

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА
КАТЕДРА НЕФРОЛОГИЯ, ХЕМАТОЛОГИЯ И ГАСТРОЕНТЕРОЛОГИЯ

Д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова

Клинично значение на генетични, имунологични и коморбидни фактори за определяне тромбогенния риск при пациенти с миелопролиферативни неоплазии

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„ ДОКТОР ”**

Докторска програма: Хематология и преливане на кръв

Научни ръководители:

Проф. д-р Лиана Тодорова Герчева-Кючукова, д.м.

Проф. д-р Катя Стефанова Ковачева-Коцева, д.м.

Научно жури:

Доц. д-р Ваня Славчева Попова, д.м.

Доц. д-р Явор Йорданов Иванов, д.м.

Проф. д-р Веселина Стефанова Горанова–Маринова, д.м.

Проф. д-р Маргарита Любенова Генова, д.м.

Проф. д-р Георги Николаевич Балаценко, д.м.

ПЛЕВЕН, 2024 г.

Дисертационният труд е разработен върху 170 страници, съдържа 26 фигури, 47 таблици и 5 приложения. Библиографията включва 223 източника, от които 2 на кирилица, останалите на латиница, в голямата си част от последните 10 години, а 49 – от последните 5 години.

Представените данни са резултат от разработването на проекти, финансирани от МУ – Плевен: проект N 13/2013, проект N 2/2015, проект N 9/ 2017 и N 9/ 2019.

Авторът е докторант в самостоятелна форма на обучение към катедра „Нефрология, хематология и гастроентерология”, Факултет по Медицина, Медицински университет – Плевен.

Дисертационният труд е обсъден и определен за защита на разширен Катедрен съвет на Катедра „Нефрология, хематология и гастроентерология”, Факултет по Медицина, Медицински университет – Плевен, състоял се на 09.04.2024г.

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

Състав на Научното жури:

Председател:

Доц. д-р Ваня Славчева Попова, д.м.

Членове:

Доц. д-р Явор Йорданов Иванов, д.м.

Проф. Веселина Стефанова Горанова-Маринова, д.м.

Проф. д-р Маргарита Любенова Генова, д.м.

Проф. д-р Георги Николаевич Балаценко, д.м.

Резервни членове:

Доц. Д-р Иван Ангелов Щърбанов, д.м.

Доц. Д-р Иванка Славейкова Ненова-Чилова, к.м.н.

Защитата ще се състои на 22.07.2024 год. от 11:00 ч. в зала 113 – Луи Пастър, Факултет по Фармация, Медицински университет – Плевен.

СЪДЪРЖАНИЕ

I.	УВОД	7
II.	ЦЕЛ	8
III.	ЗАДАЧИ	8
IV.	МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	9
1.	Материал	9
2.	Методи	10
2.1.	Анкетен метод	10
2.2.	Лабораторни методи	11
2.3.	ДНК анализ	11
2.4.	Имунофенотипизиране на периферна кръв	11
2.5.	RT-PCR	12
2.6.	Статистически методи	12
V.	РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	13
1.	Обща характеристика на изследваните пациенти и контролните групи	13
1.1.	Разпределение по възраст	13
1.2.	Разпределение по пол	13
1.3.	Разпределение в зависимост от поставената диагноза	15
2.	Тромботични събития в пациентската група	15
3.	Генетична тромбофилия	16
3.1.	Обща честота на генетична тромбофилия в ПГ и КГ1 – резултати от изпълнение на задача 1	16
3.2.	Честота на носителството на FVL	17
3.3.	Честота на носителството на полиморфизъм G20210A в гена за протромбин	18
3.4.	Честота на носителството на полиморфизъм PLA1/PLA2 в гена за гликопротеин Пв/IIIa	18
4.	Асоциация между носителството на генетичната тромбофилия и наличието на ТС – резултати от изпълнение на задача 2	19
4.1.	Асоциация между носителството на FVL и наличието на ТС	19
4.2.	Асоциация между носителството на G20210A и наличието на ТС	19
4.3.	Асоциация между носителството на PLA1/A2 и наличието на ТС	20

5.	Носителство на генетична тромбофилия и тромбогенен риск в пациентските подгрупи спрямо вида на заболяването - резултати от изпълнение на задача 3	20
5.1.	Полицитемия вера	20
5.2.	Есенциална тромбоцитемия	22
5.3.	Миелофиброза	25
5.4.	Хронична миелоидна левкемия	28
5.5.	Обобщени данни за тромбофилично носителство в ПГ	30
6.	Носителство на точковата мутация JAK2V617F - резултати от изпълнение на задача 4	31
6.1.	Обща честота	31
6.2.	Асоциация между носителството на JAK2V617F и наличието на ТС	31
7.	Комбинирано носителство – включително на генетична тромбофилия и мутация V617F в JAK2 гена	31
8.	Влияние на показателите в ПКК за тромбогенния риск при пациенти с ХМПН - резултати от изпълнение на задача 5	34
8.1.	Обобщени данни за пациентите според отклоненията в стойностите на левкоцити, хемоглобин и тромбоцити	34
8.2.	Значение на левкоцитозата за развитието на ТС	35
8.3.	Значение на завишената стойност на хемоглобина за развитието на ТС	36
8.4.	Значение на завишената стойност на тромбоцитния брой за развитието на ТС..	37
9.	Експресия на CD11b/CD18 по повърхността на неутрофили - резултати от изпълнение на задача 6	38
9.1.	Експресия на CD11b/CD18 по повърхността на неутрофилите в пациентската група и КГ2	38
9.2.	Експресия на CD11b/CD18 по повърхността на неутрофили и връзка с регистрирано ТС	39
9.3.	Сравнение на повърхностната CD11b/CD18 неутрофилна експресия между пациентката група и КГ2	41
9.4.	Логистична регресия	41
9.5.	Повърхностната CD11b/CD18 неутрофилна експресия при пациенти с ХМПН и левкоцитоза	42
9.6.	Повърхностната CD11b/CD18 неутрофилна експресия при пациенти с ХМПН и тромбоцитоза	43

9.7. Повърхностната CD11b/CD18 неутрофилна експресия при пациенти с ХМПН и генетични отклонения	44
10. Коморбидност и тромбогенен риск при пациенти с ХМПН - резултати от изпълнение на задача 7	45
10.1. Общи данни за ПГ	45
10.2. Коморбидност по подгрупи спрямо заболяването	48
11. Комплексната тромбоетиопатогенеза при ХМПН	49
12. Рискови фактори при пациентите и възможното им проследяване в практиката	51
VI. ОБЩИ ИЗВОДИ	55
VII. ПРИНОСИ	56
VIII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	57
ПРИЛОЖЕНИЯ	59

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица

АХ – артериална хипертония	ПВ – полицитемия вера
БТЕ – белодробна тромбоемболия	ПГ – пациентска група
ДВТ – дълбока венозна тромбоза	ПКК – пълна кръвна картина
ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина	СЗО – Световна здравна организация
ЕТ – есенциална тромбоцитемия	СН – сърдечна недостатъчност
ЗД – захарен диабет	ТКИ – тирозинкиназен инхибитор
ИБС – исхемична болест на сърцето	ТС – тромботично/и събитие/я
ИМИ – исхемичен мозъчен инсулт	ФХ – Филадельфийска хромозома
КГ1/КГ2 – контролна група ½	ХМЛ – хронична миелоидна левкемия
МИ – миокарден инфаркт	ХМПН – хронични миелопролиферативни неоплазии
МФ – миелофиброза	

На латиница

CI – confidence interval	N - брой
FVL – factor V Leiden	OR – odds ratio
G20210A - мутация G20210A в протромбиновия ген	p – probability value; статистическа значимост
IPSET - International Prognostic Score for ЕТ	PLA1/A2 - мутация в гена за гликопротеин GP IIb/IIIa
IQR – интерквартилен размах	RR – relative risk
JAK – Janus kinase	RT-PCR - reverse transcription polymerase chain reaction
Mean – средна аритметична стойност	SD – стандартно отклонение
Median - медиана	
Min/max – мин/макс стойност	

I. УВОД

Хроничните миелопролиферативни неоплазии (ХМПН) са клонални хематологични заболявания, при които се развива автономна, ускорена пролиферация на клетъчни прекурсори в костния мозък. Основания да бъдат обединени в една група са общите им характеристики: наличие на клонален маркер и генетични мутации, които потенцират свръхактивност на патологична тирозин киназа; неконтролирано производство на малигнен клон клетки; възможна трансформация между заболяванията и еволюция в бластна фаза. Все по-често те се диагностицират при пациенти около и под 60-годишна възраст, при които се очаква заболяването да има по-голяма давност, изисква по-продължително лечение, чести промени във вида терапия, профилактика на непосредствените и дългосрочни усложнения. Причина за повишена смъртност и заболяемост при ХМПН са тромботичните усложнения, с честота, достигаща до близо 40% при някои от тях. Тромбогенезата може да бъде стимулирана от различни фактори: възраст, пол, тютюнопушене, преживени тромботични усложнения, коморбидности, генетични фактори (носителство на генетични дефекти за тромбофилия, носителство на мутация JAK2V617F), патологично променена коагулация (свръхактивиране на кръвосъсирването, потисната фибринолиза, наличие на възпалителни цитокини), промени в кръвните показатели (еритроцитоза, левкоцитоза, тромбоцитоза), както и нарушена функция на някои кръвни клетки (тромбоцитни структурни аномалии и промени по мембранните рецептори, ендотелна дисфункция, левкоцитна активация, тромбоцитна активация и наличие на тромботични микрочастици, образуване на левкоцитно-тромбоцитни агрегати). Предвид мултифакторната генеза на тромботичните усложнения в тази пациентска група е важно доброто познание за тях с оглед оптималните им профилактика и лечение.

II. ЦЕЛ

Да се проучи ролята на някои генетични [FVL (factor V Leiden), G20210A (мутация G20210A в протромбиновия ген), PLA1/A2 (мутация в гена за гликопротеин GP IIb/IIIa), JAK2V617F носителство], имунологични (CD11b/CD18 експресия) и коморбидни фактори (придружаващи заболявания) в тромбогенезата при пациенти с ХМПН.

III. ЗАДАЧИ

1. Да се установи честотата на носителство на генетични дефекти за тромбофилия при пациенти с ХМПН и да се сравни с контролна група здрави лица.
2. Да се сравни честотата на носителство на тромбофиличните дефекти при пациенти с проявени тромботични събития (ТС) спрямо пациенти без регистрирани тромботични прояви.
3. Да се проучи асоциацията между носителство на генетична тромбофилия и тромбогенния риск при пациентите с различни видове ХМПН.
4. Да се установи честотата и клиничното значение за тромбогенния риск при пациенти, носители на JAK2V617F мутация и комбинирани носители на генетични отклонения.
5. Да се проучи значението на показателите в пълната кръвна картина (ПКК) за тромбогенния риск при пациенти с ХМПН
6. Да се установи нивото на експресия на CD11b/CD18 върху неутрофилите на пациентите, да се сравни с тази в контролната група и да се проучи връзката между експресия и носителство на генетични дефекти при пациенти със и без преживяно ТС в отделните пациентски подгрупи.
7. Да се проучи ролята на коморбидните фактори върху тромбогенния риск при пациенти с ХМПН.

IV. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Материал

За изпълнение на поставените цел и задачи проведохме проспективно проучване от типа случай-контрола с подбор на участниците спрямо заболяване, възраст и пол. Данните от анамнезата за коморбидни/рискови фактори, преживяни ТС, стойности на кръвните клетки и JAK2V617F носителство са събрани ретроспективно, по документален метод.

Проучването обхваща периода от 2013 до 2019 год. Изследвани са 138 пациенти с доказана ХМПН на възраст между 23 и 90 год., преминали през Клиника по Хематология, УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ ЕАД, гр. Плевен или амбулаторно проследявани към Хематологичен кабинет. Разделени са в 4 подгрупи спрямо вида на заболяването. Контролните групи са две.

- **Пациентска група (ПГ)**

Пациентската група включва 138 лица (63 жени и 75 мъже) на средна възраст 63.18 год. \pm 14.03, диагностицирани с ХМПН спрямо критериите на СЗО (Световната здравна организация) от 2008 и 2016 год. Пациентите са подбрани спрямо включващи и изключващи критерии, представени в табл. 1.

Таблица 1. Включващи и изключващи критерии за подбор на ПГ

Включващи критерии	Изключващи критерии
<ul style="list-style-type: none">• Поставена диагноза ХМПН спрямо критериите на СЗО	<ul style="list-style-type: none">• Диагноза, различна от ХМЛ (хронична миелоидна левкемия), ПВ (полицитемия вера), ЕТ (есенциална тромбоцитемия), МФ (миелофиброза) по критериите на СЗО
<ul style="list-style-type: none">• Възраст над 18 год.	<ul style="list-style-type: none">• Възраст под 18 год.
<ul style="list-style-type: none">• Доброволно подписано информирано съгласие за участие в проучването (прил.1)	<ul style="list-style-type: none">• Отказ да подпише информирано съгласие

Всички пациенти са изследвани за носителство на генетична тромбофилия. Тъй като проучването е резултат от няколко научно-изследователски проекта, при които в перспектива се развиваше научната идея, първите включени пациенти нямат изследвана експресия на CD11b/CD18 по гранулоцитната повърхност. Поради това този показател е проучен при 113 от пациентите.

- **Първа контролна група (КГ1) – за генетична тромбофилия**

Първата контролна група обхваща 108 здрави доброволци (53 жени и 55 мъже) на средна възраст 31.57 год. \pm 0.95, при които няма данни за ХМПН и няма регистрирани ТС. Пациентите са подбрани спрямо представените в табл. 2 включващи и изключващи критерии.

Таблица 2. Включващи и изключващи критерии за подбор на КГ1

Включващи критерии	Изключващи критерии
• Възраст над 18 год.	• Възраст под 18 год.
• Липса на анамнеза за поставена диагноза ХМПН спрямо критериите на СЗО	• Поставена диагноза ХМПН спрямо критериите на СЗО
• Липса на анамнеза за преживяно ТС	• Преживяно ТС
• Доброволно подписано информирано съгласие за участие в проучването (прил. 2)	• Отказ да подпише информирано съгласие

- **Втора контролна група (КГ2) – за експресия на CD11b/CD18 върху неутрофили**

Втората контролна група включва 46 здрави доброволци (13 жени и 33 мъже) на средна възраст 62.63 год. \pm 12.90. При тях няма анамнестични данни за поставена диагноза ХМПН и преживяно ТС. Включващите и изключващи критерии за КГ2 са както при КГ1 (табл. 2).

2. Методи

2.1. Анкетен метод – чрез специално изготвена анкета (прил. 3) е събрана паспортна информация, кратка история на заболяването и актуалното му лечение, минали и придружаващи заболявания [миокарден инфаркт (МИ), исхемична болест на сърцето (ИБС), артериална хипертония (АХ), сърдечна недостатъчност (СН), захарен диабет (ЗД), затлъстяване, хиперлипидемия, чернодробно страдание или други неоплазии], анамнеза за преживяни тромботични инциденти преди и след диагностициране на заболяването, фамилната обремененост за такива, както и най-честите провокиращи фактори за тромбообразуване – оперативна интервенция, травма, продължителна имобилизация, злокачествени заболявания, хормоно-заместителна терапия, тютюнопушене. За жените е събрана допълнително информация за наличието на спонтанни аборти и усложнения по време на бременност.

2.2. Лабораторни методи - изследване на показателите в ПКК. Стойностите на хемоглобин, еритроцити, левкоцити и тромбоцити са установени при автоматично изброяване. Референциите са посочени в прил. 4.

2.3. ДНК (дезоксирибонуклеинова киселина) анализ в следните етапи:

- Изолиране на ДНК от венозна кръв чрез солево екстрахиране и с комерсиални китове за изолиране на ДНК от периферна кръв „AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit” – BIONEER по утвърдени лабораторни протоколи и препоръки на производителя.
- Генотипиране на FVL, G20210A мутация и PLA1/A2 мутация посредством рестрикционен анализ с използване на платформата PicoReal 96 – Real-time PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) - Thermoscientific.
- Последващ анализ на алелните профили, отчитани на агарозна електрофореза.

2.4. Имунотипизиране на периферна кръв - левкоцитите са изследвани от цялостна венозна кръв в рамките на 2 часа от добиването ѝ чрез флоуцитометрия. Използван е двулазерен цитометър, FACS Calibur cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Анализът на резултатите е извършен с компютърен софтуер Cell Quest. Кръвните клетки са обработени с комбинация от две моноклонални антитела, белязани с два различни флуорохрома. След лизиране на еритроцитите (Lysis buffer; Becton Dickinson) и двойно промиване, свързаните с моноклонални антитела левкоцити са ресуспендирани и фиксирани (CellFIX, BD Biosciences). След набирание на 10 000 клетки за всяка проба са изследвани размер на клетката

и клетъчна гранулираност чрез предно разсейване/странично разсейване (FSC/SSC) с цел определяне на популацията на интерес (лимфоцитно гейтиране). Флоуцитометърът е калибриран ежедневно с калибрационни бийдове и получените резултати са анализирани с FACS Comp software©2007 Becton Dickinson. Чрез определяне флуоресценцията от съответните моноклонални антитела са идентифицирани и клетъчните субпопулации.

2.5. RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) – чрез документален метод е събрана информация за пациентите относно носителство на JAK2V617F - Лаборатория по Цитогенетика и молекулярна биология към Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания.

2.6. Статистически анализ - данните от проучването са обработени със софтуерни статистически пакети STATGRAPHICS, SPSS и EXCEL for Windows. Използвани са 2 калкулатора, налични в интернет:

- Georgiev G.Z., "Odds Ratio Calculator", [online] Available at: <https://www.gigacalculator.com/calculators/odds-ratio-calculator.php> URL [Accessed Date: 01 Feb, 2024]
- MedCalc Software Ltd. Odds ratio calculator. <https://www.medcalc.org/calc/> (Version 22.019; accessed February 1, 2024)

Резултатите са описани чрез таблици, графики и числови показатели за структура, честота, средни стойности, корелационни коефициенти и други.

При анализа на резултатите са приложени следните параметрични тестове за проверка на хипотези при нормално и близко до нормалното разпределение на случаите: t – test, ANOVA с post hoc tests Tukey, Scheffe, Bonferroni, Newman-Keuls, Duncan и непараметричните тестове при различно от нормалното разпределение на случаите Pearson χ^2 - test, Mann-Whitney, Kruscal-Wallis H-test.

За моделиране и прогнозиране на корелационни зависимости са използвани регресионни модели. За моделиране и сравняване на данни от типа време-събитие е приложен теста Kaplan-Maier.

Значимостта на резултатите, изводите и заключенията е определяна при $p < 0.05$.

Представените данни са резултат от разработването на проекти, финансирани от МУ – Плевен: проект N 13/2013, проект N 2/2015, проект N 9/ 2017 и N 9/ 2019 (прил. 4).

V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Обща характеристика на изследваните пациенти и контролните групи

1.1. Разпределение по възраст

В проучването са включени *138 пациенти на средна възраст 63.18±14.03 години (от 23 до 90 год.)*, избрани на случаен принцип, преминали през Клиника по Хематология, УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ ЕАД и хематологичен кабинет, за период от 5 години – от март 2013 год. до март 2019 год. Пациентите са включени в проучването в различен момент спрямо поставянето на диагнозата им.

Включените в контролните групи индивиди също са подбрани на случаен принцип.

Разликата във възрастта между ПГ и КГ1 е статистически значима ($p<0.05$). Получените резултати не се обсъждат в контекста на фактор „възраст“ при провеждане на съпоставка с контролните групи. Разликата във възрастта между ПГ и КГ2 не е статистически значима ($p=0.96$) (табл. 3).

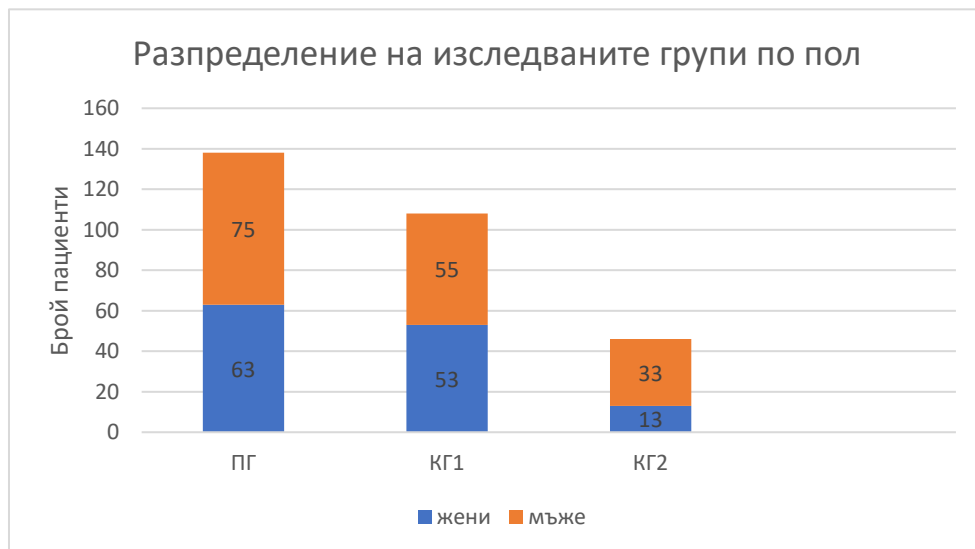
Таблица 3. Разпределение на изследваните групи по възраст.

	ПГ	КГ1	КГ2
<i>Средна възраст (години)</i>	63.18	31.57	62.63
<i>Стандартно отклонение (SD)</i>	14.03	0.951	12.90
<i>Статистическа значимост (p) спрямо ПГ</i>		p<0.05	p=0.96

1.2. Разпределение по пол

Съотношението между жени и мъже в ПГ е 1:1.19 – 63 жени (45.65%) към 75 мъже (54.35%). Разпределението на доброволците от КГ1 е 1:1.03 – 53 жени (49.07%) към 55 мъже (50.93%). Разликата не е статистически значима ($p=0.79$). Разпределението на

доброволците от КГ2 е 1:2.54 - 13 жени (28.26%) и 33 мъже (71.74%). Разликата е статистически значима ($p < 0.05$) (фиг. 1).



Фигура 1. Разпределение на индивидите от ПГ, КГ1 и КГ2 по пол.

Последващият анализ на резултатите не включва интерпретация по „пол“ и е независим от този фактор. В потвърждение на това - не се установи статистически значимо различие в регистрираните ТС между жени и мъже ($\chi^2=2.25$, $df=1$, $N=138$, $p=0.13$, $\phi=0.13$) (табл. 4).

Таблица 4. Разпределение на изследваните групи по пол.

Пол	ПГ	ПК1	ПК2
<i>Жени (брой)</i>	63	53	13
<i>Мъже (брой)</i>	75	55	33
<i>Статистическа значимост (p)</i>	$p=0.15$	$p=0.79$	$p<0.05$

1.3. Разпределение в зависимост от поставената диагноза

Според вида ХМПН пациентите биват разделени в 4 подгрупи: с диагноза *ПВ* – 49 (35.51%), *ЕТ* – 20 (14.49%), *МФ* – 39 (28.26%) и *ХМЛ* – 30 (21.74%) (фиг. 2). Разликата между групите е статистически значима ($\chi^2=13.36$, $p=0.004$). За избягване на неправилна интерпретация анализите са проведени общо за групата пациенти, както и за всяка отделна подгрупа с последваща интерпретация в зависимост от броя индивиди.



Фигура 2. Разпределение на пациентите според вида на заболяването

2. Тромботични събития в ПГ

Използваният в проучването термин „тромботично събитие“ включва венозни и артериални тромбози. Пациентите са съобщили за следните видове преживени ТС: МИ (миокарден инфаркт), МИ (исхемичен мозъчен инсулт), ДВТ (дълбока венозна тромбоза), БТЕ (белодробна тромбоемболия), спленален инфаркт, спонтанен аборт при жени.

Честотата на ТС в пациентската група е 28.26%. Установяват се 39 пациенти с преживяно събитие, а трима от тях имат по два преживени съдови инцидента, затова общо събитията са 42. При останалите 99 (71.74%) пациенти няма документирано ТС (фиг. 3). При здравите доброволци от КГ1 и КГ2 няма регистрирани събития преди и през периода на проучването.



Фигура 3. Тромботични събития в пациентската група

Получената в нашето проучване тромботична честота от 28.26% за цялата ПГ е съпоставима с докладваната при пациенти с ХМПН от други източници – около 20%, но се откриват и литературни данни за значимо по-голяма - над 40%. Повечето налични проучвания са в отделните подгрупи по вид заболяване, но не и за цялата група.

3. Генетична тромбофилия

3.1. Обща честота на генетична тромбофилия в ПГ и КГ1 – резултати от изпълнение на задача 1

Всички 138 пациенти са изследвани за генетична тромбофилия. От тях *при 48 (34.78%) има доказано носителство на проучваните фактори (FVL, G20210A, PLA1/A2) в хетерозиготно или хомозиготно състояние. В КГ1 то се установява при 25 (23.15%). Разликата в честотата е статистически значима (odds ratio - OR=1.77; 95% confidence interval - CI [1.00-3.13]; p=0.02; t=1.97). В съответствие с нашите резултати са докладваните в литературата, но основно за пациенти с ПВ и ЕТ. Не бяха открити литературни данни за честота на генетична тромбофилия в цялата група ХМПН – ФХ (Филадельфийска хромозома)-позитивни и негативни.*

В таблица 5 е представена честотата на носителство на генетична тромбофилия при пациенти и здрави контроли в зависимост от анамнезата за преживяно ТС.

Табл. 5. Носителство на генетична тромбофилия и наличие на ТС в ПГ и КГ1.

Фактори за генетична тромбофилия	ПГ (N=138 пациенти)		КГ1, N=108 доброволци, (% от 108)
	<i>С регистрирано ТС, N=39 (% от 138)</i>	<i>Без регистрирано ТС, N=99 (% от 138)</i>	
<u>Фактор V Leiden (FVL)</u>			
Хомозигот по нормален ген	39 (28.26%)	95 (68.84%)	101 (93.52%)
Хетерозигот по мутантен ген	0 (0.0%)	4 (2.90%)	7 (6.48%)
Хомозигот по мутантен ген	0 (0.0%)	0 (0%)	0 (0.0%)
<u>Мутация в протромбиновия ген (G20210A)</u>			
Хомозигот по нормален ген	35 (25.36%)	93 (67.39%)	105 (97.22%)
Хетерозигот по мутантен ген	4 (2.90%)	6 (4.35%)	3 (2.78%)
Хомозигот по мутантен ген	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<u>Мутация в гена за гликопротеин GP IIb/IIIa (PLA1/A2)</u>			
Хомозигот по нормален ген	30 (21.74%)	71 (51.45%)	93 (86.11%)
Хетерозигот по мутантен ген	8 (5.8%)	25 (18.12%)	14 (12.96%)
Хомозигот по мутантен ген	1 (0.72%)	3 (2.17%)	1 (0.93%)
<u>Общо носителство на генетична тромбофилия</u>			
Носители	12 (8.7%)	36 (26.09%)	25 (23.15%)
Неносители	27 (19.57%)	63 (45.65%)	83 (76.85%)

3.2. Честота на носителството на FVL

В изследваната ПГ се установяват 4 (2.90%) хетерозиготни носители на FVL – 2 пациенти с ПВ и 2 с ХМЛ. В КГ1 са близо 2 пъти повече – 7 (6.48%). Неносителите на FVL (хомозиготи по нормалния ген) в ПГ са 134 (97.10%), а в КГ1 са 101 (93.52%).

Не се установи статистически значимо различие в честотата на FVL носителство между ПГ и КГ1 (OR=0.45, 95%CI [0.13-1.49], p=0.09, t=1.31; $\chi^2=1.82$,

p=0.18). Генетичният дефект не се среща по-често сред пациенти с ХМПН спрямо КГ1, потвърдено и от литературни източници.

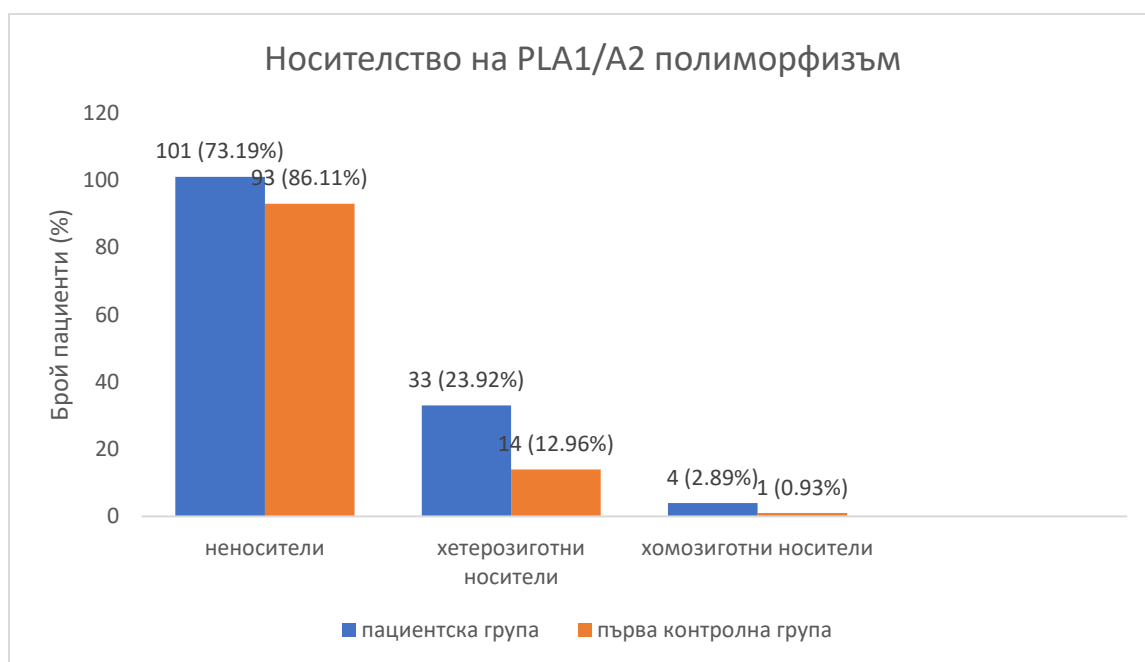
3.3. Честота на носителството на полиморфизъм G20210A в гена за протромбин

В изследваната ПГ се установяват 10 (7.25%) хетерозиготни носители на G20210A – 5 пациенти с МФ, 3 с ХМЛ, 1 с ПВ и 1 с ЕТ. В КГ1 са около 3 пъти по-малко – 3 (2.78%). Неносителите на G20210A в ПГ са 128 (92.75%), а в КГ1 са 105 (97.22%).

Не се установи статистически значимо различие в честотата на G20210A носителство между ПГ и КГ1 (OR=2.61, 95%CI [0.74-9.25], p=0.07, t=1.49; $\chi^2=1.81$, p=0.18). *Генетичният дефект е рисков фактор, но не се среща значимо по-често сред пациенти с ХМПН спрямо КГ1.*

3.4. Честота на носителство на полиморфизъм PLA1/2 в гена за гликопротеин IIb/IIIa (PLA1/A2)

В изследваната ПГ се установяват 37 (26.81%) носители на PLA1/A2 – от тях 4 (2.89%) хомозиготи и 33 (23.92%) хетерозиготи. Хомозиготните носители са 3 с ПВ и 1 с МФ, а хетерозиготните са 9 с ПВ, 9 с ХМЛ, 7 с ЕТ и 8 с МФ. В КГ1 честотата е значимо по-малка – 15 (13.89%) носители, от които 1 (0.93%) хомозигот и 14 (12.96%) хетерозиготи. Неносителите на PLA1/A2 в ПГ са 101 (73.19%), а в КГ1 са 93 (86.11%) (фиг. 4).



Фигура 4. Носителство на PLA1/A2 в ПГ и КГ1.

Установи се статистически значимо различие в честотата на PLA1/A2 носителство между ПГ и КГ1 (OR=1.93, 95%CI [1.12-3.33], **p=0.009**, t=2.37; $\chi^2=6.04$, **p=0.01**). *Генетичният дефект се среща значимо по-често в ПГ спрямо КГ1 и се счита за рисков фактор.* В потвърждение на нашите данни са докладваните от български и международни автори. В литературата липсват конкретни данни за съпоставка честотата на PLA1/A2 носителството общо за групата ХМПН. Повечето автори единствено споменават, че количествените и качествени промени в тези рецептори повишават тромбогенния риск.

4. Асоциация между носителството на генетична тромбофилия и наличието на ТС – резултати от изпълнение на задача 2

4.1. Асоциация между носителството на FVL и наличието на ТС

Няма регистрирани ТС сред изследваните от нас пациенти, носители на FVL. *Не се установява статистически значима разлика в тромботичната честота между носители и неносители на FVL в ПГ (OR=0.27, 95%CI [0.01-5.11], p=0.38; $\chi^2=1.51$, p=0.28), както и между носителите в ПГ и КГ1. Няма и промяна в риска за преживяване на ТС. Налични са единични публикации в литературата с противоположни на нашите резултати, но повечето автори подкрепят заключенията ни.*

4.2. Асоциация между носителството на G20210A и наличието на ТС

В ПГ има 10 (7.25%) пациенти, носители на полиморфизма G20210A, а в КГ1 – 3 (2.78%). Всички носители са хетерозиготи по мутантния ген. От ПГ при 4 (2.90%) носители е регистрирано ТС. Не се установява статистически значима разлика в тромботичната честота между пациентите и здравите доброволци от КГ1, носители на мутацията (OR=2.73, 95%CI [0.73-10.19], p=0.07, t=1.50; $\chi^2=3.17$, p=0.08; relative risk - RR=2.61, 95%CI [0.74-9.25], p=0.07, t=1.49), както и в ПГ между носители и неносители на G20210A (OR=1.77, 95%CI [0.47-6.65], p=0.20, t=0.85; $\chi^2=0.73$, p=0.39; RR=1.46, 95%CI [0.65-3.29], p=0.18, t=0.92). *Носителството на мутацията е рисков тромбогенен фактор, но тромбогенният риск при пациенти с ХМПН не е по-висок от този в КГ1.* Повечето автори също не потвърждават повишен тромбогенен риск при пациенти с ХМПН, носители на тази мутация.

4.3. Асоциация между носителството на PLA1/A2 полиморфизъм и наличието на ТС

В ПГ има 37 (26.81%) пациенти, носители на полиморфизма PLA1/A2, а в КГ1 – 15 (13.89%). От ПГ при 8 (5.80%) хетерозиготи и при 1 (0.72%) хомозигот е регистрирано ТС, а при останалите 25 (18.12%) хетерозиготи и 3 (2.17%) хомозиготи - не е. Установява се статистически значима разлика в тромботичната честота между пациенти и здрави доброволци, носители на мутацията (OR=10.33, 95%CI [0.56-189.76], **p=0.04**, t=3.45; $\chi^2=4.33$, p=**0.04**), както и покачване на тромбогенния риск (RR=8.00, 95%CI [0.49-129.37], p=0.14). При сравняване тромботичната честота между пациентите, носители и неносители на мутацията, не се потвърждава статистически значима разлика (OR=0.76, 95%CI [0.32-1.81], p=0.27, t=0.62; $\chi^2=0.38$, p=0.54) или разлика в риска (RR=0.82, 95%CI [0.43-1.56], p=0.27). Според налични литературни данни 27.9% от пациентите с ХМПН, които са носители на полиморфизма, имат преживяна тромбоза. В нашата група процентът е сходен - установяваме 37 пациенти носители, от които 9 с тромбоза - 24.32%.

Носителството на PLA1/A2 полиморфизъм е значим рисков тромбогенен фактор в контекста на доказана ХМПН, като рискът при тези пациенти е 8 пъти по-висок спрямо носителите от КГ1.

5. Носителство на генетична тромбофилия и тромбогенен риск в пациентските подгрупи спрямо вида на заболяването – резултати от изпълнение на задача 3

- 5.1. Полицитемия вера

В ПГ са включени 49 пациенти (35.51%) с диагноза ПВ. Има регистрирани 15 ТС при 14 от тях, а те представляват 35.9% от пациентите с преживяно ТС и 28.57% от всички ПВ пациенти. Според вида на събитието се разделят на: 3 МИ, 4 ИМИ, 6 ДВТ, 2 БТЕ. *Тромботичната честота при изследваните от нас лица с тази диагноза (28.57%) съответства на описаната в литературата – 28.6% (30.0-41.0%). Данните за пациентите в подгрупа ПВ са показани в табл. 6.*

Таблица 6. Честота на генетични отклонения в пациентска подгрупа ПВ и КГ1 спрямо наличието на ТС

Генетични маркери	Подгрупа ПВ (N=49 пациенти)		КГ1, N=108 доброволци, (% от 108)
	С регистрирано ТС, N=14, (% от 49)	Без регистрирано ТС, N=35, (% от 49)	
<u>Фактор V Leiden (FVL)</u>			
Хомозигот по нормален ген	14 (28.57%)	33 (67.35%)	101 (93.52%)
Хетерозигот по мутантен ген	0 (0.0%)	2 (4.08%)	7 (6.48%)
Хомозигот по мутантен ген	0 (0.0%)	0 (0%)	0 (0.0%)
<u>Мутация в протромбиновия ген (G20210A)</u>			
Хомозигот по нормален ген	14 (28.57%)	34 (69.39%)	105 (97.22%)
Хетерозигот по мутантен ген	0 (0.0%)	1 (2.04%)	3 (2.78%)
Хомозигот по мутантен ген	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<u>Мутация в гена за гликопротеин GP Пb/IIIa (PLA1/A2)</u>			
Хомозигот по нормален ген	9 (18.37%)	28 (57.14%)	93 (86.11%)
Хетерозигот по мутантен ген	4 (8.16%)	5 (10.20%)	14 (12.96%)
Хомозигот по мутантен ген	1 (2.04%)	2 (4.08%)	1 (0.93%)
<u>Общо тромбофилично носителство</u>			
Носители	5 (10.20%)	10 (20.41%)	25 (23.15%)
Неносители	9 (18.37%)	25 (51.02%)	83 (76.85%)
<u>Носителство на JAK2V617F мутация</u>			
Хомозигот по нормален ген	1 (2.04%)	12 (24.49%)	
Хетерозигот по мутантен ген	4 (8.16%)	3 (6.12%)	
Хомозигот по мутантен ген	2 (4.08%)	2 (4.08%)	
Липсват данни	7 (14.29%)	18 (36.73%)	108 (100%)

Установихме статистически значими разлики при сравняване тромботичната честота на изследваните от нас ПВ пациенти с тази при здравите доброволци от КГ1. Сред лицата с ПВ има 15 носители на генетична тромбофилия (30.61%) – от тях 5 са с реализирано ТС, а в КГ1 има 25 (23.15%) носители, при които няма регистрирано ТС. Тази сигнификантност ($OR=26.71$, 95%CI [1.35-527.52], $p=0.03$, $t=2.74$; $RR=17.88$, 95%CI [1.06-302.09], $p=0.05$) доказва значимо покачване (17 пъти) на тромбогенния риск при носителите на генетична тромбофилия с поставена диагноза ПВ. Български колектив съобщава сходни данни през 2007 год. за пациенти с ПВ/ЕТ.

Отчитайки честотата на ТС при изследваната от нас подгрупа ПВ спрямо здравите контроли от КГ1, носители на полиморфизъм PLA1/A2, установяваме статистически значима разлика ($OR=22.73$, 95%CI [1.11-467.48], $p=0.04$, $t=2.93$), а също и покачване на тромбогенния риск ($RR=13.54$, 95%CI [0.82-222.88], $p=0.07$). *Потвърждаваме значимо повишен (14 пъти) риск от развитие на тромбоза при носители на полиморфизъм PLA1/A2 с поставена диагноза ПВ.* Сходни с нашите заключения са получени от български и чуждестранни автори. Отчетеният от нас риск е по-висок спрямо регистрирания от тях и се доближава до общия тромбогенен риск при ПВ пациенти, носители на изследваните генетични тромбофилни отклонения.

Статистическа сигнификантност се доказва при сравняване честотата на ТС между пациенти с ПВ, носители и неносители на JAK2V617F мутация – регистрирани 6 ТС при 11 носители и 1 ТС при 13 неносители ($OR=14.40$, 95% CI [1.36-152.53], $p=0.01$, $t=2.22$), като значимо се покачва и рискът ($RR=7.09$, 95% CI [1.00-50.28], $p=0.03$). *Носителството на JAK2V617F мутацията асоциира със значимо покачване (7 пъти) на риска за преживяване на ТС при пациенти с ПВ.* Категорично в литературата е потвърденото и от нас становище за повишен тромбогенен риск при пациенти с ПВ, носители на JAK2V617F мутация спрямо неносителите.

5.2. Есенциална тромбоцитемия

В ПГ са включени 20 пациенти (14.49%) с диагноза ЕТ. При 6 от тях има регистрирано ТС - (15.38%) от всички пациенти с регистрирано ТС и 30.00% от всички лица с ЕТ. *Тромботичната честота в изследваната от нас подгрупа ЕТ (30.00%) е сходна с данните от литературата – 20.7% (19.00-32.00%), но по-скоро е висока.* Регистрираните събития са: 1 ИМИ, 4 ДВТ (66.67% от ТС), 1 далачен инфаркт. Данните за пациентите от подгрупа ЕТ са показани в табл. 7.

Таблица 7. Честота на генетични отклонения в пациентска подгрупа ЕТ и КГ1 спрямо наличието на ТС

Генетични маркери	Подгрупа ЕТ (N=20 пациенти)		КГ1, N=108 доброволци, (% от 108)
	С регистрирано ТС, N=6, (% от 20)	Без регистрирано ТС, N=14, (% от 20)	
<u>Фактор V Leiden (FVL)</u>			
Хомозигот по нормален ген	6 (30.00%)	14 (70.00%)	101 (93.52%)
Хетерозигот по мутантен ген	0 (0.0%)	0 (0.00%)	7 (6.48%)
Хомозигот по мутантен ген	0 (0.0%)	0 (0%)	0 (0.0%)
<u>Мутация в протромбиновия ген (G20210A)</u>			
Хомозигот по нормален ген	5 (25.00%)	14 (70.00%)	105 (97.22%)
Хетерозигот по мутантен ген	1 (5.0%)	0 (0.00%)	3 (2.78%)
Хомозигот по мутантен ген	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<u>Мутация в гена за гликопротеин GP Пb/Пa (PLA1/A2)</u>			
Хомозигот по нормален ген	5 (25.00%)	8 (40.00%)	93 (86.11%)
Хетерозигот по мутантен ген	1 (5.00%)	6 (30.00%)	14 (12.96%)
Хомозигот по мутантен ген	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (0.93%)
<u>Общо тромбофилично носителство</u>			
Носители	2 (10.00%)	6 (30.00%)	25 (23.15%)
Неносители	4 (20.00%)	8 (40.00%)	83 (76.85%)
<u>Носителство на JAK2V617F мутация</u>			
Хомозигот по нормален ген	1 (5.00%)	4 (20.00%)	
Хетерозигот по мутантен ген	2 (10.00%)	5 (25.00%)	
Хомозигот по мутантен ген	0 (0.00%)	0 (0.00%)	
Липсват данни	3 (15.00%)	5 (25.00%)	108 (100%)

При сравняване честотата на ТС между ЕТ пациенти, носители и неносители на генетична тромбофилия, тя не се доказва като рисков фактор при пациенти с ЕТ. Това се променя единствено при сравняване на тромботичната честота при ЕТ с тази на здравите доброволци от КГ1 – независимо че разликата не е статистически значима (OR=19.62; 95%CI [0.84-460.59]; p=0.06; t=1.63), рискът се покачва (RR=14.44, 95%CI [0.76-273.31], p=0.08). Това потвърждава и литературната справка, която посочва пациентите от тази подгрупа като едни от най-рисковите за ТС и именно при тях някои локални препоръки ги включват като част от диагностичния панел, но в последствие отпадат.

В подгрупа ЕТ не се отчита покачване на тромбогенния риск при носителство на G20210A, вероятно поради малкия брой на носители, като няма пациенти с FVL. По литературни данни обаче повечето автори асоциират носителството на двата фактора при ЕТ с повишаване на риска.

Въпреки доказаните от нас 7 пациенти с ЕТ, носители на PLA1/A2, при сравняване честотата на ТС с тази на носителите от здравите контроли (КГ1) не се установява статистически значима разлика (OR=7.15, 95%CI [0.26-199.69], p=0.25, t=1.08), но се покачва рискът (RR=6.00, 95%CI [0.27-131.35], p=0.26). *Затова носителството на PLA1/A2 се счита за рисков (макар и не статистически значим) фактор при поставена диагноза ЕТ в сравнение с КГ1.* Повечето данни в литературата са противоположни на установения от нас повишен риск при пациенти с ЕТ и PLA1/A2 носителство.

От направената литературни справка доказването на JAK2V617F се установява при над 30% от пациентите с ЕТ и се асоциира с повишен тромбогенен риск, като е включено в рисковия скор за оценка – IPSET (International Prognostic Score for ET). Въпреки това, в изследваната от нас пациентска подгрупа не намерихме сигнификантност при сравняване честотата на ТС между пациенти, носители и неносители на JAK2V617F мутацията – 2 събития при 7 носители и 1 събитие при 5 неносители (OR=1.6, 95%CI [0.10-24.70], p=0.37, t=0.34), поради което факторът се отчита като слабо рисков (RR=1.43, 95%CI [0.17-11.76], p=0.37). Трябва да се отчете, че резултатът е интерпретиран в условията на малка по размер пациентска подгрупа.

5.3. Миелофиброза

В ПГ са включени 39 пациенти (28.26%) с диагноза МФ. При 12 от тях има регистрирано ТС – те представляват 30.77% от всички пациенти с ТС и 30.77% от всички МФ пациенти. *Тромботичната честота в изследваната от нас подгрупа (30.77%) е по-висока от докладваната по литературни данни (около 10%) и най-висока спрямо останалите изследвани от нас подгрупи (ПВ, ЕТ и ХМЛ) (табл. 8). От тази група 13 пациенти са с вторична МФ (при 3 има докладвана тромбоза – 23.08%), а 26 – с първична (при 9 има докладвана тромбоза – 34.62%). Тромботичната честота е по-висока при пациентите с първична МФ. Регистрираните събития са: 2 МИ, 8 ИМИ, 1 спонтанен аборт, 1 ДВТ, 1 далачен инфаркт.*

При сравняване честотата на ТС между пациенти с МФ, носители на генетична тромбофилия (13 пациенти, при които има 2 регистрирани ТС), спрямо пациенти с МФ, неносители (26 пациенти, при които има регистрирани 10 ТС), разликите в честотата (OR=0.29, 95% CI [0.05-1.59], p=0.08, t=1.42) и риска (RR=0.40, 95%CI [0.10-1.57], p=0.09) не са значими.

В тази подгрупа има 13 носители на генетична тромбофилия (33.33%) – от тях 2 са с реализирано ТС. В КГ1 има 25 (23.15%) носители, при които няма регистрирано ТС. Споменатите разлики не са статистически значими (OR=11.09, 95%CI [0.49-249.88], p=0.13, t=1.54), но независимо от това, факторът „носителство“ показва риска за развитие на съдов инцидент (RR=9.29, 95%CI [0.48-180.29], p=0.14). *Носителството на генетична тромбофилия показва 9 пъти тромбогенния риск при пациентите с МФ спрямо здрави доброволци.* Литературните данни по темата не са много и обикновено включват малък брой пациенти, като рядко е обръщано отделно внимание на самото заболяване.

Таблица 8. Честота на генетични отклонения в пациентска подгрупа МФ и КГ1 спрямо наличието на ТС

Генетични маркери	Подгрупа МФ (N=39 пациенти)		КГ1, N=108 доброволци, (% от 108)
	<i>С</i> регистрирано ТС, N=12, (% от 39)	<i>Без</i> регистрирано ТС, N=27, (% от 39)	
<u>Фактор V Leiden (FVL)</u>			
Хомозигот по нормален ген	12 (30.77%)	27 (69.23%)	101 (93.52%)
Хетерозигот по мутантен ген	0 (0.00%)	0 (0.00%)	7 (6.48%)
Хомозигот по мутантен ген	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.0%)
<u>Мутация в протромбиновия ген (G20210A)</u>			
Хомозигот по нормален ген	11 (28.21%)	23 (58.97%)	105 (97.22%)
Хетерозигот по мутантен ген	1 (2.56%)	4 (10.26%)	3 (2.78%)
Хомозигот по мутантен ген	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<u>Мутация в гена за гликопротеин GP Пb/IIIa (PLA1/A2)</u>			
Хомозигот по нормален ген	11 (28.21%)	19 (48.72%)	93 (86.11%)
Хетерозигот по мутантен ген	1 (2.56%)	7 (17.95%)	14 (12.96%)
Хомозигот по мутантен ген	0 (0.00%)	1 (2.56%)	1 (0.93%)
<u>Общо тромбофилично носителство</u>			
Носители	2 (5.12%)	11 (28.21%)	25 (23.15%)
Неносители	10 (25.64%)	16 (41.03%)	83 (76.85%)
<u>Носителство на JAK2V617F мутация</u>			
Хомозигот по нормален ген	2 (5.12%)	10 (25.64%)	
Хетерозигот по мутантен ген	5 (12.82%)	4 (10.26%)	
Хомозигот по мутантен ген	4 (10.26%)	4 (10.26%)	
Липсват данни	1 (2.56%)	9 (23.08%)	108 (100%)

Не се установява статистически значима разлика в тромботичната честота между пациентите с МФ от подгрупите, носители и неносители на полиморфизъм G20210A (OR=0.52, 95%CI [0.05-5.25], p=0.29, t=0.55), както и между пациенти и доброволци от КГ1, които са носители.

Според нашето изследване не се установява статистически значима разлика в тромботичната честота между пациенти с МФ, носители и неносители на PLA1/A2 полиморфизъм (OR=0.20, 95%CI [0.02-1.87], p=0.08, t=1.41), рискът не се променя (RR=0.29, 95%CI [0.04-1.97], p=0.10). Не се установява статистически значима разлика също при сравняване честотата на носителство на PLA1/A2 между пациенти и здрави доброволци от КГ1 (OR=5.47, 95%CI [0.20-149.54], p=0.31, t=1.06), *въпреки това рискът се покачва* (RR=4.8, 95%CI [0.22-106.72], p=0.32). Липсват конкретни данни по отношение честотата и асоциацията с ТС при носителство на PLA1/A2 у пациенти с ХМПН и в частност МФ. Затова представените от нас резултати самостоятелно за подгрупа МФ представляват значим научен принос.

По литературни данни точковата JAK2V617F мутация се доказва при 25.00 до 85.70% от пациентите с МФ. Според някои автори не се доказва сигнификантна връзка между носителството на мутацията и тромбогенния риск в тази пациентска подгрупа. Според нашите резултати обаче *има статистическа сигнификантност при сравняване честотата на ТС между пациенти с МФ, носители и неносители на JAK2V617F мутация* – регистрирани са 9 събития при 17 носители (тромботична честота 52.94%) и 2 събития при 12 неносители (тромботична честота 16.67%), а разликата е значима (OR=5.63, 95%CI [0.94-33.76], **p=0.03**, t=1.89). Данните показват и значимо 3-кратно покачване на тромбогенния риск (RR=3.18; 95%CI [0.83-12.16]; **p=0.05**) при носителите с диагноза МФ. В потвърждение, литературни източници очертават като значими рискови фактори възрастта над 60 год. и наличието на JAK2V617F мутация, особено комбинацията от двата фактора, които най-често водят до съдово събитие. По наши данни двата фактора са налични при 9 от 12-те МФ пациенти с ТС – това са 75% от пациентите с ТС. Сравнявайки ги със случаите на МФ, които също покриват двата фактора, но нямат регистрирана тромбоза (7 от 27 без ТС – 27.93%), разликата е статистически значима, както и покачването на риска (OR=8.57, **p=0.004**, RR=2.89, **p=0.0002**). Така, *установяването на JAK2V617F мутацията при пациентите с МФ над 60 год. възраст статистически значимо покачва 8 пъти риска за ТС*.

5.4. Хронична миелоидна левкемия

В ПГ са включени 30 пациенти (21.74%) с диагноза ХМЛ. При 7 от тях има регистрирани 8 ТС – това са 17.95% от всички случаи с ТС и 23.33% от пациентите с диагноза ХМЛ. Събитията са: 2 МИ, 3 ИМИ, 1 спонтанен аборт, 2 ДВТ. Не се установява превес в честотата на някое от тях. *Действително, намерената от нас тромботична честота в изследваната подгрупа (23.33%) е по-висока от средната, докладвана в литературата 13.00% (1.00–36.00%), но повечето автори споменават тромбогенния риск при ХМЛ, главно в контекста на лечение с тирозинкиназни инхибитори (ТКИ). Данните са показани в табл. 9.*

От пациентите в подгрупа ХМЛ има 12 (40.00%) носители на генетична тромбофилия – от тях 4 са с реализирано ТС. В КГ1 има 25 носители, при които няма регистрирано ТС. Разликата е статистически значима (OR=27.00, 95%CI [1.31-555.02], **p=0.03**, t=2.45). *Статистически значимо се покачва и тромбогенният риск – 18 пъти при пациенти с ХМЛ, носители на генетична тромбофилия (RR=18.00, 95%CI [1.05-309.61], **p=0.05**), спрямо здравите доброволци от КГ1. Известен е тромбогенният риск при лекувани с ТКИ. В представената подгрупа ХМЛ има само 3 новодиагностицирани болни (10% от всички ХМЛ пациенти). Би могло да се предположи, че проведеното лечение със споменатите медикаменти може да е причината за ТС. При анализиране на данните се установи, че възникналите съдови инциденти при подгрупа ХМЛ са регистрирани преди започване на антилевкемичната терапия, без да е възможно да се уточни на какъв етап е била болестта в този момент.*

При сравнение на носителите на генетична тромбофилия (12 случая, при които има 4 регистрирани ТС) спрямо неносители (18 пациенти, при които има регистрирани 3 ТС) разликата не е статистически значима (OR=2.50, 95%CI [0.45-14.04], p=0.15, t=1.04), *въпреки че има статистически незначимо покачване на риска (RR=2.00, 95%CI [0.54-7.39], p=0.15).*

Таблица 9. Честота на генетични отклонения в пациентска подгрупа ХМЛ и КГ1 спрямо наличието на ТС

Генетични маркери	Подгрупа ХМЛ (N=30 пациенти)		КГ1, N=108 доброволци, (% от 108)
	С регистрирано ТС, N=7, (% от 30)	Без регистрирано ТС, N=23, (% от 30)	
<u>Фактор V Leiden (FVL)</u>			
Хомозигот по нормален ген	7 (23.33%)	21 (70.00%)	101 (93.52%)
Хетерозигот по мутантен ген	0 (0.0%)	2 (6.67%)	7 (6.48%)
Хомозигот по мутантен ген	0 (0.0%)	0 (0%)	0 (0.0%)
<u>Мутация в протромбиновия ген (G20210A)</u>			
Хомозигот по нормален ген	5 (16.67%)	23 (76.66%)	105 (97.22%)
Хетерозигот по мутантен ген	2 (6.67%)	0 (0.00%)	3 (2.78%)
Хомозигот по мутантен ген	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<u>Мутация в гена за гликопротеин GP Пb/IIIa (PLA1/A2)</u>			
Хомозигот по нормален ген	5 (16.67%)	16 (53.33%)	93 (86.11%)
Хетерозигот по мутантен ген	2 (6.67%)	7 (23.33%)	14 (12.96%)
Хомозигот по мутантен ген	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (0.93%)
<u>Общо тромбофилично носителство</u>			
Носители	4 (13.33%)	8 (26.67%)	25 (23.15%)
Неносители	3 (10.00%)	15 (50.00%)	83 (76.85%)

В заключение, нашите резултати потвърждават по-високия тромбогенен риск при носители на генетичните отклонения, но при поставена диагноза ХМЛ. Генетичната тромбофилия в контекста на това заболяване се споменава в единствено турско проучване от 2012 год. – в обща популация деца с диагноза остра лимфобластна левкемия, остра миелоидна левкемия и ХМЛ (6 пациенти). Вероятно поради малкия брой пациенти с ХМЛ не е уточнено дали сред тях има носители и дали имат преживян съдов инцидент.

Затова е и трудно да се направи съпоставка с получените от нас данни поради липса на съответни в литературата за сравнение.

Установява се статистически значима разлика в честотата на ТС между ХМЛ пациентите, носители и неносители на полиморфизъм G20210A (OR=21.36, 95% CI [0.89-511.26], **p=0.05**, t=11.35), *като значимо се покачва и тромбогенният риск за носителите* (RR=5.60, 95%CI [2.53-12.39], **p<0.0001**). Не се установява статистическа значимост при сравняване тромботичната честота между пациенти с ХМЛ и здрави доброволци от КГ1, носители на полиморфизма G20210A (OR=35, 95%CI [0.50-2435.88], p=0.10, t=не може да се изчисли), като макар и без статистическа значимост се потвърждава покачването на риска при носителите (RR=6.67, 95%CI [0.47-93.59], p=0.16). *В тази подгрупа самото носителство на G20210A се асоциира с покачване на тромбогенния риск при пациенти с ХМЛ спрямо пациентите неносители.*

Не се установява и статистически значима разлика при сравняване тромботичната честота на ХМЛ пациенти спрямо здрави доброволци от КГ1, носители на PLA1/A2 (OR=10.33, 95%CI [0.44-243.34], p=0.15, t=1.60), като макар и без статистическа значимост *се отчита покачване на риска в ПГ* (RR=8.00, 95%CI [0.43-150.09], p=0.16). От проведената литературна справка не открихме статии, които изследват носителството на FVL, G20210A и PLA1/A2 при пациенти с ХМЛ, към които да реферираме нашите резултати. Това би могло да даде нова насока в уточняване ТС при пациенти с тази диагноза, извън асоциацията с ТКИ лечение.

5.5. Обобщени данни за тромбофилично носителство в ПГ и преживяно ТС

При сравнение на честотата на съдови събития между пациентите и здравите доброволци от КГ1, носители на генетична тромбофилия, се установява статистически значима разлика (OR=17.47, 95%CI [0.99-308.56], **p=0.05**, t=4.00), *както и нарастване на риска* (RR=13.27, 95%CI [0.82-215.21], p=0.07). По отношение цялата изследвана от нас ПГ не се отчита промяна в тромбогенния риск между пациенти, носители и неносители на генетична тромбофилия, но при поставена диагноза ХМПН *рискът при пациенти спрямо здрави доброволци носители нараства 13 пъти*. Доказваме статистически значима връзка между носителството на поне един тромбофилен дефект и развитието на ТС ($\chi^2=5.16$, df=1, p=0.02, Phi=0.15) при пациентите с ХМПН. Наличните в литературата данни по темата са противоречиви, но не включват пациенти с ХМЛ.

6. Носителство на точковата мутация JAK2V617F – резултати от изпълнение на задача 4

6.1. Обща честота

В цялата ПГ изследване за JAK2V617F мутация е направено при 97 (70.29%) пациенти. От тях 23 (16.67%) са хетерозиготни и 12 (8.70%) хомозиготни носители на JAK2V617F. Общо носителите на JAK2V617F са 35 (25.36%), а 62 (44.92%) са хомозиготи по нормалния ген. За останалите 41 (29.71%) пациенти липсва информация за резултата от изследването.

6.2. Асоциация между носителството на JAK2V617F и наличието на ТС

Сред носителите на JAK2V617F има 17 (48.57%) пациенти с регистрирани ТС, а при неносителите – 7 (11.29%). Разликата в тромботичната честота между носители и неносители на мутацията е статистически значима (OR=7.42, 95%CI [2.65-20.76], **p<0.0001**, t=3.82; $\chi^2=16.526$, **p<0.0001**), като значимо се покачва и риска за ТС (RR=4.30, 95%CI [1.98-9.35], **p=0.0001**). *Носителството на JAK2V617F мутацията при пациенти с ХМПН статистически значимо покачва 4-кратно тромбогенния риск.* Получените от нас резултати са в съответствие с други проучвания, които категорично доказват повишения тромбогенен риск при пациенти с ФХ-негативни ХМПН и доказана JAK2V617F мутация, като я включват в рисковата стратификация при поставена диагноза ЕТ.

Тромботичната честота между хетеро- и хомозиготни носители не показва статистически значима разлика (OR=1.09, 95%CI [0.27-4.41], p=0.45, t=0.12; $\chi^2=0.01$, p=0.90). Повечето налични в литературата данни са противоположни.

Още през 2009 год. се загатва повишаването на риска при комбинирано носителство на JAK2V617F мутация и генетична тромбофилия, но темата за кумулативния ефект остава дискутабилна.

7. Комбинирано носителство – на генетична тромбофилия и мутация V617F в JAK2 (Janus kinase) гена

Комбинирано носителство само на генетична тромбофилия установяваме при 3 от изследваните пациенти – двама са носители на полиморфизми G20210A и PLA1/A2 (с диагнози ХМЛ и МФ), а един е носител на FVL и PLA1/A2 (диагноза ХМЛ). Само при

пациента с ХМЛ и носителство на G20210A и PLA1/A2 има регистрирано ТС. Броят пациенти е твърде малък, за да могат да се изведат категорични изводи.

Комбинирано носителство за всички изследвани в нашето проучване генетични отклонения (генетична тромбофилия и JAK2V617F мутация) се установява при 14 от пациентите – при тях са регистрирани 6 тромботични усложнения (табл. 10).

Таблица 10. Комбинирано носителство на генетична тромбофилия и JAK2V617F мутация в ПГ

Диагноза	Брой пациенти	Брой тромботични събития	Вид генетично нарушение
ПВ	6	4	<ul style="list-style-type: none"> • 5 пациенти с PLA1/A2 + JAK2V617F • 1 пациент с G20210A + JAK2V617F
ЕТ	3	1	3 пациенти с PLA1/A2 + JAK2V617F
МФ	3	0	<ul style="list-style-type: none"> • 2 пациенти с PLA1/A2 + JAK2V617F • 1 пациент с G20210A + PLA1/A2 + JAK2V617F
ХМЛ	2	1	<ul style="list-style-type: none"> • 1 пациент с PLA1/A2 + FVL • 1 пациент с PLA1/A2 + G20210A
КГ1	2	0	<ul style="list-style-type: none"> • 2 носители на PLA1/A2 + G20210A

При сравнение на тромботичната честота между пациентите с комбинирано носителство на генетични отклонения (генетична тромбофилия и JAK2V617F) спрямо тези, носители единствено на генетична тромбофилия (съответно 14 носители с 6 ТС и 34 носители с 6 ТС), се установи статистически значима разлика както в тромботичната честота (OR=3.50, 95%CI [0.88-13.88], **p=0.04**, t=1.78), така и в покачването на тромбогенния риск (RR=2.43, 95%CI [0.94-6.25], **p=0.03**, t=1.84), т.е. *при наличие на генетична тромбофилия допълнителното носителство на JAK2V617F значимо покачва риска за тромбоза при пациенти с ХМПН*. Това заключение е потвърдено и в литературата.

Сравнихме тромботичната честота при пациентите с комбинирано носителство на генетични отклонения с тази при неносителите (90 неносители с 27 ТС). Не установихме статистически значима разлика нито в тромботичната честота (OR=1.75, 95%CI [0.55-5.53], p=0.17, t=0.95), нито в тромбогенния риск (RR=1.43, 95%CI [0.72-2.83], p=0.15), но трябва да се има предвид, че в групата пациенти неносители се включват някои с JAK2V617F мутация. Затова проведохме и сравнение на честотата на тромбозите между пациенти с комбинирано носителство и пациенти, носители единствено на JAK2V617F мутация (35 носители със 17 ТС). Липсата на статистически значима разлика в тромботичната честота (OR=0.79, 95%CI [0.23-2.77], p=0.36, t=0.36) и промяна в риска (RR=0.89, 95%CI [0.44-1.77], p=0.36) потвърждава извода, че в *по-голяма степен рискът при тези пациенти се покачва от добавянето на JAK2V617F носителство към съществуващата генетичната тромбофилия*. Наличните в литературата данни по темата са противоречиви.

С най-голяма честота в нашето проучване беше комбинираното носителство на полиморфизъм на PLA1/A2 с JAK2V617F мутация – при 10 пациенти. Те представляват 71.43% от лицата - комбинирани носители, като при половината от тях има диагностицирана тромбоза (N=5). При сравняване на тази пациентска подгрупа с останалите случаи, носители на единично отклонение за генетична тромбофилия (38 носители със 7 ТС), се установява статистически значима разлика в тромботичните събития (OR=4.43, 95%CI [1.00-19.58], **p=0.02**, t=1.96). *При пациентите с ХМПН комбинираното носителство на PLA1/A2 и JAK2V617F мутация статистически значимо покачва и тромбогенния риск (RR=2.71, 95%CI [1.09-6.76], **p=0.02**) спрямо носители на единично генетично отклонение*. Подобно на изводите за общата група на носители, при групата с комбинирано носителство наличието на JAK2V617F мутация се явява допълнителен рисков тромбогенен фактор при пациенти с ХМПН и доказана генетична тромбофилия.

В подгрупата ПВ има най-висока честота на пациенти с комбинирано носителство. Разликата в тромботичната честота с останалите пациенти от другите подгрупи (ЕТ, МФ, ХМЛ), които имат комбинирано носителство, не е статистически значима (OR=6.00, 95%CI [0.58-61.84], p=0.07, t=1.51), но *тромбогенният риск при диагноза ПВ и комбинирано носителство е по-висок (RR=2.67, 95%CI [0.71-10.05], p=0.07)*, макар и без статистическа значимост. Най-вероятно липсата на сигнификантност се дължи на малката пациентска бройка в някои подгрупови анализи.

8. Влияние на показателите в ПКК върху тромбогенния риск при пациенти с ХМПН – резултати от изпълнение на задача 5

8.1. Обобщени данни за пациентите според отклоненията в стойностите на левкоцити, хемоглобин и тромбоцити

В табличен вид са обобщени данните за пациентите в зависимост от стойността на основните параметри в ПКК, разделени в 3 групи – пациенти с ниски, нормални и завишени стойности съответно на левкоцити, хемоглобин и тромбоцити (табл. 11). Референтните стойности за параметрите са дадени в прил. 5.

Таблица 11. Групиране на пациентите спрямо отклоненията в някои показатели от ПКК

Параметри от ПКК	Отклонение	Жени, N=63 (% от 63)		Мъже, N=75 (% от 75)		Общо, N=138 (% от 100)	
Левкоцити	Левкоцитоза	ХМЛ, N= 2	Общо N=23 (36.51%)	ХМЛ, N= 1	Общо N=22 (29.33%)	ХМЛ, N=3	Общо N=45 (32.61%)
		ПВ, N=8		ПВ, N=6		ПВ, N=14	
		ЕТ, N=5		ЕТ, N=5		ЕТ, N=10	
		МФ, N=8		МФ, N=10		МФ, N=18	
	Норма	Общо N=37 (58.73%)		Общо N=49 (65.33%)		Общо N=86 (62.32%)	
Левкопения	ЕТ, N=1	Общо N=3 (4.76%)	МФ, N=4	Общо N=4 (5.33%)	ЕТ, N=1	Общо N=7 (5.07%)	
	МФ, N=2				МФ, N=6		
Хемоглобин	Висок	ПВ, N=9	Общо N=16 (25.4%)	ПВ, N=22	Общо N=23 (30.67%)	ПВ, N=31	Общо N=39 (28.26%)
		ЕТ, N=4		МФ, N=1		ЕТ, N=4	
		МФ, N=3				МФ, N=4	
	Норма	Общо N=30 (47.62%)		Общо N=25 (33.33%)		Общо N=55 (39.86%)	
	Нисък	ХМЛ, N= 2	Общо N=17 (26.98%)	ХМЛ, N= 1	Общо N=27 (36.00%)	ХМЛ, N= 3	Общо N=44 (31.88%)
ПВ, N=1		ПВ, N=1		ПВ, N=2			
ЕТ, N=7		ЕТ, N=4		ЕТ, N=11			
МФ, N=7		МФ, N=21		МФ, N=28			
Тромбоцити	Тромбоцитоза	ХМЛ, N= 1	Общо N=28 (44.44%)	ХМЛ, N=1	Общо N=13 (17.33%)	ХМЛ, N=2	Общо N=41 (29.71)
		ПВ, N=7		ПВ, N=2		ПВ, N=9	
		ЕТ, N=15		ЕТ, N=3		ЕТ, N=18	
		МФ, N=5		МФ, N=7		МФ, N=12	
	Норма	Общо N=30 (47.62%)		Общо N=54 (72.00%)		Общо N=84 (60.87%)	
тромбоцитопения	МФ, N=5	Общо N=5 (7.94%)	ПВ, N=1	Общо N=8 (10.67%)	ПВ, N=1	Общо N=13 (9.42%)	
			ЕТ, N=1		ЕТ, N=1		
			МФ, N=6		МФ, N=11		

8.2. Значение на левкоцитозата за развитието на ТС

Пациентите от всяка подгрупа в зависимост от вида ХМПН са разделени на 2 кохорти – пациенти със завишен левкоцитен брой и с нисък/нормален левкоцитен брой (норма/левкопения) (табл. 12).

Таблица 12. Разпределение на пациентите с различни ХМПН в зависимост от стойността на левкоцити и наличието на ТС

	Общ брой (N)	<i>С тромбоза (N)</i>	<i>Без тромбоза (N)</i>	OR	p	RR	p
ХМЛ с левкоцитоза	3	2	1	8.80	0.05	3.60	0.01
ХМЛ с норма/левкопения	27	5	22				
ПВ с левкоцитоза	14	6	1	2.53	0.08	1.88	0.08
ПВ с норма/левкопения	35	6	1				
ЕТ с левкоцитоза	10	3	7	1	0.5	1	0.5
ЕТ с норма/левкопения	10	3	7				
МФ с левкоцитоза	18	5	13	0.77	0.35	0.83	0.35
МФ с норма/левкопения	21	5	13				

В заключение на нашия анализ, левкоцитозата е рисков тромбогенен фактор при пациенти с диагноза ХМЛ и ПВ, но сигнификантност се доказва единствено за ХМЛ. Все още левкоцитозата при пациентите с ХМПН не е утвърден рисков фактор, спрямо който се вземат терапевтични решения и нашите резултати потвърждават това. Големи проучвания обаче я определят като независим прогностичен белег за развитие на ТС, а

при ПВ предопределя повишаване честотата на артериалните събития, особено в контекста на JAK2V617F носителство.

8.3. Значение на завишената стойност на хемоглобина за развитието на ТС

Пациентите от всяка подгрупа в зависимост от вида ХМПН са разделени на 2 кохорти – пациенти със завишено и ниско/нормално ниво на хемоглобин (норма/анемия) (табл. 13).

Таблица 13. Разпределение на пациентите с различни ХМПН в зависимост от стойността на хемоглобина и наличието на ТС

	Общ брой (N)	<i>С тромбоза (N)</i>	<i>Без тромбоза (N)</i>	OR	p	RR	p
ХМЛ със завишен хемоглобин	0	0	0	3.13	0.58	2.07	0.49
ХМЛ с норма/анемия	30	7	23				
ПВ със завишен хемоглобин	31	7	24	0.46	0.11	0.58	0.11
ПВ с норма/анемия	18	7	11				
ЕТ със завишен хемоглобин	4	2	2	3	0.17	2	0.15
ЕТ с норма/анемия	16	4	12				
МФ със завишен хемоглобин	4	1	3	0.73	0.4	0.80	0.4
МФ с норма/анемия	35	11	24				

Не се установяват статистически значими различия между пациенти със завишена стойност на хемоглобин спрямо пациенти с нормална/занижена стойност в зависимост от преживените ТС в различните нозологични подгрупи. Въпреки очаквания и логически обоснован завишен тромбогенен риск при повишен вискозитет, не всички налични литературни съобщения го потвърждават, както и настоящите наши данни.

8.4. Значение на завишената стойност на тромбоцитния брой за развитието на ТС

Пациентите от всяка подгрупа в зависимост от вида ХМПН са разделени на 2 кохорти – пациенти със завишен тромбоцитен брой и с нисък/нормален тромбоцитен брой (норма/тромбоцитопения) (табл. 14).

Таблица 14. Разпределение на пациентите с различни ХМПН в зависимост от стойността на тромбоцити и наличието на ТС

	Общ брой (N)	<i>С тромбоза (N)</i>	<i>Без тромбоза (N)</i>	OR	p	RR	p
ХМЛ с тромбоцитоза	2	2	0	21.36	0.05	5.60	<0.0001
ХМЛ с норма/тромбоцитопения	28	5	23				
ПВ с тромбоцитоза	9	2	7	0.67	0.32	0.74	0.33
ПВ с норма/тромбоцитопения	40	12	28				
ЕТ с тромбоцитоза	18	5	13	0.38	0.26	0.56	0.23
ЕТ с норма/тромбоцитопения	2	1	1				
МФ с тромбоцитоза	12	3	9	0.67	0.30	0.75	0.31
МФ с норма/тромбоцитопения	27	9	18				

В изследваната от нас ПГ тромбоцитозата се установява като рисков фактор при тези с диагноза ХМЛ, като тя е фактор значимо покачващ тромбогенния риск

($p=0.05$). Това е в съответствие с наличните в литературата данни за значима връзка между високия тромбоцитен брой (над $1000/1500 \times 10^9 /l$) и хеморагични, но не и тромботични усложнения.

9. Експресия на CD11b/CD18 по повърхността на неутрофилите – резултати от изпълнение на задача 6

За експресия на повърхностните маркери CD11b/CD18 върху неутрофилите са изследвани 113 пациенти от ПГ. От тях 32 са с регистрирано ТС и 81 без такова. КГ2 се състои от 46 здрави доброволци, при които няма отчетени ТС.

9.1. Експресия на CD11b/CD18 по повърхността на неутрофилите в пациентската група и КГ2

В табл. 15 е посочен средния брой неутрофили при пациентите, които експресират на повърхността си CD11b/CD18. Данните са за пациентските подгрупи според вида на диагнозата и КГ2.

Таблица 15. Експресия на CD11b/CD18 по повърхността на неутрофилите на пациенти (включително подгрупи спрямо диагнозата) и здрави доброволци от КГ2 – средна аритметична стойност (Mean), стандартно отклонение (SD), минимална/максимална стойност (Min/max), медиана (Median), интерквартилен размах (IQR).

Диагноза	Брой (N)	Mean	SD	Min/max	Median	IQR
<i>ХМЛ</i>	28	6555.50	± 1161.73	4202/8310	6847	1847
<i>ПВ</i>	35	7180.91	± 1428.63	3310/8900	7610	1988
<i>ЕТ</i>	15	6921.93	± 2241.64	734/9000	7726	1913
<i>МФ</i>	35	6846.57	± 1749.71	2532/9310	7168	2796
<i>КГ2</i>	46	1437.46	± 2421.71	88/8286	306	912

Не се установява статистически значимо различие между пациентските подгрупи в зависимост от диагнозата (ХМЛ, ПВ, ЕТ и МФ) по отношение средните аритметични стойности на броя неутрофилни клетки, които експресират CD11b/CD18 ($H=6.06$, $df=3$, $N=113$, $p=0.11$), но прави впечатление, че с най-ниска стойност са при пациентите от подгрупа ХМЛ, а с най-висока – от подгрупа ПВ.

За сравнение на ПГ (включително и всяка пациентска подгрупа според диагнозата) с КГ2 са приложени Independent-Samples Kruskal-Wallis H Test и Mann-Whitney U Test (табл. 16).

Таблица 16. Статистическа значимост на разликите между ПГ (включително подгрупи спрямо диагноза) и КГ2 според двата използвани теста

	Mean rank score	Статистическа значимост спрямо КГ2	Z score	U value	Статистическа значимост спрямо КГ2
<i>ХМЛ</i> (N=28)	68.54	P<0.001	5.86	118	P<0.0001
<i>ПВ</i> (N=35)	107.11	P<0.001	6.75	97	P<0.0001
<i>ЕТ</i> (N=15)	106.13	P<0.001	4.92	51	P<0.0001
<i>МФ</i> (N=35)	99.83	P<0.001	6.7	115	P<0.0001
<i>ПГ</i> (N=113)	99.63	P<0.001	8.42	381	P<0.0001
<i>КГ2</i> (N=46)	31.78			4817	

Сигнификантността на получените резултати се потвърждава и от Post-hoc Dunn's test (Bonferroni corrected alpha of 0.005). В ПГ статистически значимо по-голям брой неутрофили експресират CD11b/CD18 по повърхността си в сравнение със здравите доброволци от КГ2 (**p<0.0001**), включително и при сравнение на всяка една подгрупа с КГ2. Това доказва *свръхактивност на неутрофилите при пациенти с четирите вида ХМПН*. Все повече проучвания в изследваната от нас литература се фокусират върху активността на кръвните клетки при ХМПН, но почти всички отделят ХМЛ поради различната патогенеза и присъствие на ФХ. Въпреки това не установихме статии, които комплексно да изследват тромбогенезата при всички ХМПН в аспекта на клетъчна свръхактивност. Вероятно значение има и моментът, в който се оценяват тези маркери – подходящо би било проследяване в динамика.

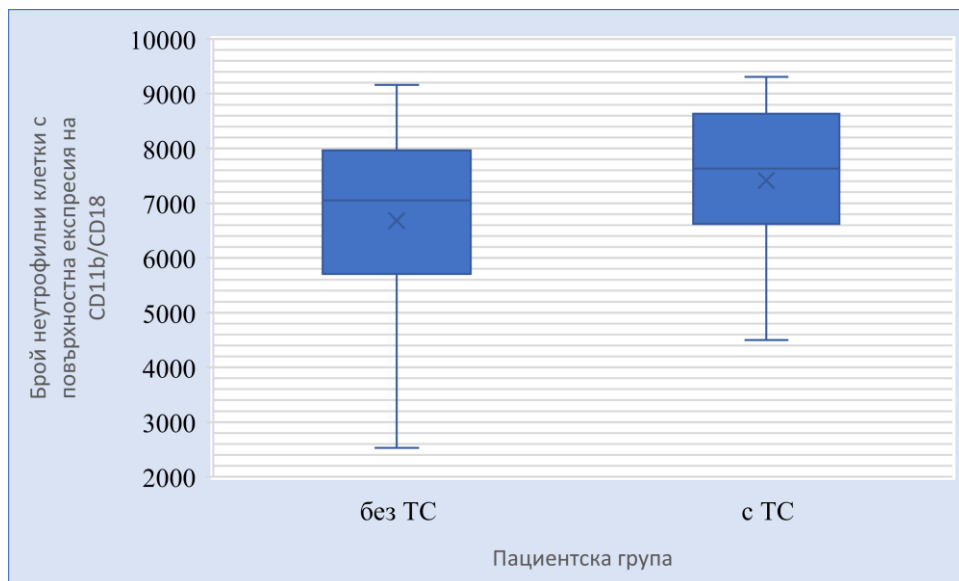
9.2. Експресия на CD11b/CD18 по повърхността на неутрофилите и връзка с регистрирано ТС

Данните за пациентската група (включително подгрупи спрямо поставена диагноза) в зависимост от наличието на преживяно ТС са представени на табл. 17.

Таблица 17. Средна аритметична стойност, стандартно отклонение и статистическа значимост на разликите в неутрофилната експресия на CD11b/CD18 между пациенти с ТС и без такова – общо за пациентската група и по подгрупи спрямо поставената диагноза

ПГ	Пациентска група N=113 (100%)			
	С регистрирано ТС, N=32 (28.32% от 113)		Без регистрирано ТС, N=81 (71.68% от 113)	
	Mean±SD	Общ брой N (% от 113)	Mean±SD	Общ брой N (% от 113)
Общо за изследваната група (N=113)	7412.81±1320.30	32 (100%)	6680.68±1658.74	81 (100%)
P=0.008, t=2.46				
ХМЛ (N=28)	6590.80±1210.01	5 (5.63%)	6547.83±1178.89	23 (28.40%)
P=0.47, t=0.07				
ПВ (N=35)	7846.979	10 (31.24%)	6914.88±1507.96	25 (30.86%)
P=0.02, t=2.15				
ЕТ (N=15)	8110.80±825.66	5 (15.63%)	6327.50±2517.09	10 (12.34%)
P=0.03, t=2.03				
МФ (N=35)	7103.50±1595.18	12 (37.50%)	6712.52±1845.07	23 (28.40%)
P=0.26, t=0.65				

Статистически значимо повече неутрофили експресират CD11b/CD18 на повърхността си при пациенти, които са преживяли ТС, в сравнение с пациенти, без регистрирано ТС (**p=0.008**) (фиг. 5), което е в съответствие с наличните до момента данни в литературни източници. Статистически значимите разлики се запазват в подгрупи ПВ и ЕТ. При валидиране в по-големи пациентски кохорти посочените стойности биха могли да се използват като предиктивни за ТС, особено при възможност за динамичното им проследяване. Получените от нас резултати могат да спомогнат за дефиниране на липсващия „неутрофилен праг“, критичен за преживяване на ТС при пациенти с ХМПН – изобщо завишени или над определено ниво.



Фигура 5. Сравнение в неутрофилната експресия на CD11b/CD18 между пациенти с регистрирано ТС и без такава.

9.3. Сравнение на повърхностната CD11b/CD18 неутрофилна експресия между пациентката група и КГ2

Установи се статистически значимо различие в броя на неутрофилите, които експресират на повърхността си CD11b/CD18, между ПГ и КГ2 ($U=381.000$, $N=159$, $z=-8.425$, $p<0.0001$, $t=14.07$). Използван е Mann-Whitney U Test. Нашите данни са потвърдени и от статии, проучващи неутрофилната активност при пациенти с ПВ и ЕТ, но няма налични за цялата ХМПН група.

9.4. Логистична регресия

За да се изследва ефектът на броя неутрофилни клетки, експресиращи на повърхността си CD11b/CD18, върху ТС е проведена логистична регресия. Бинарната логистична регресия е конструирана с цел да се оцени дали независимата променлива „брой неутрофили, експресиращи CD11b/CD18 по повърхността си“ статистически значимо прогнозира вероятността за възникване на ТС. Регресионният модел е статистически значим ($\chi^2=22.58$, $df=1$, $p<0.001$). Моделът обяснява между 13.20% (Cox & Snell) и 21.10% (Nagelkerke R^2) от дисперсията в ТС и коректно класифицира 80.50% от наблюденията. Критерият на Валд показва, че независимата променлива „брой неутрофили, експресиращи CD11b/CD18 по повърхността си“ ($Wald=50.18$, $df=1$, $p<0.0001$) влияе съществено на вероятността за поява на ТС. Стойността на регресионния коефициент е 0.045, а стойността на регресионната константа е -4.316. Експонентата на регресионния коефициент $\text{Exp}(B)$ показва, че процентното увеличение

в броя неутрофили, експресиращи CD11b/CD18 по повърхността си, с 1 води до увеличаване на шанса лицето са преживее тромботично събитие с 1.046. Именно изследвайки CD11b някои автори отчитат степента на „лепливост“ на неутрофилите към тромбоцитите за формиране на левкоцитно-тромбоцитни агрегати.

9.5. Повърхностната CD11b/CD18 неутрофилна експресия при пациенти с ХМПН и левкоцитоза

От изследваната пациентска група за CD11b/CD18 при 35 се установи левкоцитоза със среден брой неутрофилни клетки, експресиращи маркерите, 7549.14 ± 1559.37 . От тях с регистрирано ТС са 13, със средна стойност 8157.08 ± 1240.16 , а без ТС – 22, със средна стойност 7189.91 ± 1641.36 (табл. 18). Разликата е статистически значима ($p=0.03$), т.е. пациентите с левкоцитоза, при които има преживяна тромбоза, имат значимо по-голям неутрофилен брой с експресия спрямо пациентите с левкоцитоза, но без тромбоза.

При липса на левкоцитоза ТС не изглежда да е свързано с неутрофилна CD11b/CD18 експресия.

Таблица 18. Брой неутрофили, експресиращи по повърхността си CD11b/CD18, при пациенти с отклонения в левкоцитния брой в зависимост от наличието на ТС

Пациентска подгрупа спрямо левкоцитния брой (N=113)	Експресия на CD11b/CD18 върху неутрофили – Mean		
	С регистрирано ТС (N=32)	Без регистрирано ТС (N=81)	Средна стойност за групата
Пациенти с левкоцитоза	8157.08 ± 1240.16 (N=13)	7189.91 ± 1641.36 (N=22)	7549.14 ± 1559.37 (N=35)
Пациенти с норма/понижени левкоцити	6903.58 ± 1141.51 (N=19)	6490.80 ± 1638.47 (N=59)	6591.35 ± 1535.76 (N=78)

Разделяйки изследваните пациенти с регистрирано ТС на такива с левкоцитоза (общо 13 при средна неутрофилна експресия 8157.08 ± 1240.16) и останалите - с левкоцитен брой норма/занижен (общо 19 със средна експресия 6903.58 ± 1141.51), разликата в средния брой неутрофили, които експресират CD11b/CD18, е статистически значима ($p=0.001$).

Сигнификантна е и разликата при сравняване средния брой неутрофили, които експресират изследваните маркери, между пациенти с левкоцитоза (N=35) и такива с

левкоцити в норма/занижени (N=78), а именно 7549.14 ± 1559.37 спрямо 6591.35 ± 1535.76 ($p=0.002$).

В заключение на получените от нас резултати, левкоцитозата е значим параметър за развитие на ТС, а конкретна стойност на CD11b/CD18 неутрофилна експресия би могла да се валидира като предиктивна за възникване на тромбоза. Повечето проучвания са в подкрепа на нашите данни, а някои дори отдават по-голямо значение на повишените бели кръвни клетки спрямо тромбоцитозата. Въпреки това продължава да има неяснота по отношение конкретните стойности на левкоцитозата, макар в единични случаи да се споменават и сравнително ниски такива. Съществуват и противоположни становища, може би именно във връзка с неуточнения праг.

9.6. Повърхностната CD11b/CD18 неутрофилна експресия при пациенти с ХМПН и тромбоцитоза

В изследваната за CD11b/CD18 пациентска група има 34 случая с тромбоцитоза и среден брой клетки, експресиращи маркерите (Mean), 7125.12 ± 1899.99 . От тях с регистрирано ТС са 10 - със средна стойност 7574.40 ± 1228.60 , а без ТС са 24 – със средна стойност 6937.92 ± 2112.94 (табл. 19). Разликата не е статистически значима ($p=0.14$). Значима е разликата при сравняване експресията между пациенти с и без ТС, които са с тромбоцити в норма/понижени ($p=0.01$). В случая завишеният тромбоцитен брой не се доказва като значим фактор.

Таблица 19. Брой неутрофили, експресиращи по повърхността си CD11b/CD18, при пациенти с отклонения в тромбоцитния брой в зависимост от наличието на ТС

Пациентска подгрупа спрямо тромбоцитния брой (N=113)	Експресия на CD11b/CD18 върху неутрофили – Mean (брой на 10 000 клетки)		
	С регистрирано ТС (N=32)	Без регистрирано ТС (N=81)	Средна стойност за групата
Пациенти с тромбоцитоза	7574.40 ± 1228.60 (N=10)	6937.92 ± 2112.94 (N=24)	7125.12 ± 1899.99 (N=34)
Пациенти с норма/понижени тромбоцити	7339.36 ± 1381.41 (N=22)	6572.37 ± 1434.11 (N=57)	6785.96 ± 1452.61 (N=79)

В заключение на проведените от нас изследвания *не се установи асоциация между тромбоцитния брой (включително завишения), свръхактивността на неутрофилите и наличието на ТС*. Това е в съответствие с установените и от други изследователи резултати, но при нас се потвърждава за цялата група ХМПН.

9.7. Повърхностната CD11b/CD18 неутрофилна експресия при пациенти с ХМПН и генетични отклонения

Данните за среден брой неутрофили, експресиращи CD11b/CD18, в изследваната пациентска група и налични генетични отклонения спрямо проява на ТС са представени в табл. 20.

Таблица 20. Стойности на неутрофили, експресиращи CD11b/CD18 по повърхността си според генетичното отклонение.

Генетично отклонение / подгрупи	Неутрофили с експресия на CD11b/CD18 (Mean)	С регистрирано ТС		Без регистрирано ТС		Статистическа разлика между пациент и с и без регистрирано ТС
		Брой	Неутрофили с експресия на CD11b/CD18 (Mean)	Брой	Неутрофили с експресия на CD11b/CD18 (Mean)	
<i>FVL</i>	7347±26.87	0	0	2	7347±26.87	-
<i>G20210A</i> носители	6029.33±2109.17	3	6647.33±2066.14	6	5720.33±2250.88	P=0.3
<i>G20210A</i> неносители	6962.32±1538.03	29	7492±1247.30	75	6757.51±1597.32	P=0.007
<i>PLA1/A2</i> носители	6953.87±1422.56	7	7368±1260.55	23	6827.83±1470.73	P=0.17
<i>PLA1/A2</i> неносители	6864.20±1655.96	25	7425.36±1361.48	58	6622.33±1736.26	P=0.01
<i>JAK2V617F</i> носители	7304.97±1503.34	15	7684.53±1364.68	16	6949.13±1582	P=0.08
<i>JAK2V617F</i> неносители	6676.36±1558.13	9	6886.67±1507.24	47	6636.09±1580.31	P=0.33

Статистически значими разлики в броя неутрофили, експресиращи CD11b/CD18, се отчитат при сравнение на пациенти с и без регистрирано ТС в две подгрупи – носители на G20210A ($p=0.007$) и носители на PLA1/A2 ($p=0.01$). Не се отчита значима асоциация, сравнявайки носителите с или без ТС на FVL, G20210A, PLA1/A2 и JAK2V617F мутация.

Статистически значими резултати се получават, ако се сравни неутрофилният брой с експресия на CD11b/CD18 при случаи на МФ с ТС, които имат JAK2V617F мутация, с тези, които нямат мутация – 7380.22 ± 1658.03 спрямо 5582 ± 328.10 – $p=0.01$, $t=2.98$. Тази сигнификантност се установява само в подгрупата МФ и потвърждава значимостта от носителство на мутацията при тези пациенти.

В обобщение на получените от нас резултати, *при пациентите с ХМПН не се установиха данни носителството на изследваните генетични отклонения да има отношение към броя неутрофилни клетки, които експресират CD11b/CD18, както и да променя тромбогенния риск*. Повечето налични публикации са с противоположни на нашите изводи и асоциират JAK2V617F мутиралите клетки със състояние на свръхсъсирваемост. Нашите данни доказват това становище само за пациенти с МФ.

От направената литературна справка не намерихме налични статии, които да изследват левкоцитната активност чрез неутрофилна експресия на CD11b/CD18 при пациенти с ХМПН, носители на генетична тромбофилия.

10. Коморбидност и тромбогенен риск при пациенти с ХМПН – резултати от изпълнение на задача 7

10.1. Общи данни за ПГ

За ПГ е събрана информацията относно коморбидни/рискови фактори, които могат да окажат влияние върху тромботичната склонност. Пациентите са разделени в 6 групи в зависимост от броя фактори, които имат (без коморбидни/рискови фактори, с 1 фактор, с 2 фактора, с 3 фактора, с 4 фактора, с 5 фактора), и в 2 подгрупи в зависимост от наличието на ТС – с и без регистрирано такова. Данните са отразени в табл. 21.

Прави впечатление значимото покачване на броя пациенти (и процентното им отношение) в групата с 2 коморбидни/рискови фактори, които имат регистрирано ТС. Сравнявайки тромботичната честота между групите пациенти без коморбиден/рисков фактор и с 1 фактор спрямо групите пациенти с 2 и повече фактора, се отчита статистически значима разлика ($OR=0.28$, $95\%CI [0.13-0.61]$, $p=0.0007$), доказва се и че

наличието на по-малко фактори намалява риска за тромбоза (RR=0.41; 95%CI [0.23-0.71]; p=0.0008).

Таблица 21. Разпределение на пациентите спрямо броя коморбидни/рискови фактори и регистрирано ТС.

	<i>С регистрирано ТС (N=39)</i>	Общ брой (% от пациентската подгрупа)	<i>Без регистрирано ТС (N=99)</i>	Общ брой (% от пациентската подгрупа)
Пациенти без коморбидни/рискови фактори (N=32)	<ul style="list-style-type: none"> • 2 ХМЛ • 3 ПВ • 1 МФ 	6 (18.75%)	<ul style="list-style-type: none"> • 12 ХМЛ • 6 ПВ • 4 ЕТ • 4 МФ 	26 (81.25%)
Пациенти с 1 фактор (N=48)	<ul style="list-style-type: none"> • 2 ХМЛ • 2 ПВ • 1 ЕТ • 3 МФ 	8 (16.67%)	<ul style="list-style-type: none"> • 9 ХМЛ • 14 ПВ • 4 ЕТ • 13 МФ 	40 (83.33%)
Пациенти с 2 фактора (N=38)	<ul style="list-style-type: none"> • 1 ХМЛ • 4 ПВ • 4 ЕТ • 5 МФ 	14 (36.84%)	<ul style="list-style-type: none"> • 2 ХМЛ • 10 ПВ • 6 ЕТ • 6 МФ 	24 (63.16%)
Пациенти с 3 фактора (N=15)	<ul style="list-style-type: none"> • 2 ХМЛ • 4 ПВ • 1 ЕТ • 1 МФ 	8 (53.33%)	<ul style="list-style-type: none"> • 4 ПВ • 3 МФ 	7 (46.66%)
Пациенти с 4 фактора (N=4)	<ul style="list-style-type: none"> • 1 ПВ • 1 МФ 	2 (50.00%)	<ul style="list-style-type: none"> • 1 ПВ • 1 МФ 	2 (50.00%)
Пациенти с 5 фактора (N=1)	<ul style="list-style-type: none"> • 1 МФ 	1 (100.00%)	-	0 (0.00%)

Наличието на ≤ 1 коморбиден фактор при пациенти с ХМПН е с по-нисък риск за развитие на тромбоза спрямо ≥ 2 фактора. Прави впечатление статистически значимо по-високата честота на ИБС, АХ и СН при пациенти с преживяно ТС (табл. 22). Повечето налични в литературата проучвания не отчитат разликата в тромботичната честота между пациентите с ХМПН и различни придружаващи коморбидни/рискови фактори, а по-скоро регистрират повишената им честота с препоръка да се проследяват. Техните данни не включват цялата пациентска група, а основно ФХ-негативните заболявания. Установените от нас честоти на АХ, затлъстяване, ЗД и хиперхолестеролемия са по-високи от докладваните, макар някои от тях да не достигат сигнификантност за повишаване на тромбогенния риск.

Таблица 22. Значение на ИБС, АХ и СН като най-чести коморбидни/рискови фактори при пациенти с ХМПН и регистрирано ТС

Коморбиден/ рисков фактор	Наличие/ липса на фактор (да/не)	ТС			OR	p	RR	p
		С регистри- рано ТС, N=39 (% от 39)	Без регистри- рано ТС, N=99 (% от 99)	Общ брой, N=138 (% от 138)				
ИБС	Да	12 (30.77%)	6 (6.06%)	18 (13.04%)	6.89	0.0002	2.96	0.000002
	Не	27 (69.23%)	93 (93.94%)	120 (86.96%)				
АХ	Да	28 (71.79%)	50 (50.51%)	78 (56.52%)	2.49	0.01	1.96	0.002
	Не	11 (28.21%)	49 (49.49%)	60 (43.48%)				
СН	Да	6 (15.38%)	5 (5.05%)	11 (7.97%)	3.42	0.03	2.10	0.009
	Не	33 (84.62%)	94 (94.95%)	127 (92.03%)				

10.2. Коморбидност по подгрупов анализ спрямо заболяването

- ХМЛ

При сравнение честотата на ТС между пациенти с ≤ 1 коморбиден/рисков фактор и > 1 разликата е статистически значима (OR=0.12, 95%CI [0.02-1.02], **p=0.03**), *наличието на > 1 фактор покачва тромбегния риск при пациенти с ХМЛ (RR=0.27; 95%CI [0.09-0.84]; p=0.01).*

Поради факта, че повечето ТС възникват рано в живота на пациентите с ХМЛ, е уместно допълнително внимание върху потенциални коморбидни/рискови фактори. Нашите данни също потвърждават, че при пациентите с това заболяване тромбозите са възникнали преди приема на ТКИ.

Пациентите с ТС са 7 от общо 30. *Сигнификантност като рисков тромбогенен фактор се доказва за тютюнопушенето (p=0.05; RR=6.57).* Категорично доказана е връзката между тютюнопушенето и рискът от ТС, което е потвърдено и от нашите данни, и е важна препоръка към ежедневния режим на пациентите с ХМЛ.

- ПВ

При сравнение честотата на ТС между пациенти с ≤ 1 коморбиден/рисков фактор и > 1 разликата за тази подгрупа не е статистически значима (OR=0.42, 95%CI [0.12-1.50], p=0.09), рискът е несигнификантен (RR=0.53, 95%CI [0.21-1.36], p=0.09). Разликата е значима (OR=0.30, 95%CI [0.07-1.27], **p=0.05**), ако се сравнят групите на пациенти с ≤ 2 спрямо тези > 2 фактора (RR=0.46, 95%CI [0.20-1.07], **p=0.04**). *Необходим е по-голям брой коморбидни/рискови фактори, за да се повиши тромбегния риск при пациентите с ПВ.* По литературни данни над 70% от пациентите с ПВ имат придружаващи коморбидни/рискови фактори – при нас 81.63%.

В изследваната от нас подгрупа с ПВ не се установява статистически значимо покачване на тромбегния риск при пациенти, с някой от придружаващите коморбидни/рискови фактори. Противоположно на нашите резултати, повечето изследователи съобщават за значима честота и повишен риск при пациенти с АХ, ЗД, дислипидемия, пушачи.

- ЕТ

При сравнение честотата на ТС между пациенти с ≤ 1 коморбиден/риск фактор и >1 разликата за тази подгрупа не е статистически значима (OR=0.15, 95%CI [0.01-1.64], $p=0.06$), наличието на ≤ 1 фактор не е значимо за покачване на тромбогенния риск при пациенти с ЕТ (RR=0.24, 95%CI [0.04-1.73], $p=0.08$). Необходим е по-голям брой пациенти, за да се направят сигнификантни заключения.

Не се установява статистически значимо покачване на тромбогенния риск при пациенти, с някой от придружаващите коморбидни/рискови фактори. Обратно на нашите резултати, повечето изследователи съобщават за значима честота и повишен риск при пациенти с АХ, ЗД, дислипидемия и пушачи.

- МФ

При сравнение честотата на ТС между пациенти с ≤ 1 коморбиден/риск фактор и >1 разликата е статистически значима (OR=0.29, 95%CI [0.07-1.232], $p=0.05$), а наличието на >1 фактор покачва риска от съдово събитие при пациенти с МФ (RR=0.43, 95%CI [0.15-1.19], $p=0.05$). Поне 1 фактор имат 87.18% от пациентите в подгрупата.

В изследваната от нас подгрупа МФ се установява статистически значимо покачване на тромбогенния риск при пациенти с АХ, особено ИБС. Сходно с нашите резултати, са съобщени като рискови тромботични фактори АХ, дислипидемия, захарен диабет и тютюнопушене.

11. Комплексната тромбо-етиопатогенеза при ХМПН

Обобщавайки всички налични данни до момента, потвърждаваме комплексната многофакторна етиопатогенеза на тромботичните усложнения при пациенти с ХМПН.

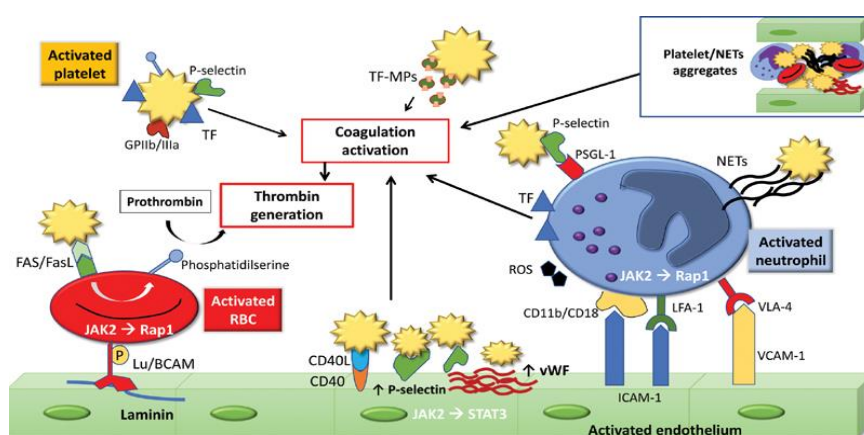
От всички 138 изследвани пациенти с ХМПН при **39 (28.26%) има регистрирано ТС**, при 99 (71.74%) такова не се установи. От пациентите с регистрирано ТС, които са общо 39, 12 (30.77%) имат доказана генетична тромбофилия, която е потенциална причина за реализация на ТС, но е в контекста на допълнителни рискови фактори. Дори и при носителство на доказан рисков тромбогенен фактор (например някои видове генетична тромбофилия) пациентите с реализирано съдово събитие всъщност имат

налични повече от един фактор, като комбинацията от тях вероятно е причината за възникване на тромботично усложнение.

Останалите 27 от 39 пациенти с ТС (69.23%) са без доказана генетична тромбофилия, но 12 (30.77%) са с носителство на JAK2V617F мутация, която също е рисков фактор за ТС. В тази подгрупа прави впечатление по-скоро водещото носителство на JAK2V617F като вероятна, а при някои дори единствена причина за ТС. Но въпреки това, има пациенти, при които се комбинират различни рискови фактори.

За 15 от 39 пациенти с ТС (33.33%) се регистрира различен брой коморбидни/рискови фактори. В тази подгрупа правят впечатление пациенти, които според проведените от нас изследвания са без установена причина за развитото се ТС. Но в изследванията не са включени допълнителни данни като нива на прокоагулантни протеини и фактори, възпалителни цитокини, коагулационен статус, естествени фибринолитичи, ендотелна активност, микрочастици, тромбоцитни рецептори и други. Това отново потвърждава многофакторната тромбоза при пациентите с ХМПН, необходимостта от комплексни подходи в оценката на тромбогенния риск при тях, както може би разработването на подробни, мултикомпонентни скали за оценка на този риск, съобразно различни критерии и тяхната тежест. За валидирането им е необходимо обобщаване данните на голям брой пациенти.

В подкрепа на нашето заключение е представената като фиг. 6 патогенеза на тромбозата при пациенти с ХМПН, наскоро предложена от Falanga и сътр.



Фигура 6. Патогенеза на тромбозата при пациенти с ХМПН

(License Number 5724270659565, License date – Feb 08, 2024, Publisher – Georg Thieme Verlag KG, Publication – Hämostaseologie, Title - Prevention and Management of Thrombosis in BCR/ABL-Negative Myeloproliferative Neoplasms, Author - Anna Falanga, Marina Marchetti, Francesca Schieppati, Date – Feb 15, 2021, vol. 41, Issue 01)

12. Рискови фактори при пациентите и възможното им проследяване в практиката

Според проведеното от нас изследване можем да обобщим различни фактори, които имат отношение към тромбогенния риск общо при пациентите от ПГ и по подгрупи, спрямо основното заболяване.

Рискови фактори общо за групата пациенти с ХМПН (ФХ-негативни и ХМЛ):

- носителство на тромбофилен дефект – покачва тромбогенния риск 13 пъти спрямо здрави контроли;
- носителство на PLA1/A2 – среща се по-често при пациенти и покачва тромбогенния риск 8 пъти спрямо здрави контроли;
- носителство на G20210A и FVL – покачват слабо тромбогенния риск;
- носителство на JAK2V617F мутация - покачва тромбогенния риск 4.3 пъти спрямо неносители;
- комбинирано носителство на изследваните генетични дефекти - покачва тромбогенния риск 2 пъти спрямо носителството на изолиран тромбофилен дефект и 2 пъти спрямо здрави контроли;
- неутрофилна експресия на CD11b/CD18 - сигнификантно по-висока спрямо КГ2 (**p<0.0001**);
- неутрофилна експресия на CD11b/CD18 при пациенти с ТС - сигнификантно по-висока спрямо пациенти без ТС (**p=0.008**), включително при пациенти с левкоцитоза и такива с нормални или ниски тромбоцити;
- нарастването на неутрофилната експресия на CD11b/CD18 при пациентите с 1% покачва шанса да възникне ТС с 1.046;
- наличието на поне 2 коморбидни/рискови фактора значимо променя тромбогенния риск спрямо пациенти с ≤ 1 фактор (**p=0.02**);
- придружаващи заболявания като АХ, ИБС и СН покачват тромбогенния риск съответно 2, 3 и 2 пъти.

Рискови фактори за пациенти с ХМЛ:

- левкоцитоза и тромбоцитоза – покачват тромбогенния риск съответно 4 и 11 пъти;
- носителство на генетична тромбофилия – покачва риска 18 пъти спрямо здрави контроли и 2 пъти спрямо ХМЛ пациенти неносители;

- носителство на G20210A – покачва риска 7 пъти спрямо здрави носители и 5.6 пъти спрямо неносители;
- носителство на PLA1/A2 – покачва риска 8 пъти спрямо здрави контроли;
- тютюнопушене – покачва риска 6.57 пъти;
- наличие на 2 и повече коморбидни/рискови фактора – покачва риска сигнификантно (**p=0.01**).

Рискови фактори за пациенти с ПВ:

- левкоцитоза – покачва риска 2 пъти;
- носителство на генетична тромбофилия – покачва риска 18 пъти спрямо здрави контроли;
- носителство на PLA1/A2 – покачва риска 14 пъти спрямо здрави контроли и 2 пъти спрямо неносители;
- носителство на JAK2V617F мутация – покачва риска 7 пъти спрямо ПВ пациенти неносители;
- комбинирано носителство – покачва риска 2.67 пъти спрямо комбинираното носителство в другите пациентски подгрупи;
- неутрофилна експресия на CD11b/CD18 при пациенти с ТС - значимо по-висока спрямо ПВ пациенти без ТС (**p=0.02**);
- наличие на поне 3 коморбидни/рискови фактора – покачва значимо риска (**p=0.05**).

Рискови фактори за пациенти с ЕТ:

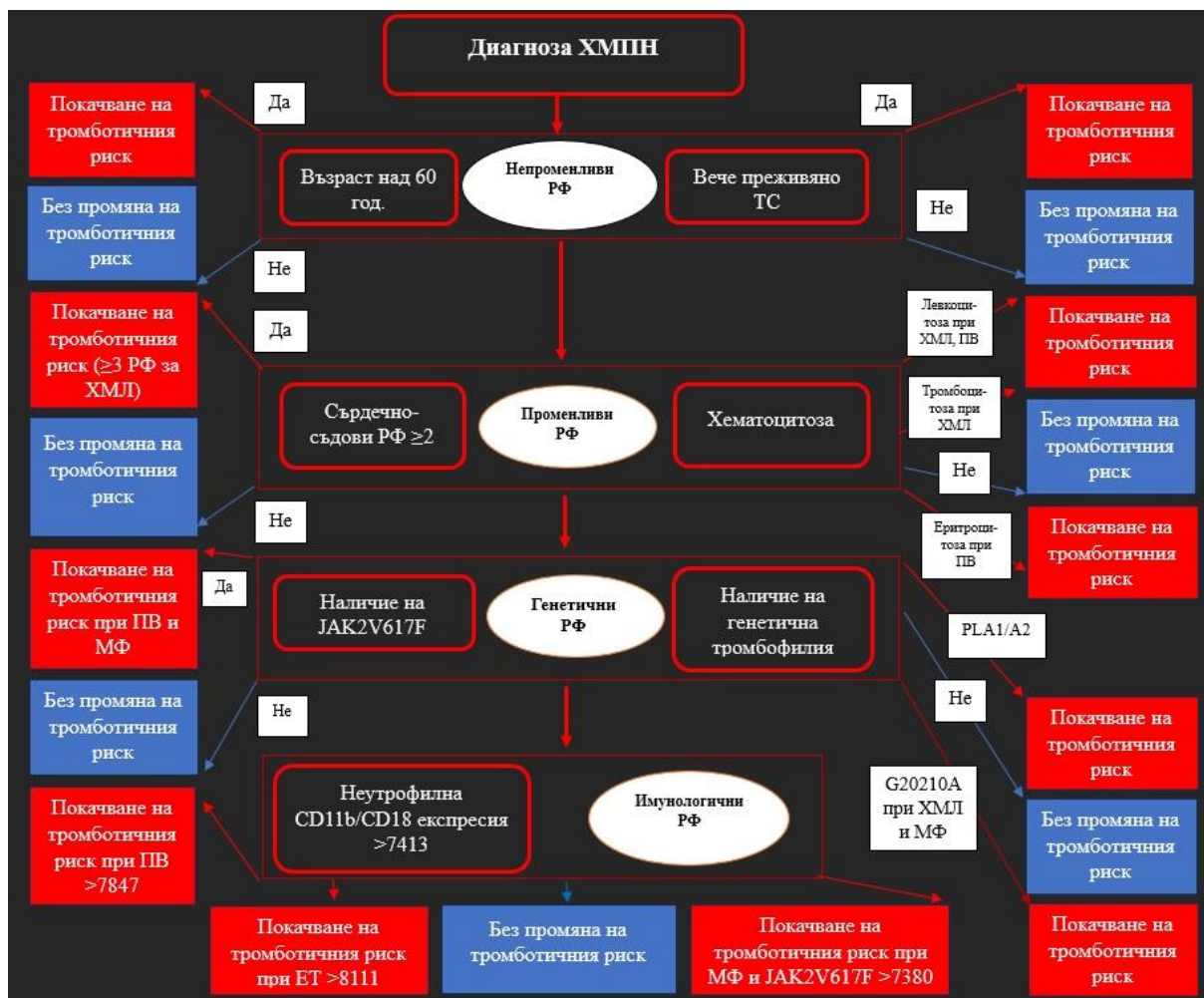
- носителство на генетична тромбофилия – покачва риска 14 пъти спрямо здрави контроли;
- носителство на PLA1/A2 – покачва риска 6 пъти спрямо здрави контроли;
- неутрофилна експресия на CD11b/CD18 при пациенти с ТС – значимо по-висока спрямо ЕТ пациенти без ТС (**p=0.03**);
- възраст над 60 год. – покачва риска 10 пъти.

Рискови фактори при пациенти с МФ:

- носителство на генетична тромбофилия – покачва риска 9 пъти спрямо здрави контроли;
- носителство на G20210A – покачва риска 2 пъти спрямо здрави контроли;
- носителство на PLA1/A2 – покачва риска 5 пъти спрямо здрави контроли;
- носителство на JAK2V617F мутация – покачва риска 3 пъти спрямо неносители;
- носителство на JAK2V617F мутация и възраст над 60 год. се среща при 75% от МФ пациентите с ТС, но при само 26% от тези без ТС;
- неутрофилна експресия на CD11b/CD18 при пациенти с JAK2V617F мутация и ТС - сигнификантно по-висока спрямо МФ пациенти с ТС без JAK2V617F мутация (**p=0.01**);
- наличието на поне 2 коморбидни/рискови фактори – значимо покачва риска (**p=0.05**);
- наличие на АХ и ИБС – покачва риска 3 пъти.

В обобщение на получените резултати предлагаме практически алгоритъм за поетапна оценка на тромботичния риск при пациенти с ХМПН (фиг. 7).

Разработеният алгоритъм, използвайки многокомпонентна рискова скала, позволява поетапна оценка на рисковите фактори за ТС при болни с ХМПН. Алгоритъмът може да се използва като елемент от един комплексен подход за прецизиране и индивидуализиране на тромбогенния риск при пациенти с тази патология. Това би било основа за прилагането на терапия, насочена към конкретния пациент, с оглед неговите генетични, средови и други индивидуални характеристики, което дава възможност тази терапия да е по-ефективна в контекста на направлението персонализирана медицина.



Фигура 7. Практически алгоритъм за оценка на тромботичния риск при пациенти с ХМПН

Терапията при тези пациенти следва принципите на циторедукция с различни медикаменти, таргетни молекули, антиагрегантна профилактика, антикоагулантно и симптоматично лечение, подходящ избор на ТКИ, корекция на рисковите фактори, а в някои случаи и преценка за алогенна костномозъчна трансплантация.

VI. ОБЩИ ИЗВОДИ

1. Носителството като цяло на генетични дефекти за тромбофилия е статистически значимо по-често в изследваната група пациенти, в сравнение със здравите контроли (OR=1.77). Най-сигнификантна разлика в честотата между двете групи беше установена за фактор PLA1/A2 (OR=1.93), особено в подгрупата на пациенти с ПВ (OR=22.73).
2. Независимо, че в общата група на пациенти с ХМПН тромбофиличните дефекти като цяло не показват асоциация с риска за ТС, носителите на тромбофилични дефекти в изследваната група имат статистически значимо 13 пъти покачване на риска за ТС при сравнение със здравите носители.
3. От всички проучвани дефекти за тромбофилия носителството на PLA1/A2 се среща сигнификантно с най-голяма честота в подгрупата пациенти с ПВ (OR=22.73), но показва значимост и за по-малко проучваните до момента групи, като МФ и ХМЛ (съответно OR=5.47 и OR=10.33). В подгрупата на пациентите с ХМЛ носителството като цяло на генетични дефекти за тромбофилия покачва 2 пъти тромбогенният риск, а в частност за G20210A – 5.6 пъти.
4. Носителството на JAK2V617F мутация асоциира с повишен тромбогенен риск при пациентите с ПВ и МФ пациенти (съответно 7 пъти и 3 пъти). Комбинираното носителство на генетични отклонения (тромбофилия и JAK2V617F) се среща 6 пъти по-често в подгрупата пациенти с ПВ в сравнение с другите пациентски подгрупи. Двойните носители на генетична тромбофилия и JAK2V617F мутация имат сигнификантно 2 пъти по-висок риск за развитие на ТС спрямо носителите единствено на генетична тромбофилия (RR=2.43, p=0.03).
5. Левкоцитозата се потвърждава като значим рисков тромбогенен фактор при пациенти с ХМЛ и ПВ (съответно RR=3.60 и RR=1.88), а тромбоцитозата – само при пациентите с ХМЛ (RR=5.60).
6. Неутрофилната експресия на CD11b/CD18 е сигнификантно повишена при всички пациенти с ХМПН, както и в отделните подгрупи в сравнение със здравите контроли (p<0.001). Това е валидно и за пациентите с ТС спрямо такива без реализирана тромбоза (p=0.008), особено в подгрупите ПВ и ЕТ (p<0.05). В общата група с ХМПН и носителство на генетични отклонения (тромбофилия и JAK2V617F) не се доказва статистически значима разлика в стойностите на неутрофилната експресия на

CD11b/CD18 при сравняване на пациентите с анамнеза за ТС, спрямо тези - без реализирано съдово събитие.

7. Наличието на ≥ 2 коморбидни/рискови фактора значимо покачва тромбогенния риск при пациенти с ХМПН ($p=0.0007$). Фактори като АХ, ИБС и СН се срещат сигнификантно по-често при лица с регистрирано ТС спрямо такива, без анамнеза за тромбози ($p<0.005$).
8. Разработеният алгоритъм за оценка на рисковите фактори за ТС при ХМПН може да се използва като елемент на един комплексен подход за прецизиране и индивидуализиране на тромбогенния риск при пациенти с тази патология.

VII. ПРИНОСИ

Приноси с научен и оригинален характер

1. Проведеното проучване е първото комплексно изследване на някои от рисковите фактори за тромбозата при пациенти с ХМЛ и ФХ-негативни ХМПН.
2. Добавят се научни данни за честотата и промяната в риска при доказване на някои генетични фактори за тромбофилия при пациенти с ХМЛ и МФ, които не са проучвани в този контекст, най-вече за носителство на PLA1/A2.
3. Изследвана е неутрофилната експресия на CD11b/CD18, като маркер за левкоцитна активност при класическите ХМПН (и в отделните диагностични подгрупи) и е оценено значението ѝ за развитие на тромбоза, както и отношението ѝ спрямо броя кръвни клетки.
4. Събрана е подробна информация и е отчетена значимостта на различни коморбидни/рискови фактори, които допринасят за тромбозата при всички пациенти.
5. Направен е опит за комплексен поглед върху сложната и многофакторна етиопатогенеза на ТС и отчитане участието на различни фактори при оценка на риска за тромботични усложнения при всички пациенти с ХМПН.

Приноси с приложен характер

1. Отчетен е конкретният тромbogenен риск при пациенти с различни видове ХМПН в зависимост от наличието на генетични отклонения с тромбофилен потенциал.
2. Доказва се връзката между промяната в броя неутрофили, експресиращи CD11b/CD18, при пациенти с ХМПН и покачването на тромbogenния риск.
3. При валидиране в големи пациентски популации получените стойности биха могли да се ползват като „прагови“ или предиктивни за преживяване на ТС в отделните пациентски подгрупи.
4. Установени са конкретни коморбидни/рискови фактори, които имат отношение към тромbogenезата в пациентската група.
5. Разработен е алгоритъм за оценка на рисковите фактори за ТС при ХМПН в рамките на комплексен подход за прецизиране и индивидуализиране на тромbogenния риск при пациенти с тази патология.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

A STUDY ON THE ROLE OF THROMBOPHILIC GENETIC DISORDERS AS A RISK FACTOR FOR THROMBOTIC COMPLICATIONS IN PATIENTS WITH MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS. Doroteya K. Todorieva-Todorova, Katya S. Kovacheva, Nikolay T. Tzvetkov, Stefan V. Trifonov, Galya Ts. Stavreva, Tihomir R. Rashev, Alexander A. Todorov, Petar D. Ivanov. JBCR, Vol.12 Number 1, 2019, p 19-26.

GRANULOCYtic EXPRESSION OF CD11B/CD18 AND THROMBOTIC RISK IN PATIENTS WITH MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS. Doroteya K. Todorieva-Todorova, Katya S. Kovacheva, Nikolay T. Tzvetkov, Svetla O. Blazheva, Tzvetan H. Lukanov. JBCR Vol. 14, No. 1, 2021, p. 47-53.

ROLE OF NEUTROPHIL CD11B/CD18 EXPRESSION IN THROMBOGENESIS OF PATIENTS WITH MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS, D. Todorieva-Todorova, L. Gercheva, K. Kovacheva, E. Mineva-Dimitrova, p. 47-53 "HEMATOLOGY" issue 1-2/2023, Vol. LX, ISSN 2367-7864

Dineva, Dobrinka & Paskaleva, Ivanka & Todorieva-Todorova, D.. (2019). Evaluation of platelet reactivity on dual antiplatelet therapy in patient with essential thrombocythemia and acute coronary syndrome. Clinica Chimica Acta. 493. S405. 10.1016/j.cca.2019.03.863.

Velkova A., Tzvetkov N., Kovacheva K., Todorieva D., Ivanov P., Todorov A., Penkova R., Golemanov G., Panayotova S., Popova V. A STUDY ON THE ROLE OF GENETIC THROMBOPHILIC DISORDERS AS A RISK FACTOR FOR THROMBOTIC COMPLICATIONS IN PATIENTS WITH MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS. Oral presentation at XII Anniversary International Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors, Pleven, Bulgaria. 8-11 Oct, 2013

Тодориева Д., Ковачева К., Цветков Н., Тодоров А., Иванов П., Пенкова Р., Големанов Г., Панайотова Ст., Попова В., Велкова А. ГЕНЕТИЧНИ ДЕФЕКТИ ЗА ТРОМБОФИЛИЯ КАТО РИСКОВИ ФАКТОРИ ЗА ТРОМБОТИЧНИ УСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ С МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ. Орална презентация, Втори национален симпозиум „Млад хематолог“, Сливен, България. 9-10 Ноември, 2013

Цветков Н.*, Ковачева К.** , Тодориева Д.*, Тодоров А.***, Панайотова Ст.*, Попова В.*, Иванов П. ****, Комса-Пенкова Р. ****, Велкова А.*****. ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ РОЛЯТА НА ГЕНЕТИЧНИТЕ ДЕФЕКТИ ЗА ТРОМБОФИЛИЯ КАТО РИСКОВИ ФАКТОРИ ЗА ТРОМБОТИЧНИ УСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ С МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ. Постер, X Национален конгрес по хематология, Плевен, България, 22-25.10.2015 г.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Информационен лист за пациента и информирано съгласие

Информационен лист за пациента

Заглавие на проекта:

ПРОУЧВАНЕ НА АДТИВНИЯ ЕФЕКТ ОТ НЯКОИ ГЕНЕТИЧНИ,
ИМУНОЛОГИЧНИ И КОМОРБИДНИ ФАКТОРИ ВЪРХУ
ТРОМБОГЕНЕЗАТА И ТРОМБОГЕННИЯ РИСК ПРИ ПАЦИЕНТИ С
МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

Обяснения и информация за пациента относно същността на проекта:

Уважаеми Господине/Госпожо/Госпожице,

Бихме искали да Ви помолим да участвате в изследователски проект с горепосоченото заглавие, тъй като при вас е диагностицирано заболяване от групата на Миелопролиферативните неоплазии. Участието е изцяло доброволно и ако не желаете, не трябва да се включвате в този проект.

Важно е да прочетете внимателно тази информация, преди да решите дали ще се включите в проекта. След като се запознаете с информацията имате право да зададете въпроси и ако получите удовлетворяващи Ви отговори, моля, попълнете формуляра, като с това ще потвърдите доброволното си желание за участие в проекта.

Ако решите да откажете своето участие или да се оттеглите от проучването, което имате право да направите по всяко време, без да давате обяснения, лечението Ви няма да бъде повлияно от това Ваше решение. То няма да се отрази и на отношението на медицинския персонал към Вас, както и на цялостните грижи за Вашето здраве. Ако се откажете от участие в проекта, Ви молим да уведомите изследователския екип.

Проектът ще се осъществява от лекари от Клиника по хематология. По всички интересоващи Ви въпроси можете да се отнасяте към водещия изследовател проф. Катя Ковачева и д-р Доротея Годориева.

Бихме искали да Ви помолим да участвате в проекта, за да получим отговор на въпроса каква роля има генетичното предразположение за развитие на тромбози, които са тежките усложнения на Миелопролиферативните заболявания. С изпълнението на този проект ще получим нови знания за генезата на тромбообразуването при тези състояния. Това би определило по-точно от сега съществуващите методи за диагностика и индивидуализиране на терапевтичния подход за всеки пациент.

Проектът ще продължи 1 година.

При започването му, лекар-член на изследователския екип ще Ви зададе въпроси относно заболяванията, от които страдате сега или сте страдали в миналото, както и някои лични данни – родена дата, адрес и телефони на Вас, за да може да се осъществява контакт с Вас и след като бъдете изписан(а) от

болницата. Данните ще се нанасят в Карта на пациента – документ, до който ще имат достъп само членовете на изследователския екип.

Освен обичайните изследвания, задължително изисквани при болни с Миелопролиферативни заболявания, ще Ви бъдат взети допълнително 2 епруветки 5-7 мл. венозна кръв, за изследване на 3 ДНК маркера – изменения в гените на фактор V (FVL), на протромбина и един полиморфизъм -PLA2 аелът на GP3a, MTHFR, както и за имунологично изследване за CD11b/CD18. Вземането на венозна кръв за това изследване не надвишава обичайните рискове, свързани с тази манипулация. Този риск ще бъде минимизиран поради това, че кръвната проба ще се взема от обучен персонал и при задължително спазване на утвърдените изисквания за стерилност при вземане на кръвни проби.

Ще бъдете помолен да посетите болницата УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ по-късно, за да получите резултатите си.

Не са предвидени средства в проекта за обезпечаване на Вашите транспортни разходи, свързани с осъществяване на контролните прегледи.

Ако решите да участвате, цялата информация за Вас ще остане поверителна. Определени упълномощени лица (д-р Доротея Тодориева) ще имат достъп до Вашата медицинска карта, но при строга поверителност. Не са предвидени компенсации в случай на претърпени вреди от участие в изследването и допълнителните грижи, тъй като от това изследване не произтичат допълнителни рискове или те са минимални, при спазване на условията за безопасност и при извършването им от обучен персонал, както е предвидено.

Формуляр за информирано съгласие

Заглавие на проекта:

ПРОУЧВАНЕ НА АДТИВНИЯ ЕФЕКТ ОТ НЯКОИ ГЕНЕТИЧНИ,
ИМУНОЛОГИЧНИ И КОМОРБИДНИ ФАКТОРИ ВЪРХУ ТРОМБОГЕНЕЗАТА
И ТРОМБОГЕННИЯ РИСК ПРИ ПАЦИЕНТИ С МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ
ЗАБОЛЯВАНИЯ

Моля, подчертайте **Да** или **Не** за всички посочени по-долу твърдения
(**подчертава се вярното твърдение**).

Бях помолен да се съглася сам Да Не

Прочетох Информационния лист на пациента Да Не

Дадена ми бе възможност да задам всички
важни за мен въпроси и да обсъдя този проект Да Не

Получих удовлетворяващи ме отговори
на всички мои въпроси Да Не

Получих достатъчна информация относно проекта Да Не

Проектът ми беше обяснен, зададох въпросите си и получих отговори на тях от
Д-р Доротея Годориева.

(име на изследователя)

.....
(Подпис на изследователя)

Разбирам, че съм свободен да се откажа от участие в проекта по всяко
време, без да давам обяснения за отказа си и без това да повлияе на полагащите
ми се в бъдеще медицински грижи.

Дата:.....

Име, презиме, фамилия на пациента:

.....

Подпис на пациента:.....

Информационен лист за доброволеца

Заглавие на проекта:

ПРОУЧВАНЕ НА АДТИВНИЯ ЕФЕКТ ОТ НЯКОИ ГЕНЕТИЧНИ,
ИМУНОЛОГИЧНИ И КОМОРИДНИ ФАКТОРИ ВЪРХУ ТРОМБОГЕНЕЗАТА
И ТРОМБОГЕННИЯ РИСК ПРИ ПАЦИЕНТИ С МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ
ЗАБОЛЯВАНИЯ

Обяснения и информация за доброволци относно същността на проекта:

Уважаеми Господине/Госпожо/Госпожице,

Бихме искали да Ви помолим да участвате като доброволци в изследователски проект с горепосоченото заглавие. Участието е изцяло доброволно и ако не желаете, не трябва да се включвате в този проект.

Проектът се осъществява от лекари от Хематологична клиника. По всички интересуваша Ви въпроси можете да се отнасяте към водещия изследовател проф. д-р Катя Ковачева и към д-р Доротея Тодориева.

Участието Ви в проекта, ще даде възможност на изследователите да получат отговор на въпроса, каква роля има генетичното предразположение и някои имунологични фактори за развитие на тромбози, които са тежките усложнения на заболявания от групата на Миелопролиферативните болести. Това би имало значение за избора на най-подходящ лечебен подход за всеки пациент, съобразен с неговите наследствени особености.

Участието Ви в проекта се състои във вземането от Вас на 5-7 мл. венозна кръв, за изследване на имунологични маркери върху гранулоцитната мембрана – CD11b/CD18. Вземането на венозна кръв за това изследване не надвишава обичайните рискове, свързани с тази манипулация. Този риск ще бъде минимизиран поради това, че кръвната проба ще се взема от обучен персонал и при задължително спазване на утвърдените изисквания за стерилност при вземане на кръвни проби.

КОМИСИЯ ПО ЕКИПА НА НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКАТА
ДЕЙНОСТ ПРИ МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН ОДОБРЯВА
ГОРНОТО ИЗЛОЖЕНИЕ ЗА ИНФОРМАЦИОНЕН ЛИСТ НА
ДОБРОВОЛЕЦА:

Подпис:.....
(Председател на Комисия по етика на научно-изследователската дейност)

Дата:.....

Формуляр за информирано съгласие

Заглавие на проекта:

ПРОУЧВАНЕ НА АДТИВНИЯ ЕФЕКТ ОТ НЯКОИ ГЕНЕТИЧНИ,
ИМУНОЛОГИЧНИ И КОМОРБИДНИ ФАКТОРИ ВЪРХУ ТРОМБОГЕНЕЗАТА
И ТРОМБОГЕННИЯ РИСК ПРИ ПАЦИЕНТИ С МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ
ЗАБОЛЯВАНИЯ

Моля, подчертайте **Да** или **Не** за всички посочени по-долу твърдения
(**подчертава се вярното твърдение**).

Бях помолен да се съглася сам Да Не

Прочетох Информационния лист на доброволеца Да Не

Дадена ми бе възможност да задам всички
важни за мен въпроси и да обсъдя този проект Да Не

Получих удовлетворяващи ме отговори
на всички мои въпроси Да Не

Получих достатъчна информация относно проекта Да Не

Проектът ми беше обяснен, зададох въпросите си и получих отговори на тях
от.....
(име на изследвателя)

.....
(Подпис на изследвателя)

Разбирам, че съм свободен да се откажа от участие в проекта по всяко
време, без да давам обяснения за отказа си.

Дата:.....

Име, презиме, фамилия на доброволеца:

.....

Подпис на доброволеца:.....

Приложение 3. Анкетна карта

АНКЕТНА КАРТА №

за изследване на генетични дефекти за тромбофилия при пациенти с Миелопролиферативни заболявания

1. Име..... възраст пол.....
2. Адрес, телефон.....
3. Клинична диагноза

 - дата на поставяне на диагнозата.....
 - клинични данни/ анамнеза
 - първоначални патологични промени
 - лабораторни.....

4. Минали и придружаващи заболявания и състояния:
 - инфаркт на миокарда, ИБС, хипертония, сърдечна недостатъчност, или др.ССЗ
 - □ □ □ □ □
 - диабет, затлъстяване, хиперлипидемия, неоплазия, чернодробно страдание
 - □ □ □ □ □
 - предишни прояви на тромботични инциденти преди хематологичното заболяване
 - венозна тромбоза (ВТ) и възраст □ да □ не
 - венозен тромбоемболизъм (ВТЕ) и възраст.....□ да □ не
 - информация касаеща само жени, относно изходи на бременности:
 - спонтанни аборти брой (.....); срок на бременността (.....)
 - усложнения на бременността
 - прееклампсия □ да □ не
 - abruption placentae □ да □ не
 - интраутеринно изоставане в развитието □ да □ не
 - мъртво раждане брой (.....); срок на бременността (.....)
 - перорални контрацептиви □ да □ не
5. Провокиращи фактори за тромботични събития □ да □ не
 - ако "да" – кой от следните :
 - оперативна интервенция □ да □ не
 - травма □ да □ не
 - продължителна имобилизация □ да □ не
 - злокачествени заболявания □ да □ не
 - хормонозаместителна терапия □ да □ не
6. Допълнителни провокиращи фактори – тютюнопушене □ да □ не
7. Усложнение на основното заболяване/ в хода на заболяването прояви на тромбози или хеморагии - локализация:
 - тромбози (инсулт, инфаркт, НАП, ДВТ, БТЕ, портална/далачна тромбоза) □ да □ не
 - вени на долен крайник – дълбоки / повърхностни
 - други локализации:.....
 - хеморагии □ да □ не локализация.....
8. Лечение:
 - провеждано в момента лечение на хематологичното заболяване.....
 - прием на Хидрея □ да □ не
 - провеждано в момента лечение на придружаващите заболявания.....
 - данни за оперативно лечение.....
9. Фамилна история за тромбози □ да □ не
 - Ако "да" – какви родственици
10. Доказано носителство на тромбофилична мутация в родственик от I степен.... □ да □ не
11. Клиника.....
12. Лекуващ лекар.....
13. Дата на вземане на материала

Материал за изследване – 5-9 мл венозна кръв се взема в 2 специални пластмасови епруветки, съд. EDTA маркирана с лилава капачка и се съхранява в хладилник на 4 °С не повече от 24 часа (да не се замразява)

Телефони за контакт: 064/ 886 – 392

Лице за контакт д-р Д. Тодориева 0892 21 25 20

Приложение 4. Решения на комисията по етика на научно-изследователската дейност при Медицински университет - Плевен

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ гр. ПЛЕВЕН КОМИСИЯ ПО ЕТИКА НА НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКАТА ДЕЙНОСТ КЕНИД МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ПЛЕВЕН Ул. "Климент Охридски" № 1 Телефон: 884 196 / 884 197	Изм. № <u>349-КЕНИД</u> / <u>24.06.2015</u>
РЕШЕНИЕ НА КОМИСИЯТА ПО ЕТИКА НА НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКАТА ДЕЙНОСТ ПРИ МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН	

Спонсор	Медицински Университет-Плевен, ул. „Климент Охридски“1
Главен изследовател	Доц. Д-р Николай Цветков, дм
Изследователски център(ове)	<ul style="list-style-type: none">✓ Сектор „Генетика“, катедра „Микробиология, вирусология и медицинска генетика,“ МУ – Плевен✓ Клиника по Хематология, УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Плевен✓ Клиника по Имунология, УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Плевен
Заглавие на проекта	<i>„Проучване върху генетични и имунологични фактори, определящи тромбогенезата при пациенти с миелопролиферативни заболявания“</i>
Протокол № 37	
Получени, разгледани и одобрени от КЕНИД документи	<ul style="list-style-type: none">✓ Форма-заявление за разглеждане и даване на решение за извършване на научни изследвания върху човешки същества✓ План-проект на научното изследване✓ Информационен лист и формуляр за информирано съгласие на пациента✓ Информационен лист и формуляр за информирано съгласие на доброволеца✓ Анкетна карта за изследване на генетични дефекти за тромбофилия при пациенти с Миелопролиферативни заболявания✓ Творчески автобиографии на изследователя

Комисията по етика на научно-изследователската дейност при Медицински Университет - Плевен **реша** да разреши провеждането на научно изследване на тема: *„Проучване върху генетични и имунологични фактори, определящи тромбогенезата при пациенти с миелопролиферативни заболявания“* с главен изследовател доц. д-р Николай Цветков, д.м. и определя срок за **периодичен надзор** съгласно изискванията на КЕНИД (*приложение 2*) на 12-тия месец от началото на проучването.

24.06.2015г.
гр. Плевен

Председател на КЕНИД:
(доц. д-р С. Александрова-Янкуловска, д.м.н)



КОМИСИЯ ПО ЕТИКА НА НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКАТА ДЕЙНОСТ
МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ПЛЕВЕН
Ул. "Климент Охридски" № 1
Телефон: 884 196 / 884 197

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
гр. ПЛЕВЕН
КЕНИД

Изв. № 464-КЕНИД/06.06.2017

**РЕШЕНИЕ НА КОМИСИЯТА ПО ЕТИКА НА НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКАТА
ДЕЙНОСТ ПРИ МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН**

Спонсор Медицински Университет-Плевен, ул. „Климент Охридски“1

Главен изследовател Доц. Д-р Николай Цветков, дм

Изследователски център(ове)

- Клиника по хематология, УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ ЕАД;
- Клиника по имунология, УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ ЕАД
- Научно-изследователски център – МУ - Плевен

Заглавие на проекта *„ Проучване върху генетични и имунологични тромбофилични фактори, определящи тромбогенезата при пациенти с миелопролиферативни заболявания“*

Протокол № 43

Получени, разгледани и одобрени от КЕНИД документи

- ✓ Форма-заявление за разглеждане и даване на решение за извършване на научни изследвания върху човешки същества
- ✓ План-проект на научното изследване
- ✓ Информационен лист за пациента
- ✓ Анкетна карта за изследване на генетични дефекти за тромбофилия при пациенти с Миелопролиферативни заболявания
- ✓ Заявление за разрешение за провеждане на проучване от Изпълнителен директор на УМБАЛ – Плевен
- ✓ Автобиографии на изследователския екип

Комисията по етика на научно-изследователската дейност при Медицински Университет - Плевен реши да разреши провеждането на научно изследване на тема: *„Проучване върху генетични и имунологични тромбофилични фактори, определящи тромбогенезата при пациенти с миелопролиферативни заболявания“* с главен изследовател доц. д-р Николай Цветков, дм с периодичен надзор 12 месеца от началото на проучването (Приложение 1)

21. 06. 2017 г.,
гр. Плевен

Председател на КЕНИД:
(проф. д-р С. Александрова-Янкуловска, д.м.н.)

Секретар на КЕНИД:
(доц. Макрета Драганова)



КОМИСИЯ ПО ЕТИКА НА НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКАТА ДЕЙНОСТ
МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ПЛЕВЕН
Ул. "Климент Охридски" № 1
Телефон: 884 196 / 884 197

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ

гр. ПЛЕВЕН

КЕНИД

№ 555-КР/МУ/10.05.2019

**РЕШЕНИЕ НА КОМИСИЯТА ПО ЕТИКА НА НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКАТА
ДЕЙНОСТ ПРИ МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН**

Спонсор Медицински Университет-Плевен, ул. „Климент Охридски“1

Главен изследовател Проф. д-р Катя Ковачева, дм

Изследователски център(ове)

- Клиника по хематология, УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен
- Научно-изследователски център - МУ - Плевен
- Клиника по имунология, УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен

Заглавие на проекта „Проучване на адитивния ефект от някои генетични, имунологични и коморбидни фактори върху тромбозата и тромбозния риск при пациенти с миелопролиферативни заболявания“

Протокол № 46

Получени, разгледани и одобрени от КЕНИД документи

- ✓ Форма-заявление за разглеждане и даване на решение за извършване на научни изследвания върху човешки същества
- ✓ План-проект на научното изследване;
- ✓ Информационен лист за доброволеца;
- ✓ Информационен лист за пациента;
- ✓ Анкетна карта №...за изследване на генетични дефекти за тромбофилия при пациенти с Миелопролиферативни заболявания
- ✓ Разрешение от Изпълнителен директор на УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен
- ✓ Автобиографии на изследователския екип

Комисията по етика на научно-изследователската дейност при Медицински Университет - Плевен реши да разреши провеждането на научно изследване на тема: „Проучване на адитивния ефект от някои генетични, имунологични и коморбидни фактори върху тромбозата и тромбозния риск при пациенти с миелопролиферативни заболявания “ с главен изследовател проф. д-р Катя Ковачева, дм с периодичен надзор 12 месеца от началото на проучването (Приложение I).

Май, 2019 г.
гр. Плевен

Председател на КЕНИД:
(проф. д-р С. Александрова-Янгуловска, д.м.н.)

Секретар на КЕНИД:
(доц. Макрета Драбарева)



Приложение 5. Референтни стойности за параметрите в ПКК

	Левкоцити	Хемоглобин	Тромбоцити
<i>Референтна стойност</i>	3.5-10.5x10 ⁹ /l	120-150 g/l за жени, 130-170 g/l за мъже	130-420x10 ⁹ /l
<i>Под норма</i>	Левкопения	Нисък	Тромбоцитопения
<i>Над норма</i>	Левкоцитоза	Висок	Тромбоцитоза

