Pearson Chi-Squared	Fisher's Exact Test	Mantel-Haenszel Odds Ratio	95% Конфиденциален интервал	Asymp. Sig.(p)
FVL	7.2	7.6	0.120	0.729	1.068	.735-1.553	.729
20210 G>A	2.8	4.1	1.833	0.176	1.444	.846-2.465	.178
MTHFR	9.7	13.	5.374	0.020	1.425	1.055-1.925	.021
PLA1/A2	19.4	31.8	15.055	0.000	1.937	1.383-2.711	.000
4G/5G PAI-1	19.8	22.2	1.113	0.291	1.153	.885-1.502	.292

**Таблица 56. Честота на носителство на PLA2, 4G/5G PAI-1, FVL, 20210 G>A и MTHFR, Pearson $\chi^2$ , точен тест на Fisher, относителен риск и 95% конфиденциален интервал при жени с репродуктивни проблеми от 13 до 16 г.с.**

Генетичен фактор	Честота в контроли %	Честота при пациенти ЗП 13-16 г.с. %	Pearson Chi-Squared	Fisher's Exact Test	Mantel-Haenszel Odds Ratio	95% Конфиденциален интервал	Asymp. Sig.(p)
<b>FVL</b>	7.2	7.0	.004a	.949	.978	.493-1.939	.949
<b>20210 G&gt;A</b>	2.8	1.4	.976a	.323	.491	.116-2.076	.333
<b>MTHFR</b>	9.7	12.2	.945a	.331	1.294	.768-2.180	.332
<b>PLA1/A2</b>	19.4	30.2	4.967a	.026	1.798	1.068-3.028	<b>.027</b>
<b>4G/5G PAI-1</b>	19.8	24.5	1.282a	.258	1.313	.818-2.107	.259

Общо за целия период на бременност, четири полиморфизма сигнификантно допринасят за загуби на плода, това са 20210 G>A, PLA1/A2, MTHFR, 4G/5G в гена на PAI-1. FVL нямаше таова значение.

Носителството на FVL беше сигнификантно намалено при загуби на плода през първия лунарен месец, което подкрепя хипотезата за протективното му действие през първите гстационарни седмици. FVL има сигнификантен принос за загуби на плода само през седмия лунарен месец, 20, 21, 23, 24 г.с. а също така и през 29 г.с.

Носителството на 20210 G>A сигнификантно допринасяше за ЗП само през втория лунарен месец, 4,5,7 г.с и 33 и 34.

MTHFR сигнификантно допринасяше за ЗП през 1,2 лунарни месеци и близко до сигнификантност през 7 и 9 ти месеци. PLA1/A2 сигнификантно допринасяше за ЗП през втория, третия и четвъртия лунарни месеци, и от 5 до 11 г.с и 15-17 г.с.

4G/5G в гена на PAI-1 сигнификантно допринасяше за ЗП през втория, шестия и седми лунарни месеци, и от 5 до 8 г.с и 25-27 г.с.

#### ***4.5.2.7. Носителството на тромбофилични мутации при жени със рекурентни загуби на плода***

Общо в изследваната група пациенти наблюдавани са 578 (20.6 %) жени с рекурентни събития (>2), от които 365 жени с рекурентни СПА (>2), 184 жени с

рекурентни мисед аборти (>2) и 29 рекурентни мъртви раждания (>2). Съгласно критерии за рекурентност на Американска Организация за Репродуктивна Медицина (ASRM), достатъчни са две ЗП, които не са задължително последователни.

Съгласно европейските критерии за рекурентност представени в гайдлайни, инцидентите трябва да са три или повече. СПА > 3 са наблюдавани при 89 пациенти, мисед аборти при 32 и мъртви раждания при 5 жени., общо при 4.5% от всичките жени със загуби на плода.

Допълнително извадихме групата само с 2 загуби на плода с рекурентни СПА (276=2), с рекурентни мисед аборти (152=2) и рекурентни мъртви раждания (24=2) за да сравним носителството на пациенти само с две загуби на плода с тези с три и повече.

**Таблица 57 А. Честота на носителство на PLA1/A2, 4G/5G PAI-1, FVL, 20210 G>A и MTHFR при жени с рекурентни ЗП =2 инцидента, СПА между 1 и 12 г. с.**

Генетичен фактор	СПА 04г.с	СПА 05г.с	СПА 06г.с	СПА 07г.с	СПА 08г.с	СПА 09г.с	СПА 010г.с	СПА 011г.с	СПА 012г.с	СПА=2 1-8г.с	СПА=2 9-12г.с
Пациенти (n)	6	33	25	11	52	31	8	5	7	208	68
FVL %	-	-	4.5	10	10.4	11.5	-	20.0	-	5.3	5.4
20210G>A %	-	-	4.5	-	4	14.8	-	-	-	3.7	7.2
MTHFR %	33.3	18.0	7.0	9.0	9.8	17.2	37.5	20	-	15.6	14.5
PLA1/A2 %	33.3	21.0	32.0	18.1	28	18.5	-	-	28.5	28.1	17.9
4G/5G PAI-1%	-	50.0	15.8	27.2	26.3	9.3	25	20	37.5	30.6	25.6

**Таблица 57 В. Честота на носителство на PLA1/A2, 4G/5G PAI-1, FVL, 20210 G>A и MTHFR при жени с рекурентни ЗП (СПА) между 1 и 12 гестационни седмици: СПА с 3 или повече инциденти**

Генетичен фактор	СПА 04г.с	СПА 05г.с	СПА 06г.с	СПА 07г.с	СПА 08г.с	СПА 09г.с	СПА 010г.с	СПА 011г.с	СПА 012г.с	СПА>3 1-8г.с	СПА>3 9-12г.с
Пациенти (n)	6	14	9	3	12	11	5	2	3	67	22
FVL%	-	27.27	14.5	33.3	8.3	-	25.0	-	-	11.8	11.1
20210 G>A%	-	-	-	-	-	-	25.0	-	-	0.6	5.5
MTHFR%	50	43.0	-	-	25	44.4	-	50.0	-	19.6	31.5
PLA1/A2%	25.0	10	-	-	16.6	33.3	-	-	66.6	25.0	33.2
4G/5G PAI1%	50.0	12.5	37.5	-	42.8	16.6	40.0	50.0	33.3	34.1	39.4

**Таблица 58 А. Честота на носителство на PLA1/A2, 4G/5G PAI-1, FVL, 20210 G>A и MTHFR при жени с рекурентни загуби на плода (мисед аборти) между 1 и 12 г. с.: МА с 2 инцидента**

Генетичен фактор	МА 05г.с	МА 06г.с	МА 07г.с	МА 08г.с	МА 09г.с	МА 010г.с	МА 011г.с	МА 012г.с	МА 1-8г.с=2	МА=2 9-12г.с
Пациенти (n)	19	19	20	16	13	11	2	6	99	53
FVL %	6.6	5.8	5.8	-	9.0	-	-	25	6.2	4.6
20210G>A %	14.2	-	-	-	10.0	-	-	-	5.0	2.4
MTHFR %	5.8	22.2	11.7	7.1	-	-	50	33.3	11.3	8
PLA1/A2 %	33.3	-	33.3	37.5	-	25.4	-	-	29.2	16.6
4G/5G PAI-1%	26.6	21.4	38.4	50	50	12.5	-	16.7	36.9	23.6

Определено носителството при жени с рекурентни спонтанни и мисед аборти се различава. Намерихме и разлика в носителството на протромботични полиморфизми между групите с 2 рекурентни инцидента, и три и повече.

**Таблица 58 В. Честота на носителство на PLA1/A2 полиморфизъм, 4G/5G PAI-1, FVL, 20210 G>A и MTHFR при жени с рекурентни загуби на плода (мисед аборти) между 1 и 12 гестационни седмици: мисед аборти с 3 или повече инциденти**

Генетичен фактор	МА 05г.с	МА 06г.с	МА 07г.с	МА 08г.с	МА 09г.с	МА 010г.с	МА 011г.с	МА 012г.с	МА>3 1-8г.с	МА>3 9-12г.с
Пациенти (брой)	7	6	5	3	1	4	1	-	24	8
FVL %	20	-	0	-	-	25	-	-	5.8	16.6
20210 G>A%	-	16.6	-	-	-	-	-	-	5.8	-
MTHFR %	16.6	-	20	-	-	25	-	-	8.6	28.5
PLA1/A2 %	-	-	40	-	-	33.3	100	-	15.3	50
4G/5G PAI-1 %	50	16.6	-	50	-	-	-	-	26.3	-

При три и повече инцидента носителството на 4G/5G PAI-1 сигнификантно допринася за рекурентни СПА в първите три лунарни месеца. Други два полиморфизма FVL и MTHFR също имат голямо значение за рекурентност при три и повече СПА. При две последователни събития значението запазва само 4G/5G PAI-1 и до определена степен MTHFR.

При мисед аборти с три и повече събития групата е малобройна и не може да бъде отчетено значението на носителството. В групата с две

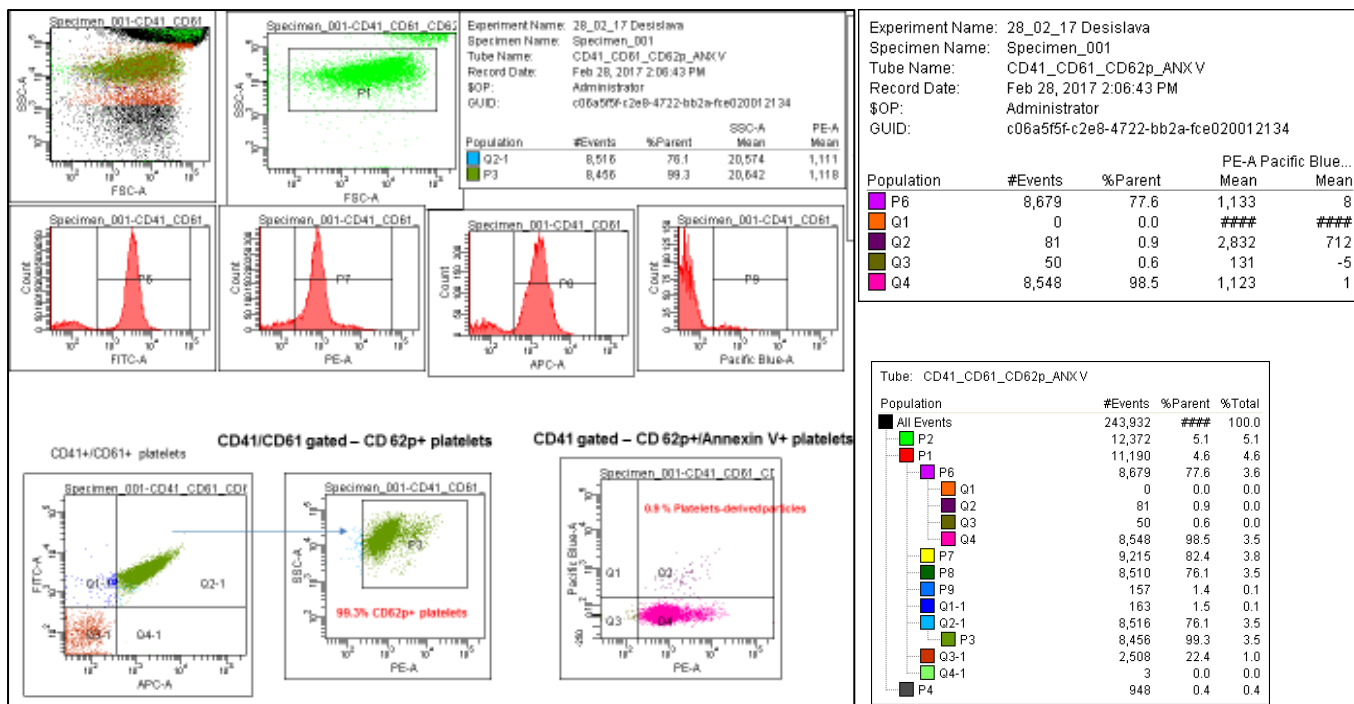
събития има значение само носителството на 4G/5G PAI-1 в първите два лунарни месеца, а също така и на PLA2.

След 12 гестационна седмица, рекурентните събития са значително по-редки, и само петнадесет жени са с два спонтанни аборта. При тях носителството на FVL е 12.5% и 4G/5G PAI-1 -30 %, е високо, но тъй като групата е малобройна, резултатите не са значими.

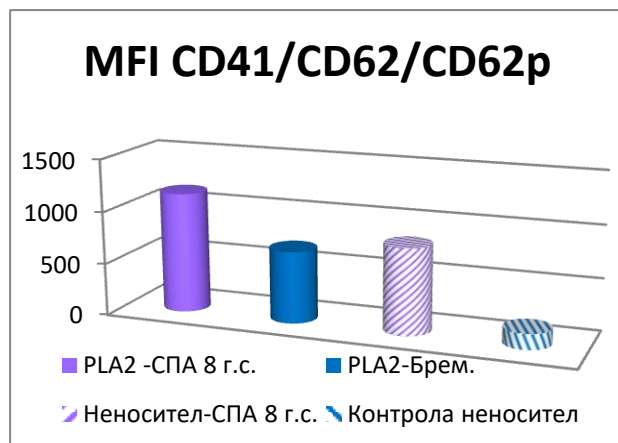
#### **4.5.3. Флоуцитометрично изследване на активността на тромбоцитите**

Данните получените с флоуцитометрия на пробите от пациентка със загуба на плода в 8 гестационна седмица (RP2) са представени на фигура 67 и показват висока степен активирание на тромбоцити. Двойно положителна популация CD41/CD62P(Q2) е 99.3%, процента на CD41+/CD61 е 76.1%; и MFI CD41/CD61/CD62p индекс е 1118.

При изследване на разпределението на активността на тромбоцитите на носителите на PLA1/A2 полиморфизъм със загуба на плода през 6-10 седмица, спрямо неносителите на PLA1/A2 полиморфизъм със загуба на плода през същия период, бяха установени по-високи стойности на **MFI CD41/CD61/CD62p** индекса, което предполага по-висока степен на активирането в сравнение с тази на неносителите на мутацията. MFI индекса и степента на активирането на жени с нормална бременност бяха значително по-високи от тази на здрави контроли без доказана бременност (Фигура 50). Важно да се отбележи, че носителство и на други протромботични мутации също води до значимо увеличаване на MFI CD41/CD61/CD62p индекса (индекс за активността) при пациенти със загуби на плода 4G/5G PAI-1 ( $987 \pm 178$ ) и MTHFR ( $742 \pm 144$ ).



**Фигура 50.** Скатер диаграма на флоуцитометрично изследване на тромбоцитите, изолирани от пациентка със спонтанен аборт в 6 г.с., носителка на PLA1/A2 и 4G/5G PAI-1. Тромбоцитите са белязани с анти-човешки CD41, FITC HIP8; CD61 (ITGB3) APC (V); CD62P PE (K-4).

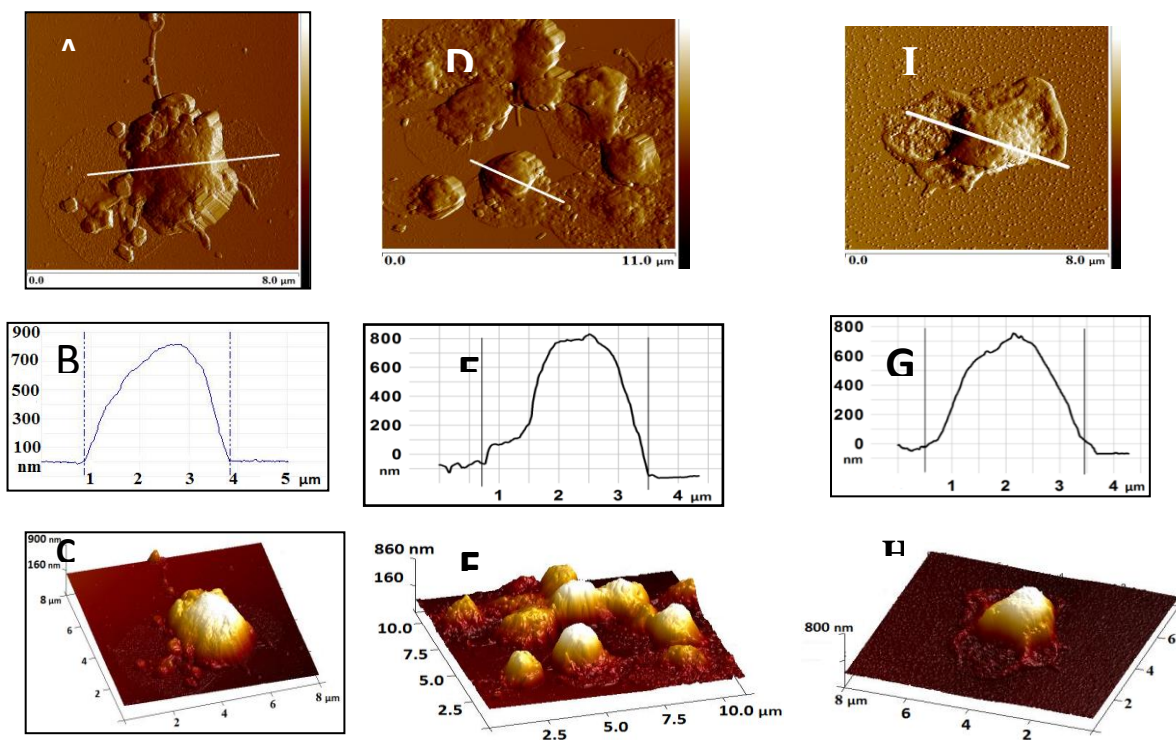


**Фигура 51.** Активността на тромбоцитите (MFI CD41/CD61/CD62p) изолирани от носители на PLA1/A2. PLA2 - CPA 8г.с., носители със загуба на плода през 6-10 г.с., PLA2 – Брем.- здрави жени носители на PLA2 с доказана бременност; Неносител – CPA 8г.с.- жени със загуба на плода през 6-10 г.с. неносители на PLA2, Контрола неносител - здрава бременна жена, неносител на тромбоцитна мутация.

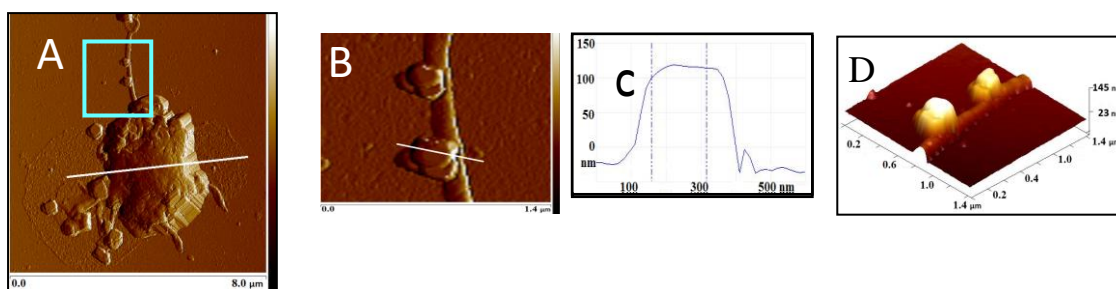
#### 4.5.4. Топография на тромбоцитите изолирани от жени със загуба на плода и здрави/бременни контроли

При контролна група бременни жени наблюдаваните тромбоцити са очевидно в начална фаза на активиране (Фиг. 52А-С).





**Фигура 52.** 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 (RP3) със загуба на плода през 10г.с., носител на PLA2. Панел (I,G H) е на жена (RP2) 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 и G) съответства на белите линии в изображенията А, D и I. АСМ-3D топографски снимки (С, F и H) са съответно на тромбоцити А, D и I в АСМ-2D.



**Фигура 53.** АСМ изображения на тромбоцити, получени от жена бременна в 8 г.с. носител на PLA2 и MTHFR (А). Панел (D) представлява увеличен очертан участък от панел А. Напречното сечение (С) съответства на белите линии в изображението В. АСМ-3D топографска снимка (D) съответно на тромбоцита в очертанния участък от панел А (В) получени при сканиране на XY площ  $8 \times 8 \mu\text{m}^2$ , Z = 900nm.

Профилът им е със сферична форма (Фиг. 52 В), подобно на контролите без бременност (Фиг. 7 А, В и С). Наблюдават се малко на брой филоподии, повечето от тях са къси и неоформени. На АСМ

изображенията не се забелязват свързани помежду си тромбоцити, те са на разстояние един от друг.

Височината на тромбоцитите получени от здрави жени с доказана бременност е  $1035 \pm 177$  nm, близка до тази на контролите за ДВТ (Таблица 15) ( $1021 + 433$  nm) докато средната площ на тромбоцити ( $6.78 \pm 1.5$   $\mu\text{m}^2$ ) надвишава съответната за контролите ( $5.2 + 2.6$   $\mu\text{m}^2$ ). Мембраната е гладка с грапавост ( $R_a = 29\text{nm}$ ). Наблюдаваните разлики между двете групи контроли (с доказана бременност и без доказана бременност) вероятно се дължат на повишения прокоагулантен статус свързан с бременността.

**Таблица 59.** Средни стойности и стандартни отклонения височината (H), площ, грапавостта ( $R_a$ ) и брой микрочастици/100  $\mu\text{m}^2$  на тромбоцитите изолирани от носители на PLA1/A2 полиморфизъм при здрави жени с доказана бременност и пациенти със загуби на плода сравнени с контроли неносители

Изследвани индивиди	Носителство на генетичен фактор	Тромбоцити			Брой микрочастици /100 $\mu\text{m}^2$
		h (nm)	Площ ( $\mu\text{m}^2$ )	$R_a$ (nm)b	
Контроли	-	1021 + 433	5.2 + 2.6	49.7 + 14	
Здрави бременни жени	PLA2	1035 $\pm$ 177	6.78 $\pm$ 1.5	29.4 $\pm$ 6.0	19
СПА RP2	PLA2, 4G/5G PAI-1	623 $\pm$ 121	4.78 $\pm$ 1.0	42.2 $\pm$ 9.5	74
СПА RP3	PLA2	624 $\pm$ 188	4.58 $\pm$ 1.5	29.4 $\pm$ 10.7	91

Съществен елемент, който се наблюдава при здрави бременни контроли е отделянето на микрочастици почти изцяло от филоподиите. Въпреки че те са малко на брой (средно 19 броя на 100 $\mu\text{m}^2$ ) размерите им са сравнително големи. Микрочастиците имат полигонална, а в някои случаи и кубична форма. Обемът им е  $0.11 \pm 0.05$   $\mu\text{m}^3$  (Фигура 53).

На АСМ изображенията на тромбоцитите, изолирани от жени с репродуктивни проблеми се наблюдават съществени различия. На фигурите 66 и 67 са представени тромбоцити и микрочастици изолирани от жени с репродуктивни проблеми RP2 (носител на PLA2, 4G/5G PAI-1, СПА 6 г.с.) и RP3 (носител на PLA2, с СПА 10 г.с.) както и пробата изолирана от здрава жена (контрола) с доказана бременност в 8-9 г.с., носителка на PLA2 и на MTHFR.

Тромбоцитите на жени загубили плода са в по-напреднал стадий на активиране. На всички АСМ прозорци се вижда тенденция на изразено „прилепване“ на тромбоцитите към подложката „тип пържено яйце“ и спрединг на хиалоплазмата в тънък слой плътно около централно събрани клетъчни органели (Фиг. 52 D и I). Топографските параметри (височина и площ) и при двете жени със загуби на плода са значително по-ниски в сравнение с контролните (Табл. 59). Макар че и при двете проби активирането е в късен стадий се наблюдават и някои различия.

При изображенията на RP3 се наблюдават множество тромбоцити, скупчени на групи с изцяло сляти помежду им хиалоплазми. Обратно, при RP2 се различават отделни тромбоцити на разстояние един от друг.

Броя на микрочастиците и при двата случая е силно увеличен (повече от 4 пъти) в сравнение с контролите на бременни жени (Фиг. 53). При RP2 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. Счита се, че частици с такива размери са екзозоми. При RP3, микрочастиците се откъсват най-вече от филоподиите, а в по-редки случаи и от хиалоплазмата. В по-голямата си част те имат полигонална форма, подобно на контролните. Тази разлика във профила на микрочастиците е възможно да се дължи от една страна на носителството на определена мутация, или на начина на тяхното отделяне. При RP3 и контролите те се откъсват изцяло от филоподиите, което е по всяка вероятност определя техният контур. Върху мембраната на тромбоцити не се забелязва отделяне на микрочастици. Самата мембрана е гладка с  $R_a=29$  nm, стойност еднаква с тази на контролата. За RP2 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.

## **5. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИ**

Наследствената тромбофилия се дължи на дефекти в гените кодиращи факторите от каскадата на кръвосъсирването и антикоагулация, фибринолизата, антифибринолитичната система а също така и гените на адхезионните протеини на тромбоцитарната мембрана.

Описани са над 500 генетични изменения (еднонуклеотидни замени, делеции, инсерции) засягащи изброените фактори. Голяма част от тях са редки причини за тенденция към тромбообразуване

Измененията в нуклеотидната последователност на гените кодиращи тромбофилични фактори обикновено са свързани с промяната на конформацията и съответно намалена или липсваща активност на синтезирания фактор, или промяната в нивото на синтез, а от там и на физиологичната функция на протеина.

Наследственото предразположение към венозна тромбоза (тромбофилия) е с мултифакторна генеза. Възрастта, в която се проявява и тежестта на клиничната картина при отделните индивиди зависи от броя на генетичните дефекти повлияващи функцията на факторите на кръвосъсирването. Наличието на преходни или постоянно действащи провокиращи тромбозата фактори на външната среда, като например тютюнопушенето, наднормено телесно тегло, преживяна травма, оперативна намеса или прием на орални контрацептиви, допринасят допълнително за проявата на тромбофиличното състояние.

### **5.1. Значение на носителство на P1A1/A2 полиморфизъм**

Нашето проучване показва, че носителството на P1A1/A2 е сред рисковите фактори, които допринасят за единични и повтарящи се инциденти на ДВТ при жени в ранна възраст. Установихме, че носителството на P1A1/A2 сред жените с ДВТ е значително по-високо в сравнение с жените-контроли, но не и сред пациентите от мъжки пол.

Вероятността (50%) за по-ранен първи инцидент на ДВТ при пациенти от женски пол, носители на P1A1/A2 е значително по-висока, особено при младите жени.

Носителите на P1A1/A2 имат по-висока реактивност в отговор на адреналина и АДФ активацията, увеличено образуване на тромбин и по-кратко време на кървене. Повишеното активиране на тромбоцитите е различно при двата пола, което би могло да се определя от естрогенови ефекти върху тромбоцитите.

Данните за по-висока пенетрантност на P1A1/A2 в млади носителки на полиморфизъм, възможно да бъдат обяснени с няколко фактора: по-висок брой на тромбоцитите и реактивността им при жените, по-високата експресия на активирани GPIIb/IIIa рецептори, и аберация в сигналинга на GPIIb/IIIa при заместване на аминокиселината левцин 33 с пролина и остатъчни конформационни промени в структурата на гликопротеина.

При обобщаване на тази информация би могло да се спекулира, че носителството на P1A1/A2 при млади жени с ДВТ е свързано с повишена активация на тромбоцитите и повишена протромботична дейност.

Рекурентните инциденти на ВТЕ най-често са свързани с недостатъчна антикоагулантна терапия или неадекватна профилактика следваща началния терапевтичен курс. Установяването на водещите причини за ВТЕ при всеки конкретен пациент намалява риска от рекурентен тромботичен инцидент.

При млади жени, носители на P1A1/A2 полиморфизъм установихме че рискът от рекурентен инцидент може да бъде значително по-висок в сравнение с останалите носители, тъй като този период от живота е свързан с по-висока протромботична активност в следствие на бременност, пуерпериума и контрацепция, и е препоръчително да се включва тази информация при генетична консултация на пациента.

## 5.2. Значение на носителство на 4G/5G PAI-1 полиморфизъм

Промоторният участък на PAI-1 гена при SND 675 (4G) полиморфизъм, представлява еднонуклеотидна делеция, която повлиява транскрипцията на гена, водеща до загуба на допълнителното свързващо място за репресора, което притежават носителите на нормалния 5G алел. Клетки носещи 4G алела (rs1799889 (-)) произвеждат до 6 пъти по-повече мРНК ин витро. In vivo, носителство е свързано с по-високо ниво на PAI-1 в кръвта и възможни хипофибринолитични състояния. PAI-1 също така влияе върху процесите на пролиферация на гладкомускулните клетки и ремоделирането на извънклетъчния матрикс в посока повишаване на риска от тромбоза. Многобройни изследвания доказват, че носителството на генотип 4G/5G води до повишен риск от инсулт, исхемична болест на сърцето включително повишен риск за коронарна болест на сърцето при жени с менопауза. Значително по-малко са изследванията за връзката на този полиморфизъм с венозна тромбоза и възможен принос на повишеното ниво на PAI-1 за развитието на ВТЕ при пациенти от мъжки и женски пол, както и липсва консенсус по въпроса относно връзката между носителство на PAI-1 4G/5G полиморфизма и венозната тромбоза.

Под въпрос е има ли фактори, допринасящи за различна експресия на PAI-1 при жените в сравнение с мъжете, тъй като неговата концентрация се влияе от различни хормони и цитокини и съответно от тютюнопушене, затлъстяване, хормонална терапия, предшестващи репродуктивни проблеми и други допълнителни рискови фактори.

В нашето проучване намерихме достоверна връзка между носителството на rs1799889 (-) полиморфизъм в PAI-1 гена и развитието на ВТЕ в общата група пациенти, въпреки че предварителните ни изследванията не дадоха сигнификантен резултат.

Значително по-висока честота на носителство на rs1799889 (-) полиморфизъм в PAI-1 гена установихме в група пациенти от женски пол с ДВТ в сравнение с контролите носители на rs1799889 (-) полиморфизъм.

Не бе намерена подобна връзка в групата мъже, носителството на полиморфизма бе близко в групите на ДВТ пациенти и контроли мъже.

Анализът на данните с метода на Kaplan-Meier показва, че вероятността събитието да настъпи по-рано е значимо в обща група пациенти – разликата е три години, но не е сигнификантно. Подобен резултат има и в група на жените - разликата е четири години, но не е сигнификантна. Установихме сигнификантен принос на носителството на 4G/5G PAI-1 за по-ранна проява на инцидент в група пациенти над 45 години и при жени на възраст над 45 години, носители на полиморфизма но не и при по-млади жени.

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

### **5.3. Значение на носителство на FVL полиморфизъм**

Честотата на носителството на FVL бе намерена значително по-висока както в общата група пациенти с ДВТ ( $\chi^2 = 16.761$   $p = 0.001$ ) така и при пациенти от мъжки ( $\chi^2 = 8.727$   $p=0.003$ ) и от женски пол и ( $\chi^2 = 7.835$   $p = 0.006$ ), в сравнение с контролите. Изчисленият риск за инцидент на дълбока венозна тромбоза бе по-висок при млади мъже и жени (OR = 3.794,  $p = 0.001$ ), носители на полиморфизъм в сравнение с мъже и жени от по-възрастната група, където за общата група пациенти рискът беше сигнификантен (OR = 2.891,  $p = 0.036$ ), но не и за отделни групи пациенти

В последното десетилетие са направени множество проучавания за значението на FVL полиморфизъм за развитието на ВТЕ. Съобщава се за от 3 до 10 пъти по-висок риск от ВТЕ при носителство на FVL (OR: 9.7, 95% CI: 3.4-27.3) в сравнение с неносители на мутацията.

Значителната разлика (Kaplan-Meier) между носители и неносители на FVL полиморфизма свързана с вероятността за по-ранна изява на ДВТ инцидент бе установена в **обща група пациенти** ( $\chi^2 = 3.327$ ,  $p = 0.058$ ), **и при мъжете** ( $\chi^2 = 5.913$ ,  $p = 0.015$ ), но не и при жените ( $\chi^2=0.330$ ,

$p=0.566$ ). Значителна разлика във вероятността за по-ранна проява на ДВТ бе намерена в общата група млади пациенти, под 45 години ( $\chi^2=10.215$ ,  $p=0.001$ ), носители на FVL полиморфизъм, а също така и в двете подгрупи на млади жени ( $\chi^2=4.347$ ,  $p=0.037$ ) и мъже ( $\chi^2=6.129$ ,  $p=0.013$ ), носители на полиморфизъм FVL.

Рекурентността на ДВТ инциденти при носители на FVL е една от най-много оспорвани и дискутирани теми. Честотата на повтарящи се инциденти на ДВТ и/или БЕ в обща група пациенти бе 35.4%, малко по-висока при жените 38.5% в сравнение с мъжете 31.3%. Общо при пациенти носители на FVL полиморфизъм честотата на повтарящи се тромботични инциденти бе значително и сигнификантно по-висока спрямо не носители на FVL ( $\chi^2 = 6.747$ ,  $p=0.017$ ). Значително и сигнификантно по-висок е и рискът от повтарящи се инциденти при жените, носители и особено при младите жени ( $\chi^2 = 5.252$ ,  $p=0.022$ ).

#### **5.4. Значение на носителство на 20210 G>A полиморфизъм за развитие на ДВТ**

Носителството на 20210 G>A се среща значително по-рядко в здравата популация (в България около 3%). В нашето изследване честотата на носителството на 20210 G>A полиморфизъм бе намерена значително по-висока както в общата група пациенти ( $\chi^2 = 9.542$ , OR= 4.201,  $p=0.001$ ) така и при пациенти от мъжки ( $p=0.049$ ) и от женски пол ( $p=0.013$ ) в сравнение с контролите. Изчисленият риск от инцидента на дълбока венозна тромбоза бе по-висок при млади мъже и жени (OR=5.434,  $p=0.012$ ), носители на полиморфизъм, в сравнение с мъже и жени от по-възрастната група.

Значителната разлика между носители и неносители на 20210 G>A полиморфизъм свързана с вероятността за по-ранна изява на ДВТ инцидент (Kaplan-Meier) бе установена в обща група пациенти (49.270 г. срещу 55.859 г.,  $\chi^2 = 5.023$ ,  $p=0.025$ ) и при жените (45.286г. срещу 56.862



г.,  $\chi^2 = 5.371$ ,  $p = 0.020$ ) но не и при мъжете. Значителна разлика във вероятността за по-ранна проява на ДВТ бе намерена в общата група млади пациенти (под 45 години), носители на 20210 G>A полиморфизъм ( $\chi^2=4.273$ ,  $p=0.039$ ), а също така и подгрупа на млади жени носители на полиморфизъм на 20210 G>A ( $\chi^2=6.228$ ,  $p=0.013$ ) но не и в подгрупите на мъжете.

В нашето проучване при пациенти носители на **20210 G >A**, честотата на повтарящи се тромботични инциденти бе значително по-висока при мъжете, отколкото при жените (21.7% при мъжете и 7.5% при жените). Значително и сигнификантно по-висок бе и рискът от повтарящ се инцидент при мъжете носители на **20210 G >A** в гена на протромбина ( $\chi^2 = 3.288$ , OR = 2.932,  $p = 0.032$ ) и особено при мъже над 45 години ( $\chi^2=3.122$ , OR = 3.600,  $p = 0.07$ ).

## **5.5. Генетични дефекти за тромбофилия и бременности със загуби на плода (ЗП)**

### **5.5.1. Значение на генетичен дефект PLA1/A2 за бременности със ЗП**

В нашето проучване търсихме най-вече значението на все още дискутираните протромботични полиморфизми PLA2 и 4G/5GPAI-1. Намерихме сигнификантна връзка между загубите на плода (СПА) в период на имплантация и развитието на плацента от 5 г.с. до 11г.с. и при 2 рекурентни инцидента от 1 до 8 г.с.

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 PLA1/A2 и със загуба на плода през 8-10 седмица имат по-високи стойности на MFI CD41/CD61/CD62p индекса и степента на активирането в сравнение с не носителите на мутацията. Топографските изследвания също така показаха, че

носителството на PLA2 води до променена сензитивност на тромбоцитите към активиращите сигнали и по-бързото им активиране.

Оказа се че и самата бременност променя MFI индекса даже при жените с неусложнена бременност, като носителството на PLA2 допълнително увеличава MFI индекса при носителите.

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 филоподии. 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, се наблюдават множество тромбоцити, скупчени на групи с изцяло сляти помежду им хиалоплазми. Микрочастиците са с полигонална форма и се откъсват най-вече от филоподиите. Тромбоцитите са по-гладки и с по-голяма площ. Всички тези данни говорят за по-висока степен на активирането им.

От една страна самата бременност е с по-висок про-коагулантен статус, което е видно и от фигура 65, от друга страна носителството на PLA2 допълнително увеличава експресията на гликопротеина и степента на активирането повишавайки риска за патологичен инцидент.

Остава под въпрос защо носителството на PLA2 значимо провокира един инцидент, и в по-малка степен рекурентните. Само при мисед аборти с два инцидента наблюдаваме значително по-високи нива на носителството на PLA2. Вероятно е необходимо още едно събитие, фактор или тригер.

Обаче неоспорим е факта че самата бременност увеличава протромботичния индекс MFI

### **5.5.2. Значение на генетичен дефект 4G/5G PAI-1 за бременности със ЗП**

Нашите изследвания показаха че носителството на 4G/5G в гена на PAI-1 сигнификантно допринася за загубите на плода през втория, шестия и седмия лунарни месеци, и от 5 г.с. до 8 г.с. и 25-27 г.с. 4G/5G PAI-1 сигнификантно допринася и за рекурентни спонтанни аборти три и повече инцидента, а също така и при две последователни събития през три първи лунарни месеца.

В групата с две мисед събития носителството на 4G/5G PAI-1 има значение само през първите два лунарни месеца.

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 4G/5G генотипа се увреждат кръвоносните съдове на плацентата.

Данните за носителството на хомозиготния генотип 4G и свързаните рискове се дължат вероятно на намаленото активиране на плазминогена до плазмин и съответно превръщането на про-MMP в активна MMP която насърчава локална протеолиза на матрикса при трофобластна инвазия. 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.

Интересен е факта, че носителство на 4G/5G PAI-1 води до значимо увеличаване на MFI CD41/CD61/CD62p индекса (индекс за активността)

при пациенти със загуби на плода, за разлика от носителите на същия полиморфизъм с дълбока венозна тромбоза.

### **5.5.3. Значение на протромботични полиморфизми за рекурентни събития**

От изключително значение е определяне на носителството на тромбофилични мутации при жени с рекурентни загуби на плода. Общо в изследваната група 20.6 % жени са били с рекурентни събития (два инцидента), от които 365 жени с рекурентни спонтанни аборти (два инцидента), 184 жени с рекурентни мисед аборти (два инцидента) и 29 рекурентни мъртви раждания (два инцидента) (критерии на ASRM).

Съгласно европейските критерии 4.5% пациенти имат рекурентни загуби на плода (СПА повече от три). Носителството на FVL свързват с по-висок риск за репродуктивни проблеми във втори триместър (OR-11.0) и рекурентност за три и повече инцидента (OR-8.7).

Трябва да се отбележи факта че в нашите изследвания носителството на тромботични полиморфизми при жени с рекурентни спонтанни и мисед аборти се различава.

При три и повече инцидента носителството на 4G/5G PAI-1, FVL, и MTHFR сигнификантно допринася за рекурентни спонтанни аборти в първите три лунарни месеца. При две последователни събития значението запазва само 4G/5G PAI-1 и до определена степен MTHFR.

При мисед аборти в групата с две събития има значение носителството на 4G/5G PAI-1 и на PLA2 в първите два лунарни месеца. След 12 гестационна седмица за загубите на плода запазва значението носителството на FVL, което нараства до 12.5% (OR 1.9) и 4G/5G PAI-1 30% (OR 1.86).

Първия триместър не трябва да се разглежда като хомогенен период от бременността, тъй като неговия ранен период се оказва резистентен на неблагоприятните ефекти от FVL тромбофилията. Преди 10 г.с. ендоваскуларния трофобласт запушва спиралните артерии, създавайки

една хипоксична утероплацентарна среда, докато след 10 г. с. утероплацентарният и интервилозен кръвен ток се повишава драматично като новообразуваната плацента и плода се експонират в среда с по-нормална оксигенация. Този момент отделя следващия период на повишено експониране на ембриона/плода на кислородна среда, ето защо последствията от интероплацентарните тромбози се оказват различни преди и след 10 г.с.

Нашите данни показват, че не само първия триместър не трябва да се разглежда като хомогенен период, но даже и лунарните месеци. Най-големия брой на жени със СПА инциденти се наброява през 5-6 и 8-9 гестационни седмици, докато за МА инциденти преимущественно се наблюдават през 8-9-10 седмица. Различават се не само броя и вида (спонтанни и мисед аборти), но също така и носителството на определена протромботична мутация.

#### **5.5.4. Промени в морфологията и наномеханиката на тромбоцитите при нормална бременност и бременност със ЗП**

С цел определяне значението на тази вариабелност в при носителство на полиморфизмите за протромботичният риск и риск от ЗП поставихме за цел да се определи протромботичният статус с флоуцитометричен и АСМ анализ.

Тези изследвания показаха различията при носителки на PLA2, 4G/5G PAI-1 и FVL в топографски и флоуцитометрични характеристики въпреки че, общата тенденция при всички беше протромботична с висок MFI индекс, промяна в грапавостта на тромбоцитите, в броя, форма и обема на микрочастиците.

Поради ниския процент на носителството на FII20210G>A и FVL (особенно в първи гестационни седмици) броят на изследваните жени бе ограничен, и тези включените във флоуцитометричното проучване са с малки гестационни седмици на загубите на плода, което предполага нисък процент на носителството на FVL в изследваната група.

Въпреки това бяха изследвани 2 жени носителки на FVL<sub>c</sub> висок MFI индекс (средно 1005) и близки други показатели на носителите на PLA2, обаче с различията в експресията на анексин V и различни по големина микрочастиците.

Относно мутация C677T MTHFR, данните в литературата са най-противоречиви, въпреки че в нашето изследване намерихме връзка между носителството на MTHFR единични и рекурентни загуби на плода. Въпреки че през целия период от бременността OR е със сравнително ниски значения (Общо OR 1.36, а през първия лунарен месец е 1.79), но при три и повече спонтанни аборти той има сигнификантно значение. За отбелязване е фактът, че при MTHFR полиморфизъм стойностите на MFI индекса и други флоуцитометрични показатели са много близки до тези на бременни жени без усложнения.

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 ЗП.

Разнообразните биофизични и имунологични методи за анализ на морфологията, топологията и механичните свойства на тромбоцитите имат голям потенциал при изследване на случаите с репродуктивни неудачи. Изследването на връзката между генетичните фактори, ултраструктурата и механиката на тромбоцитите чрез топографско изследване на тромбоцитите посредством АСМ и активирането им с флоуцитометрия при пациенти с по-висок протромботичен статус, който е характерен за бременност и пуерпериум предоставя уникална възможност да се съпоставят промените в морфологията и активирането на тромбоцита с особеностите на протичането на нормална и усложнена бременност при носители на протромботични полиморфизми.

## **6. ИЗВОДИ**

### **PLA2 в гена на ITGB3**

1. Носителството на генетичният вариант PLA2 (rs5918(C)) в гена на ITGB3 допринася за по-висок риск от единични и рекурентни инциденти на ДВТ, както и за по-ранната проява при млади жени.
2. Тютюнопушенето в комбинация с носителството на PLA2 полиморфизъм допринася за по-ранна проява и по-кратък период до рекурентен епизод на ДВТ при жените, но не и при мъжете.
3. Затлъстяването в комбинация с носителството на PLA2 полиморфизъм допринася за по-висок риск и по-кратък период до рекурентен епизод на ДВТ при жените но не и при мъжете.
4. Носителския статус за PLA2 увееличава вероятността за по-ранно развитие на ДВТ инцидент при жени с обременена акушерска анамнеза и хормоно-заместителна терапия.
5. Носителския статус за PLA2 води до физиологични и наномеханични промени в тромбоцитите: увеличава активността, намалява височината и грапавостта на тромбоцитите и увеличава еластичността на тромбоцитните мембрани (Модула на Young) при здрави индивиди и при пациентите с ДВТ
6. Носителския статус за PLA2 води до по-високи стойности на MFI CD41/CD61/CD62p.

### **4G/5G в гена на PAI**

7. Носителство на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 (rs1799889(-)) сигнификантно увеличава риска за развитие на ДВТ инцидент при пациенти от женски пол, но не и при мъжете, както и увеличава риска за по-ранна проява (особенно при жените над 45 години).
8. Комбинираният ефект на тютюнопушенето и носителството на 4G/5G PAI-1 полиморфизъм допринася за по-висок риск от рекурентност и по-малък интервал между тромботични инциденти, и при жените, и

при мъжете. При жените сигнификантно увеличава риска за по-ранен ДВТ инцидент.

9. Комбинираният ефект на затлъстяването и носителството на 4G/5G PAI-1 допринася за по-висок риск от рекурентност и по-малък интервал между тромботични инциденти при мъжете.
10. Носителския статус за 4G/5G полиморфизъм в гена на PAI-1 увеличава вероятността за по-ранно развитие на ДВТ инцидент при жени с обременена акушерска анамнеза
11. Пациенти с ДВТ носители на 4G/5G полиморфизъм в гена на PAI-1 имат по ниски стойности на MFI CD41/CD61/CD62p на тромбоцити в сравнение с неносители
12. Носителството на 4G/5G PAI-1 води до физиологични и наномеханични промени в тромбоцитите: активността, височината и площта на тромбоцитите, изолирани от пациенти с ДВТ носители на 4G/5G PAI-1 са с по-ниски стойности от тези на здрави индивиди. Еластичността на тромбоцитните мембрани измерена като модула на Young се увеличава.

### **FVL**

13. Потвърдено бе статистически достоверно покачване на риска за развитие и **по-ранна проява** на ДВТ при носители на FVL, мъже и жени, особено на възраст под 45 години
14. Установен сигнификантно по-висок риск за рекурентни тромботични инциденти при носителите на FVL полиморфизъм и особено при млади жени.
15. Тютюнопушенето увеличава вероятността за инцидент на ДВТ при при млади мъже < 45 години, носители на FVL спрямо неносители, но не и при жените.
16. Затлъстяването увеличава риска от ДВТ при мъжете носители на FVL, но забавя проява на събитието.



17. Тромбоцитите, изолирани от пациенти, носители на FVL мутация са в по-напреднал стадий на активиране и имат високи стойности на MFI индекс.

### **FII20210G>A**

18. Потвърдено бе статистически достоверно покачване на риска за развитие на ВТЕ при носителство на FII20210G>A в протромбиновия ген и **бе установен по-висок риск за по-кратък интервал до рекурентен** инцидент при пациенти носители на FII 20210G>A.

19. Установен бе по-висок риск за развитие на ДВТ и по-ранна проява при млади жени (под 45 години) с носителския статус на FII20210G>A.

20. Комбинираният ефект на тютнопушенето и носителския статус на FII20210G>A допринася за по-висок риск от рекурентност и по-кратък интервал между тромботични инциденти, и при жените, и при мъжете, както и по-ранно развитие на ДВТ инцидент при жени пушачи и носители на 20210 G >A

21. При пациенти жени със затлъстяване и носителския статус на FII20210G>A, вероятността за дълбока венозна тромбоза е по-висока, но е с по-късна проява на събитието в сравнение с жени с нормално тегло.

22. Носителския статус на FII20210G>A увееличава вероятността за по-ранно развитие на ДВТ инцидент при жени с обременена акушерска анамнеза и на хормонална терапия.

### **Репродуктивни проблеми**

23. Носителството на тромбофилични мутации допринася за увеличен риск за загуби на плода в първите гестационни седмици 1-10г.с. и в края на бременността. Общо за целия период от бременност, четири полиморфизма сигнификантно допринасят за загуби на плода, това са 20210 G>A, PLA1/A2, MTHFR, 4G/5G в гена на PAI-1.

24. Носителството на FVL сигнификантно допринася за загубите на плода през седмия лунарен месец, 20, 21, 23, 24 г.с., 29 г.с. а също така и за

- рекурентни спонтанни аборти с  $OR=3.212$  при  $SPA>3$  през 5-7 г.с. Носителството на FVL сигнификантно намалява при загуби на плода през първия лунарен месец, което подкрепя хипотезата за протективното му действие през първите гестационни седмици.
25. Носителството на 20210 G>A сигнификантно допринася за загубите на плода през втория лунарен месец, 4,5,7 г.с и 33 и 34 г.с.
  26. Носителството на MTHFR сигнификантно допринася за загубите на плода през 1<sup>ви</sup> и 2<sup>и</sup> и несигнификантно през 7<sup>и</sup> и 9<sup>ти</sup> лунарни месеци, а също така и за рекурентни спонтанни аборти при ( $SPA>3$ ) през 4-12 г.с.
  27. Носителството на PLA1/A2 сигнификантно допринася за ЗП през втория, третия и четвъртия лунарни месеци, и от 5 до 11г.с и 15-17 г.с. и при две рекурентни събития през първите 2 месеца
  28. Носителството на 4G/5G PAI-1 сигнификантно допринася за загубите на плода през втория, шестия и седми лунарни месеци, от 5 до 8 г.с и 25-27 г.с., а също така и за рекурентни спонтанни аборти при  $SPA>3$  през първите 2 лунарни месеца.
  29. Носителството на PLA1/A2, FII20210G>A, 4G/5G PAI-1 и FVL има принос върху наномеханични свойства и активността на тромбоцитите: височината и площта на тромбоцитите, еластичността на мембраните, активността им и микрочастиците (броя, големина, форма, обем) при жени с нормална бременност и такива със загуба на плода с методите на АСМ и флоуцитометрия .

## 7. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### Оригинални

1. За първи път в света при научно-изследователска работа е използван метода на Kaplan-Meier за оценяване на вероятността за по-ранна проява на следващ инцидент на ДВТ. На базата на този анализ бе установена сигнификантно по-голяма вероятност за по-ранна проява на ДВТ при млади жени носителки на PLA1/A2 и FII20210G>A и при млади пациенти носители на FVL, и по-кратък интервал между два последователни инцидента при млади жени носителки на PLA1/A2 и FVL.

2. За първи път в света при научно-изследователска работа с метода на ACM е показан ефектът на носителството на PLA1/A2, FII20210G>A, 4G/5G PAI-1 и FVL върху наномеханични свойства и активността на тромбоцитите: височината и площта на тромбоцитите, еластичността на мембраните (измерена като модул на Young) и микрочастиците (броя, големина, форма, обем) при пациенти с ДВТ.

3. За първи път в света при научно-изследователска работа чрез метода на флоцитометрия е изследван ефектът на носителство на PLA1/A2, FII20210G>A, 4G/5G PAI-1 върху активността на тромбоцитите измерена като MFI индекс и свойства на формираните микрочастици при пациенти с ДВТ.

4. Настоящото проучване е първо в България, което изследва „приноса“ на носителството на протромботичен полиморфизъм PLA1/A2 в тромбоцитите на гликопротеин GPIIb/IIIa (ITB3) за риска за ранна проява на дълбока венозна тромбоза при млади жени.

5. Настоящото проучване е първо в България, което изследва „приноса“ на носителството на PLA1/A2, 4G/5G PAI-1, FII20210G>A, и FVL върху наномеханични свойства и активността на тромбоцитите: височината и площта на тромбоцитите, еластичността на мембраните, активността им и микрочастиците (броя, големина, форма, обем) при жени с нормална бременност и такива със загуба на плода с методите на ACM и

флуоцитометрия .

### **Научно-практически и потвърдителни**

1. Носителството на тромботични мутации PLA1/A2, 4G/5G PAI-1, FII20210G>A, и FVL има нееднакво значение за ранна проява и рекурентност на ДВТ инциденти при мъже и жени в различни възрастови групи.
2. Комбинирания ефект на начина на живот (тютюнопушенето, наднормено телесно тегло, използване на хормонозаместителна терапия) и носителство на протромботични полиморфизми за ранна проява и рекурентност на ДВТ инциденти е специфичен за всеки един генетичен дефект и пола на пациента.
3. Носителството на тромбофилични мутации допринася за увеличен риск за загуби на плода в първи гестационни седмици 1-10 г.с. и в края на бременността. Общо за целия период на бременност носителство на 20210 G>A, PLA1/A2, MTHFR, 4G/5G PAI-1 сигнификантно допринасят за загуби на плода, докато FVL допринася за ЗП през втория триместър и за рекурентност.
4. Нашите данни показват, че не само триместрите не трябва да се разглеждат като хомогенни периоди, но даже и лунарните месеци. Най-големия брой на жени със СПА инциденти се наброява през 5-6 и 8-9 гестационни седмици, докато за МА инциденти преимущественно се наблюдават през 8-9-10 седмица. Различават се не само броя и вида (спонтанни и мисед аборти), но също така и носителството на определена протромботична мутация

## 8. ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### **В България:**

1. *Ivanov P, Gecheva S, Komsa-Penkova R, Kovacheva K, Konova E, Beshev L, Matkov O, Kamenova A. Recurrent vascular thrombosis on patient with genetic variant C677T of the methyltetrahydrofolate reductase gene. Clinical Application of Immunology, Vol.3, Number 3, Sept 2004: 420-423.*
2. *Иванов П, Ковачева К, Комса-Пенкова Р, Иванов Я, Павлов П, Ножаров В. Генетични фактори за тромбофилия при пациенти с белодробен тромбоемболизъм. Медицински преглед, vol. XLII- 2006, № 1, (78-83).*
3. *Иванов П, Комса-Пенкова Р, Иванов И, Божинова С, Стоянова А. Носителство на тромбофилични фактори сред жени с преeklampsия. . Акушерство и гинекология, 2007, vol 46, 8.*
4. *Иванов П, Ковачева К, Комса-Пенкова Р, Конова Е, Симеонова М, Попов Й, Гечева С, Танчев С, М. Цафаров. Значение на генетичен вариант С677Т МТНFR за ранни повтарящи се загуби на плода. Акушерство и гинекология, 2007, vol 46,4, 19-22.*
5. *П. Иванов, Р. Комса-Пенкова, К. Ковачева, Е. Конова, К. Тодорова, М. Симеонова, Ив. Иванов, С. Стойков, Й. Попов, С. Танчев, Св. Божинова. Значение на носителство на генетични дефекти предразполагащи към тромбофилия за неуспешна асистирана репродукция. Акушерство и гинекология, vol 46, 2007, 6, 3-8.*
6. *Ivanov P., Komsa-Penkova, R., Ivanov I., Bozhinova S., Stoianova A. Carriers of thrombophilic factor among women with preeclampsia (preliminary report). Akush Ginekol (Sofia). 2007;46(8):3-8.4.*
7. *К. Ковачева, А. Антонов, П. Иванов, Н. Цветков, Р. Комса-Пенкова, В. Славчева, Л. Богданов, И. Христов, А. Каменова, И. Иванов. Генетични дефекти за тромбофилия и риск за тромботични усложнения при пациенти с Есенциална тромбоцитемия и Полицитемия вера. I част – Честота на генетични дефекти за тромбофилия при пациенти с Есенциална тромбоцитемия и Полицитемия вера. Клинична и трансфузионна хематология, 2007, vol. XLIII, №1-2, (87-91)*
8. *А. Антонов, К. Ковачева, П. Иванов, Н. Цветков, Р. Комса-Пенкова, В. Славчева, Л. Богданов, И. Христов, А. Каменова, И. Иванов. Генетични дефекти за тромбофилия и риск за тромботични усложнения при пациенти с Есенциална тромбоцитемия и Полицитемия вера. II част – Принос на генетичните дефекти за тромбофилия върху риска за тромботични усложнения. Клинична и трансфузионна хематология, 2007, XLIII, №1-2, 92-97.*
9. *P.Ivanov, R.Komsa-Penkova, K.Kovacheva, E. Konova, K. Todorova, M. Simeonova, I.Ivanov, S.Stoikov, I .Popov, S.Tanchev, S. Vojinova. Importance of carriers of genetic*

*defects predisposing to thrombophilia failed to assisted reproduction. Obstetrics and Gynecology, 2007 vol 46, 6, 8-11.*

10. К. Ковачева, П. Иванов, Е. Конова, М. Симеонова, Р. Комса-Пенкова .Генетични дефекти за тромбофилия (ФакторV Leiden, протромбин G20210A, MTHFR C677T) при жени с повтарящи се загуби на плода. Акушерство и гинекология, 2007, vol 46, 7, (10-16).

11. Ivanov P., Y.Ivanov, R. Komsa-Penkova, I. Ivanov, O.Matkov, L.Beshev. A2 polymorphism in platelet glycoprotein IIb / IIIa in patients with deep venous thrombosis. Modern Medicine, vol 4 / 2008, (29-34)

12. П. Иванов, Р. Комса- Пенкова, К. Ковачева, Е. Конова, М. Симеонова, Влияние на носителството на фактор V LEIDEN за развитието на репродуктивни несполуки в различни периоди на бременността; Медицински преглед, vol. XLIV, 2008, №1, 68-72

13. Иванов П., Стоянова А., Комса – Пенкова Р., Бешев И., Матков О., Иванов Ив. Значение на повишените плазмени нива на хомоцистеин за развитието на дълбоки венозни тромбози. Флебология и ангиология, кн.2/2008 ,66-71

14. Ivanov P, Komsa-Penkova R, Ivanov I, Konova E, Kovacheva K, Stoïkov S, Popov I.

*High risk of recurrent spontaneous abortion during second trimester in women carriers of polymorphism A2 in platelet glycoprotein IIb/IIIa. Akush Ginekol (Sofia). 2008;47(4):3-9.*

15. Ivanov P., Komsa-Penkova R., Kovacheva K., Konova E., Ivanov I.,Todorova K., Simeonova M., Gecheva Sv. Stojkov Sv., Popov J., Tanchev St. Divergent impact of factor V Leiden on development of early and late fetal loss. Medizinski pregled 2008; 1: 68-72

16. Иванов П., Иванов Я., Комса–Пенкова Р., Вродено предразположение към тромбоза (тромбофилия) и значението и при профилактиката и лечението на венозния тромбоемболизъм. Съвременна медицина, кн .../2009, том 60

17. Иванов П, Св. Гечева, Р. Комса-Пенкова, Я. Иванов, М. Иванов, Л. Бешев. Антикардиолин и анти-бета 2гликопротеин I антители при пациенти с венозен тромбоемболизъм . Торакална Медицина, Том I, 2009, бр. 1,(17-21) (IF 0.130)

18. Иванов П, Р. Комса-Пенкова, Цв. Луканов,Я. Иванов, Я. Иванов, О. Матков. Значение на придобити и вродени тромбофилични фактори към риска от развитие на белодробен тромбоемболизъм и дълбока венозна тромбоза. Торакална Медицина, Том I, 2009, бр. 2,(23-28) (IF 0.130)

19. Иванов П, Р. Комса-Пенкова, Я. Иванов, Ив. Иванов,О. Матков, Л. Бешев. Полиморфизъм 4G/5G в гена на плазминоген активатор инхибитор-1 при пациенти с дълбока венозна тромбоза. Съвременна Медицина, бр. 1-2/2009, Том 60, (35-39)

20. М. Иванов, Б.Стаменов, Р.Комса-Пенкова. Повтарящи се исхемични мозъчни инсулти при пациентс повишено ниво на плазмен хомоцистеин, асоциирано с генетичен вариант С677Т в генът за синтез на ензима метилентетрахидрофолатредуктаза *Невросонология и мозъчна хемодинамика*, том 6, 2010, бр. 1: 29-32.
21. П.Иванов, Р.Комса-Пенкова, Ив. Иванов, Е. Конова, К. Ковачева, М. Симеонова, Ст. Танчев. Активност на плазминоген активатор инхибитор-1 при жени с повтарящи се ранни спонтанни аборти. *Акушерство и гинекология*, 5'2010, Volume 49, (3-8) (IF 0.2)
22. Ivanov P, Komsa-Penkova R, Konova E, Gecheva S, Ivanov I, Kovacheva K, Simeonova M, Tanchev S. Combined thrombophilic factors among women with late recurrent spontaneous abortions. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2011;50 (3):8-12. (IF 0.2)
23. Иванов П., Комса – Пенкова Р., Конова Е., Гечева Св., Иванов Ив., Ковачева К., Симеонова М., Танчев Ст. Съчетано носителство на тромбофилични фактори при жени с късни спонтанни аборти. *Акушерство и гинекология*, 2011;3:8-12 (IF 0.2)
24. М. Иванов, Св. Гечева, П. Иванов, П. Лалева, Б. Стаменов, Р. Комса-Пенкова, И. Иванов и Вл. Иванов. Носителство на полиморфизъм А1/А2 в тромбоцитен гликопротеин IIb/IIIa при пациенти с исхемичен мозъчен инсулт - 48, 2012, № 4, 41-45.
25. Ivanov P, Gecheva S, Tsvyatkovska T, Izmailov A, Komsa-Penkova R, Kovacheva K, Konova E, Simeonova M, Tanchev S. Platelet integrin beta3 A1/A2 polymorphism in women with stillbirth. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2012; 51(4):8-12. (IF 0.2)
26. 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. (IF 0.2)
27. П. Иванов, Цв. Цветковска, Р. Комса-Пенкова, З. Камбурова, Е. Конова и Ст. Танчев. Обсъждане значението на вродени тромбофилични фактори съобразно популационната им честота – *Медицински преглед* 49, 2013, № 4, 50-54
28. Regina Komsa-Penkova, Pencho T. Tonchev, Katya S. Kovacheva, Galya B. Georgieva, Yavor Y. Ivanov, Petar D. Ivanov, Georgi M. Golemanov, Sergey D. Iliev. Predisposition to thrombophilia and hypofibrinolysis in pulmonary embolism: Analysis of inherited factors. *Journal of Biomedical & Clinical Research*. Volume 6, Number 2, 2013
29. Ivanov P, Konova E, Komsa-Penkova R, Kovacheva K, Nikolov N, Simeonova M, Tanchev S. Preplacental pregnancy loss in cases of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2014;53(4):12-6. (IF 0.2)
30. Regina Komsa-Penkova, Yavor Ivanov, Pencho Tonchev, Petar Ivanov, Georgi Golemanov, Katya Kovacheva, Sergey Iliev. Predisposition to thrombophilia and hypofibrinolysis in pulmonary embolism: analysis of inherited factors. *Journal Of Biomedical And Clinical Research (JBCR)*, vol 7-41, number 1, suppl.2, 2014.

31. Ivanov P, Gecheva S, Tsvyatkovska T, Izmailov A, Komsa-Penkova R, Kovacheva K, Konova E, Simeonova M, Tanchev S. A weak association of 677 C>T polymorphism in MTHFR with recurrent embryonic loss. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2014;53(1):8-12. (IF 0.2)
32. Комса-Пенкова Р., Големанов Г., Георгиева Г., Славов Н., Поповски К., Ковачева К., Атанасова М., Блажев А. Репродуктивни проблеми при жени със синдром на поликистоза на яйчниците, импакт на PAI-1, носителство на 4G/5G PAI-1 полиморфизъм и BMI. *Акушерство и Гинекология. Volume 53(6): 15-21. ISSN 0324-0959: 05.2014. (IF 0.2)*
33. Ivanov P, Ivanov P, Gacheva S, Konova E, Komsa-Penkova R. Implication of PAI-1 4G/5G polymorphism in recurrent implantation failure after IVF. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2014; 53(3):25-9. (IF 0.2)
34. Komsa-Penkova, R., G. Golemanov, B. Tsankov, L. Beshev, P. Ivanov, P. Tonchev, T. Andreeva, S. Todinova, SND rs1799889(-) in the promotor of the plasminogen activator inhibitor – 1 gene contributes to the risk of dvt in women. *Journal Of Biomedical And Clinical Research (JBCR), Vol. 8 number 2, 2015.*
35. Ivanov P, Konova E, Blajeva S, Lukanov T, Angelova P, Georgieva V, Totev V, Komsa-Penkova R. Sex hormone influence on peripheral natural killer cells count. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2015;54(7):3-7. (IF 0.2)
36. Комса-Пенкова Р., Ковачева К., Иванов П. „Фетални загуби на периода на узряване на плацентата и връзката им с някои прокоагулационни нарушения“. *Акушерство и Гинекология. Vol.55, number 5, 2016г (IF 0.2).*
37. Komsa-Penkova R, Andreeva T, Krumova S, Taneva S, Golemanov G, Georgieva G, Tonchev P, Mihaylova N, Tchorbanov 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.*
38. Dimitrov B, Gincheva V, Simeonova I, Ivanova A, Petkova M, Gospodinov D, Komsa-Penkova R. Recurrent arterial and venous thrombotic events in a Patient with psoriasis. Impact of pai-1 polymorphism: A Case report. *J Biomed Clin Res Volume 9 Number 2, 2016.*

#### **В чужбина:**

1. Ivanov P., Gecheva S., Konova E., Komsa-Penkova R., Kovacheva K, Todorova K., Ivanov I., Lukanov Tz., Aleksovski T., Simeonova M., Stojkov Sv., Popov J., Tanchev St. Preventing adverse obstetric outcomes in women with acquired and inherited thrombophilia *Maced J Med Sci* 2008; 1 (Suppl. 1): S1-S58;
2. Ivanov P, Komsa-Penkova R, Kovacheva K, Ivanov Y, Stoyanova A, Ivanov I, Pavlov P, Glogovska P, Nojarov V. Impact of thrombophilic genetic factors on pulmonary



*embolism - early onset and recurrent incidences. Lung. 2008 Jan-Feb;186 (1):27-36. (IF 1.495)*

3. *Ivanov, PD, Komsa-Penkova RS; Konova EI, Kovacheva KS, Simeonova MN, Popov JD. Association of inherited thrombophilia with embryonic and postembryonic recurrent pregnancy loss. Blood Coagulation & Fibrinolysis. 2009;20(2):134-140. (1.60)*

4. *P. Hristova, P.Pavlov, Y.Ivanov, P.Nikolova, T.Popova, R. Komsa-Penkova, Epidemiological study of spread of chronic obstructive pulmonary disease among workers in Pleven's region,. "Public health and health care in Greece and Bulgaria: The challenge of the cross border collaboration" 2009.*

5. *Ivanov P., Komsa-Penkova RS, Konova EI, Tsvyatkovska TM, Kovacheva KS, Simeonova M, Tanchev SY. Polymorphism A1/A2 in the cell surface integrin subunit beta 3 and disturbance of the implantation and placentation in women with recurrent pregnancy loss. Fertil Steril. 2010 Dec; 94(7):2843-5. Epub 2010 Jun 17 (4.595)*

6. *Sachdeva M, Ivanov P, Komsa-Penkova R, Ivanov Y, Beshev I. Polymorphism A2 in platelet glycoprotein IIb/IIIa among patients with pulmonary embolism and deep venous thrombosis. European Journal of Medical Research, October 13, 2010, 81-82 (IF 1.414)*

7. *Ivanov P, Komsa-Penkova R, Konova E., Tanchev., Taaran Cariappa Ballachanda Subbaiah. Factor v leiden and prothrombin gene mutation g202100a in early pregnancy loss. European Journal of Medical Research, October 13, 2010, 103-104. (IF 1.414)*

8. *Ivanov P, Tsvyatkovska T, Konova E, Komsa-Penkova R. Inherited thrombophilia and IVF failure: the impact of coagulation disorders on implantation process. Am J Reprod Immunol. 2012 Sep;68(3):189-98. doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01156.x. Epub 2012 May 24. Review. (IF 2.916)*

9. *G. Georgieva , R. Komsa , E. Konova, S. Ohri. "The relationship between BMI, diet and very early (embrionic) miscarriages Clinical Nutrition Supplements Volume 7, Issue 1 , Page 29, September 2012 (IF 3.41)*

10. *Tüttelmann F, Ivanov P, Dietzel C, Sofroniou A, Tsvyatkovska TM, Komsa-Penkova RS, Markoff A, Wieacker P, Bogdanova N. Further insights into the role of the annexin A5 M2 haplotype as recurrent pregnancy loss factor, assessing timing of miscarriage and partner risk. Fertil Steril. 2013 Jul 27. 62(8) (IF 3.556/ IF 4.295)*

11. *D.Dimov, G. Golemanov, T. Tacheva, V. Ilieva, G. Prakova, M. Gulubova, R.Komsa-Penkova, T.Vlaykova. MTHFR 677C>T polymorphism in patients with COPD.DOI: 10.1183/13993003 European respiratory journal, Vol 46, 59, 2015(IF 8.322)*

12. *Komsa-Penkova, R. G. Golemanov, P. Ivanov, N. Slavov, K. Kovacheva, P. Tonchev, BMI, leptin and PAI-1 in polycystic ovary syndrome patients, carriers of snd rs1799889, Clinical Nutrition, vol. 34, p S24, 2015. (IF 4.476)*

13. *Komsa-Penkova R, Golemanov G, Tsankov B, Ivanov P, Beshev L, Tonchev P. Rs5918ITGB3 polymorphism, smoking and BMI as risk factors for early onset and*

*recurrence of DVT in young women, Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis, 2016 Jan 5. pii: 1076029615624778. (IF 2.096).*

*14. Todinova S, Komsa-Penkova R, Krumova S, Taneva SG, 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. Clin Appl Thromb Hemost. 2017 Jan 1:1076029616687847. doi: 10.1177/1076029616687847. (IF 2.096).*

## **9. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА**

### ***В България:***

*1. Иванов П, Конова Е, Комса – Пенкова Р, Гечева Св, Цвятковска Цв, Ковачева К, Симеонова М, Танчев С. Носителство на Фактор V Leiden и ефекта му върху имплантацията на ембриона след IVF процедура. Плевенски дни на репродуктивната медицина 2012, 27 Април – 29 Април 2012.*

*2. Gencheva RO, Atanasova TS, Nejdet AM, Ivanov P, Komsa-Penkova R. Molecular biology techniques as a method for increased platelet aggregation establishment. 9th International Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors, Pleven, Bulgaria 12<sup>th</sup>-15th October 2011.*

*3. Иванов П, Комса-Пенкова Р, Конова Е, Ковачева К, Гечева Св, Симеонова М, Танчев Ст. Полиморфизъм А1/А2 в гена на тромбоцитен гликопротеин IIb/ IIIa: ново приложение на антитромботичната терапия при повтарящи се спонтанни аборти. Плевенски имунологични дни 2010, 29 Април – 1 май 2010, Плевен.*

*4. Иванов М, Стаменов Б, Комса-Пенкова Р, Иванов П, Гечева Св. Изследване носителството на полиморфизъм А2 в тромбоцитен гликопротеин IIb/IIIa при пациенти с исхемичен мозъчен инсулт. Пета юбилейна среща на Българската асоциация по невросонография и мозъчна хемодинамика с международно участие, 1- 3 Октомври 2010, София, хотел Родина.*

*5. Иванов М, Комса-Пенкова Р, Стаменов Б, Гечева Св, Иванов П. Генетично детерминирана повишена тромбоцитна агрегация при пациенти с мозъчно-съдова болест. Юбилейна конференция по клинично хранене , Слънчев Бряг, 1-3 октомври, 2010.*

*6. Antonov A, Kovacheva K, Ivanov P, Komsa-Penkova R, Tsvetkov N. Genetic variant 677C>T MTHFR and blood levels of homocystein in patients with Essential thrombocythemia and Polycythemia vera, and thrombotic complications. 4<sup>th</sup> Balkan meeting of haematology. National conference of haematology. 18-20 September 2009, Sofia, Bulgaria.*

7. Иванов П, Гечева Св, Комса-Пенкова Р, Иванов М, Иванов Ив. Сигнификантно значимо носителство на генетични фактори предразполагащи към тромбози, като рискови фактори при различни нозологични единици. V-та национална конференция по клинична лаборатория с международно участие, България, Слънчев бряг, 24- 26 Септември 2009, Abstract book. p. 47- 49- постер.
8. Ivanov M, Stamenov B, Ivanov P, Gesheva S, Komsa-Penkova R, A. Stoyanova A, Lukanov Tz, Konova E, Ivanov I. Combination of Thrombophilic factors as a cause of ischemic stroke in young age- a clinical case. VI international medical scientific conference for student and young doctors, Bulgaria, Pleven, 15- 18 Oct. 2008, Abstract book number 69.
9. Ivanov P, Konova E, Kovacheva K, Komsa-Penkova R, Gecheva S, Stoykov Sv, Simeonova M, Popov J. Impact of inherited trombophilia and antiphospholipid syndrome in recurrent early pregnancy losses. 11<sup>th</sup> International Symposium of the International Coordination Committee for Immunology of Reproduction – 2-4 June, 2006, Varna, Bulgaria:
10. Ковачева К, Антонов А, Иванов П, Цветков Н. Проучване на генетични дефекти за тромбофилия и приноса им върху риска за тромботични усложнения при пациенти с есенциална тромбоцитемия и полицитемия вера. VII национална конференция по клинична хематология, 12-14 Октомври 2006.
11. Иванов П, Ковачева К, Комса-Пенкова Р, Иванов Я, Павлов П, Нождаров В. Изследване носителството на вродени генетични фактори предразполагащи към тромбофилия при пациенти с белодробен тромбемболизъм. Юбилейна научна конференция, 30 години ВМИ-Плевен, 15- 17 Октомври, 2004.
12. Ivanov P, Kovacheva K, Komsa-Penkova R, Ivanov Y, Pavlov P, Nojarov V, Beshev L. Prevalence of the platelet glycoprotein IIb/IIIa A1/A2 polymorphism in patients with venous thrombosis. Third medical Scientific Conference for Students and Young Doctors, 14- 16 October 2004, Abstracts: 123.
13. Ivanov P, Gecheva S, Komsa-Penkova R, Matkov O, Kovacheva K, Kamenova A. Genetic variant C677T in Methylenetetrahydropholate reductase gene in patient with recurrent incidence of arterial and venous thrombosis. Third medical Scientific Conference for Students and Young Doctors, 14- 16 October 2004, Abstracts: 139.
14. Georgieva G., Ohri S., Komsa-Penkova R., Izmaylov A., Konova E., Byrzashki I., Ivanov P. Reproductive problems in obesitas. XIIth International Medical Scientific conference for students and young doctors. 8th-11th October, 2014, Pleven, Bulgaria.
15. R. Komsa- Penkova, G.Golemanov, G. Georgieva- Alexandrova, N. Slavov, K. Popovski, P. Ivanov, K. Kovacheva, M. Atanasova, A. Blajev. Reproductive problems in women with PSOS, the impact of PAI–1 carriers of 4G PAI-1 polymorphism and BMI. Journal of Biomedical and Clinical Research. Vol. 7, No. 1, Suppl. 2, 2014
16. Antonov A, Kovacheva K, Ivanov P, Komsa-Penkova R, Tsvetkov N. Genetic variant 677C>T MTHFR and blood levels of homocystein in patients with Essencial

*thrombocytopenia and Polycythemia vera, and thrombotic complications. 4th Balkan meeting of haematology. National conference of haematology. 18-20 September 2009, Sofia, Bulgaria.*

**В чужбина:**

1. Ivanov P, Konova E, Lukanov Tz, Ajvazova N, Tsvyatkovska Tsv, Rilcheva V, Georgieva V. Place of peripheral NK cells count in recurrent pregnancy loss evaluation: taking into account the age-related changes . 6th Pacific Congress on Controversies in Gynecology, Infertility & Ultrasound (COGI), November 20-22, 2014; Ho Chi Minh City (Saigon), Vietnam.

2. D. Dimov, G. Golemanov, T. Tacheva, V. Ilieva, G. Prakova, M. Gulubova, R. Komsa-Penkova, T. Vlaykova, PA4892MTHFR 677C>T polymorphism in patients with COPD, Abstracts/ 25th International Congress ERS, Amsterdam, Netherlands 26th –30th September 2015, volume 46/ supplement 59 september 2015

3. Ivanov P, Komsa-Penkova R, Konova E, Ivanov Vl, Gecheva Sv. Kovacheva K, Simeonova M. Plasminogen activator inhibitor type I activity: impaired fibrinolysis and early pregnancy wastage. 23rd Biennial International Congress on Thrombosis, MLTD Congress, May 14-17, 2014; Valencia, Spain.

4. Ivanov M, Stamenov B, Komsa-Penkova R, Gecheva S, Ivanov P. Significance of carrier A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIb/IIIa for ischemic stroke development in young age. The V<sup>th</sup> World Congress on CONy, October 13-16, 2011; Beijing, China.

5. Ivanov P, Komsa-Penkova R, Konova E, Tsvyatkovska Tsv, Ivanov I, Kovacheva K, Simeonova M, Tanchev St. Polymorphism 4G/5G in plasminogen activator inhibitor type I as a factor for early recurrent pregnancy loss development. XIII Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis – July 23-28, 2011; Kyoto, Japan. Abstract Number P-MO-138.

6. Ivanov P, Komsa-Penkova R, Konova E, Tsvyatkovska Tsv, Ivanov I, Kovacheva K, Simeonova M. Combined Thrombophilic Mutations in Women with Recurrent Early and Late Spontaneous Pregnancy Loss. The 6th Congress of the Asia Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis. October 13 – 16, 2010; Grand Hyatt Hotel - Nusa Dua, Bali, Indonesia.

7. Ivanov P, Konova E, Komsa-Penkova R, Tsvyatkovska Tsv, Ivanov I, Kovacheva K, Emin A, Korsachki G. Effect of inherited thrombophilic factors on secondary infertility. The 13th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI). November 4-7, 2010; Maritim Hotel, Berlin, Germany.

8. Ivanov P, Gecheva S, Konova E, Komsa-Penkova R, Kovacheva K, Todorova K, Ivanov I, Lukanov Tz, Aleksavska T, Simeonova M, Stojkov Sv, Popov J, Tanchev St. Preventing adverse obstetric outcomes in women with acquired and inherited thrombophilia. 5th Balkan Congress of Immunology, Macedonian Journal of medical Sciences, 1-3 June 2008; Ohrid, Macedonia. (Suppl. 1):S1-S58.

- 9.** Gesheva S, Ivanov M, Ivanov P, Stamenov B, Lukanov Tz, Ivanov I, Komsa-Penkova R. Polymorfism A2 In Platelet Glycoprotein IIb/IIIa in Platelets With Ishaemic Stroke. 2<sup>nd</sup> World Congress on Controversies In Neurology CONy, October 23- 26, 2008; Athens, Greece, Abstract book, A-77- poster.
- 10.** Ivanov P, Kovacheva K, Komsa-Penkova R, Popov J, Simeonova M, Stojkov S. Trombophilic Genetic factors in women with history of spontaneous fetal loss. The 7<sup>th</sup> world congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility, April 14- 17, 2005; Athens, Greece.
- 11.** Ivanov P, Komsa-Penkova R, Kovacheva K, Ivanov Y, Pavlov P, Nojarov V. Contribution of thrombophilic genetic factors in development and recurrent manifestation of pulmonary embolism in young patients. ERS 15th Annual Congress, September 17-21, 2005; Copenhagen, Denmark, Abstract 4445.
- 12.** Ivanov P, Kovacheva K, Komsa-Penkova R, Ivanov Y, Pavlov P, Nojarov V. analysis of inherited thrombophilic factors in patients with pulmonary thrombembolism. 6th Balkan Meeting of Human Genetics, August 28-31, 2004; Thessaloniki, Greece, Abstract 145.