

**КОРЕЛАЦИОННА ЗАВИСИМОСТ МЕЖДУ ТУМОРНАТА
АНГИОГЕНЕЗА, МУТАЦИОННИЯ ТОВАР, ПРОМЕНИТЕ В КРЪВНАТА
КАРТИНА И ТРОМБОГЕННИЯ РИСК ПРИ ПАЦИЕНТИ
С ЕСЕНЦИАЛНА ТРОМБОЦИТЕМИЯ И ПОЛИЦИТЕМИЯ ВЕРА**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане на
научна и образователна степен „Доктор“**

Д-р Антонио Иванов Антонов

**Медицински университет - Варна
Факултет по медицина**

Научен ръководител: Доц. д-р Лиана Герчева-Кючукова, дм

Варна

2018

Дисертационния труд е написан на 117 стандартни страници, и е онагледен с 40 таблици, 26 фигури. Включени са 2 приложения. Библиографията включва 164 литературни източника, от които 5 на кирилица и 129 на латиница.

Клиничните изследвания са проведени в Клиника по Хематолгия на УМБАЛ“Света Марнита“ ЕАД Варна и Клиника по Хематология на УМБАЛ“Георги Странски“ ЕАД Плевен

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедрен съвет на Катедра по Вътрешни болести при Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна и е насочен за публична защита.пред научно жури в състав:

Проф. д-р Стефан Емилов Горанов, дмн, рецензент
Проф. д-р Людмила Бончева Ангелова дм, рецензент
Доц. д-р Лиана Тодорова Герчева-Кючукова, дм
Проф. д-р Георги Николаевич Балаценко, дм
Проф. д-р Юлиан Иванов Райнов, дм

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 09.07.2018 от часа в Аудитория „ Проф. д-р Владимир Иванов“ на УМБАЛ“Света Марина“ – Варна на открито заседание на Научното жури

Материалите по защитата са на разположение в Библиотеката на Медицински университет „ Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна и на интернет страницата на МУ-Варна на адрес: <http://www.mu-varna.bg>

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на съкращенията	4
Въведение.....	5
РАБОТНА ХИПОТЕЗА.....	7
ЦЕЛ	8
ЗАДАЧИ	8
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	9
Резултати	
1.1.Група 1 Влияние на Jak2 ^{V617F} за развитието на тромбози	
1.2.Група 2 Влияние на левкоцитозата за развитието на тромбози	
1.3.Група 3 Влияние на факторите за вродена тромбофилия	
1.4.Група 4 Костно-мозъчна ангиогенеза	
1.5.Група 5 Оценка на промените в рутинните кръвни показатели	
ДИСКУСИЯ	48
Мутационен товар на Jak2V617F и тромботични събития	
1.1.Левкоцитозата като рисков фактор за тромботични събития	
1.2.Носителството на вродена тромбофилия като рисков фактор	
1.3.Костно-мозъчната ангиогенеза	
1.4.Определяне на независим прогностичен показател	
1.5.Промени в стандартните хематологични показатели	
ИЗВОДИ	67
ПРИНОСИ	69
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 - ПОДХОД КОГА КАКВО КАК.....	70
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 - АНКЕТНА КАРТА №.....	71

СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА

На български език

АДФ - Аденозиндифосфат
АТФ - Аденозинтрифосфат
АХ - Артериална хипертония
ВТ - Вродена тромбофилия
Ер - еритроцити
ЕТ - Есенциална тромбоцитемия
ЗД - Захарен Диабет
ИБС - Ишемична болест на сърцето
ИМИ - Ишемичен мозъчен инсулт
Лев - левкоцити
ОМИ - Остър миокарден инфаркт
ОМЛ - Остра миелоидна левкемия
ОП - обща преживяемост
ПВ - Полицитемия вера
ПМФ - Първична миелофиброза
ПНМК - преходни нарушения на мозъчното кръвообращение
СЗО - Световна здравна организация
СН - сърдечна недостатъчност
Тр - тромбоцити
ТС - тромботично събитие
Хб - хемоглобин
Хт - хематокрит

На английски език

aPC - активиран протеин С
BCS - синдром на Budd-Chiari
CARL - Calreticulin
DAMP`s - отпадно-асоцирани молекулярни структури
Dg. - диагноза
ECLAP - Европейско сътрудничество за ниска доза аспирин при Полицитемия вера
HU - Хидроксурея
IL - интерлевкин
M-CSF - Макрофагиален колони стимулиращ фактор
MP`s - микрочастици
MPL - рецептор за тромбopoетина
MTHFR - метилтетраhydrofolat редуктаза
MVD - микро съдова плътност
Ph (-) МПН - Филадельфия отрицателни Миелопролиферативни неоплазии
PS - phosphatidylserine-фосфатидилсерин
PVT - портална венозна тромбоза
STAT - сигнален трасдуктор и активатор на транскрипцията
SVT - спланхникова венозна тромбоза
TF - tissue factor- тъканен фактор
TGF – трансформиращ растежен фактор
TPO - тромбopoетин
VEGF - съдов ендотелен растежен фактор
vWF - фактор на фон Вилебрант
WT - Wild type-нормалния генотип на Jak2

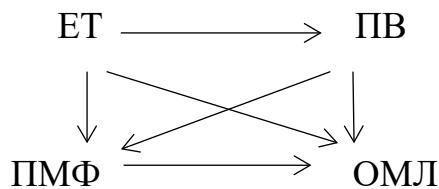
ВЪВЕДЕНИЕ

Миелопролиферативните неоплазии (МПН) са хетерогенна група от придобити клонални заболявания на плурипотентната хемопоетична стволова клетка, които възникват вследствие мутации в гените, кодиращи сигналните пътища за цитокини. Като резултат, настъпва нарушена регулация с увеличена пролиферация на една или повече миелоидни клетъчни редици, при запазена матурация и ефективна хемопоеза.

Съвременната класификацията на МПН (СЗО 2016 г) включва 8 нозологични единици (Arber, Orazi et al. 2016). Основателен интерес в групата на Филадельфия негативните МПН -Ph(-)МПН будят Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия, предвид специфичния си клиничен ход и високия процент на тромботични усложнения.

Групирането на двете заболявания се базира на:

1. Еднакво генетично нарушение - т.н. driver мутация - $JAK2^{V617F}$ в хомозиготно или хетерозиготно състояние като най-честа патолофизиологична аномалия.
2. В клиничен аспект:
 - a. Наблюдение на припокриващи (“overlap”) синдроми.
 - b. Динамичната им природа с възможност за трансформация от една форма в друга в хода на болестта.



Фигура 1 Трансформация на МПН(Petrides 2017)

- c. Дебюта им (възраст на диагностициране между 50 и 70 години) и клиничен ход (индолентен с обща преживяемост от 10 години до непроменена)
- d. Тромбхеморагични събития, като най-чести и важни прогностични фактори, определящи продължителността на живота на пациентите.

Тромботичните усложнения влияят най-силно върху болестността и морталитета в хода на заболяванията и са основна причина за инвалидизация и смърт.

Всичко това определя началната тромботична рискова стратификация като ключов фактор за терапевтично поведение и прогноза.

Възрастта при поставяне на диагнозата (под или над 60 год), анамнезата за прекарани тромботични събития и съпътстващо сърдечно-съдово заболяване са

утвърдените понастоящем фактори за оценка на риска при пациентите с ПВ и ЕТ. Според тези критерии са налице 3 рискови групи:

- с нисък риск и обща преживяемост (ОП)=27,8 год.,
- интермедиерен риск и обща преживяемост=18,9 год. и
- висок риск с обща преживяемост=10,9 год

Класифицирането в една от трите рискови групи определя първоначалния терапевтичен подход (Rumi and Cazzola 2016).

Тези рискови фактори, независимо че са резултат от насочени проучвания, изглеждат много общи и не отразяват истинските механизми на тромботичните усложнения. Те не характеризират самото заболяване или индивидуалното му протичане, което води до неадекватна оценка на риска при немалка група пациенти.

Още през 1856 год. Рудолф Вирхоф постулира, че за развитието на венозни тромбози е необходимо нарушение във взаимодействията между стената на кръвоносните съдове, съставките на кръвта и кръвния поток (Chung and Lip 2003). Съвременните схващания за механизмите на тромбогенеза запазват базовата постановка за мултифакторен патогенетичен процес, който включва вече генетични и негенетични рискови фактори в етиологията. на тромбозата. Генетичните рискови фактори включват дефицит на протеин С (2.5 - 6%) и протеин S (1.3 - 5%), дефицит на антитромбин III (0.5 - 7,5%), наличие на фактор V Leiden (10%), протромбин (20210G>A) (5 - 10%), дефект на MTHFR (697C>T). Негенетичните включват комплексни механизми, регулиращи образуването на фибрин, сложни междуклетъчни взаимодействия, хемореологични промени, ефекти вследствие придружаващи заболявания, или хабитуални навици.

Откриването на молекулярните патофизиологични промени, които настъпват при Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия промени разбиранията за заболяванията и техните усложнения. Но постави и нови въпроси като: Какво е значението на мутационния товар на Jak2^{V617F} за развитието на тромботични събития?; Имат ли значение увеличените левкоцити за тромботичния процес?; Каква е честотата и какво е въздействието на факторите за вродена тромбофилия (ВТ) при тромботични усложнения?; Каква роля играят променените стандартни хематологични показатели за развитие на тромботични събития?; Възможно ли е да се подобри настоящата рискова скала което да доведе до промяна в лечението?

Отговорите на по-голяма част от тези въпроси на настоящия етап са противоречиви и непълни.

РАБОТНА ХИПОТЕЗА

Тромботичните усложнения имат определяща роля за болестността и преживяемостта при Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия. Тяхната генеза е сложна и мултифакторна. В същото време в настоящата рискова скала са включени най-общи показатели за риск като възраст и прекарани тромбози.

Патофизиологичните промените в броя и характеристиките на засегнатите клетъчни популации зависят от изразеността на молекулярните мутации и променят основно хемореологията на кръвния ток. Те модифицират всеки един от факторите в триадата на Вирхоф и действат протромбогенно. Индиректна оценка за степента на тези промени може да получим чрез отклоненията в стандартните хематологични показатели. От друга страна, тези промени включват различни типове компенсаторни механизми, целящи балансиране на хомеостазата.

В реалната медицина, развитието на Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия нерядко може да започне на терена на вродено тромбофилно състояние, което е допълнителен тромбогенен фактор.

Анализирането на промените в хематологичните, молекулярните, патоморфологичните показатели и влиянието им върху тромботичните събития ще позволи създаването на по-акуратен прогностичен модел и провеждане на риск-адаптирано лечение.

ЦЕЛ

Да се оцени влиянието на някои достъпни молекулярни, генетични, патоморфологични и стандартни хематологични показатели в рисковата стратификация на тромботичния риск при болни с Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия.

ЗАДАЧИ

1. Да се проучи връзката между алелния товар на мутацията $Jak2^{V617F}$ и тромботичните усложнения при пациенти с Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия.
2. Да се проучи и анализира значението на увеличаване на левкоцитен брой при дебюта на заболяванията за развитие на тромботични усложнения.
3. Да се изследва носителството на вродени фактори за тромбофилия при пациенти с Есенциална тромбоцитемия и Полицитемия вера и анализира тяхното влияние върху тромботичните усложнения.
4. Да се проучат и анализират връзките между костно-мозъчната ангиогенеза, мутационния товар на $Jak2^{V617F}$, степента на спленомегалия и тромботичните усложнения.
5. Да се изработи анкетна карта за оценка на тромботични събития.
6. Да се потърси корелационна зависимост между изброените за проучване показатели с възможност за определяне на независим прогностичен показател.
7. Да се анализира влиянието на патологично променените стандартни хематологични показатели върху развитието на тромботичния процес.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Бази за реализиране на дисертационния труд

- Клиника по Хематология–УМБАЛ „Св.Марина“ЕАД–Варна
- Клиника по Хематология–УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ЕАД–Плевен
- Клиника по Обща и клинична патология–УМБАЛ „Св. Марина“–Варна
- Лаборатория по Клинична имунология–УМБАЛ „Св.Марина“ЕАД–Варна
- Секция Медицинска генетика, МУ–Плевен
- Секция Биохимия, МУ–Плевен

Пациенти, контроли и характеристика на проучваните групи

Пациенти

В настоящето проучване са включени общо 199 пациенти с диагноза Полицитемия вера (125) и Есенциална тромбоцитемия (74), диагностицирани според критериите на СЗО. Както е показано на таблица 10 пациентите от Клиника по Хематология при УМБАЛ „Св. Марина“ –Варна са съответно 103 (ПВ) и 54 (ЕТ), диагностицирани и лекувани в периода 2007-2017 год. В проучването са включени и общо 42 пациенти 22 (ПВ) и 20 (ЕТ), изследвани за фактори на вродена тромбофилия в Клиника по Хематология на УМБАЛ “Д-р Георги Странски“ - Плевен в интервала 2005-20012 година.

Таблица 1 Групи пациенти участващи в проучването.

Група	Клиника	Тип проучване	ПВ	ЕТ
Група 1	Клиника по Хематология УМБАЛ „Св. Марина“ЕАД – Варна Период 2007-2017 год	Ретроспективно	103	54
Група 2	Клиника по Хематология – УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ЕАД – Плевен Период 2005-2012 година	Проспективно	22	20

За целта и задачите на настоящето проучване създадохме електронна база данни за регистрация на пациенти с Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия, използвайки софтуерна платформа на Microsoft Excel 2010

(Microsoft Inc. USA). Структурата на базата данни (data base-DB) съдържа 12 панела включващи до няколко подпанела:

1. Демографски данни-пол, възраст, дата на поставяне на диагнозата;
2. Рискава стратификация по настоящата рискова схема;
3. Кардиориск - Артериална Хипертония, Захарен Диабет, Хиперхолестеролемия, Тютюнопушене
4. Патологоанатомични изследвания:
 - a. Костно-мозъчен целуларитет;
 - b. Степента на костно-мозъчна фиброза;
 - c. CD34+;
 - d. MVDCD34+;
5. Молекулярни изследвания: $Jak2^{V617F}$ статус
 - a. Див тип, Wild type/;
 - b. Heterozygosity / $Jak2^{V617F} < 50\%$ /;
 - c. Homozygosity / $Jak2^{V617F} \geq 50\%$ /;
6. Трестепенна оценка на конституционални симптоми:

няма; / леко изразени; / изразени;
7. Рутинни кръвни изследвания (Хб, Хт, Лев, Ер, Тр, ЛДН);
8. Оценка размера на далака:

физикална методика; / ехографска методика;
9. Видове лечение:

Хидроксисуея; α -Интерферон; Анагрелид; Флеботомии;
10. Придружаващи заболявания;
11. Тромбози (общ брой);
12. Тромбози (видове: артериални и/или венозни);
13. Тромбози (животозастрашаващи или неживотозастрашаващи);
14. Хеморагии;
15. Усложнения (постЕТ-МФ, постПВ-МФ, остра левкемия);
16. Ниво на еритропоетин;

Базата данни е попълнена въз основа на събраната информация в Клиника по Хематология ретроспективно.

Група 2 пациенти от Клиника по Хематология на УМБАЛ“ Д-р Г. Странски“ Плевен е набрана в хода на проспективно изследване. Преди провеждане на планираните изследвания пациентите са запознати и подписали специално, подготвено за целите на проучването информирано съгласие. Информацията, касаеща всеки пациент е отбелязана в Анкетна карта (Приложение 1), която съдържа: паспортна част, анамнестични и клинични данни, резултати от лабораторни и други изследвания, фамилна анамнеза, провокиращи фактори и

проведено лечение. Създадена е отделна база данни отново на софтуерна платформа на Microsoft Excel 2010 (Microsoft Inc. USA) включваща 10 панела:

1. Демографски данни: пол, възраст, дата на поставяне на диагнозата;
2. Диагноза;
3. Фамилност;
4. Придружаващи заболявания;
5. Молекулярни изследвания за фактор V Leiden (FVL), мутация G20210A в протромбиновия ген (PR G20210A), мутация C677T в гена на ензима метилентетрахидрофолат редуктаза (MTHFR C677T) и полиморфизъм - алел PLA2 в гена на тромбоцитния гликопротеинов рецептор Пв/Ша (PLA2/GPIIa);
6. Рутинни кръвни изследвания (Хб, Хт, Лев, Ер, Тр);
7. Оценка размера на далака: физикална методика; ехографска методика;
Видове лечение: Хидроксиурея, α -Интерферон; флеботомии;
8. Тромбози (общ брой);
9. Тромбози (според вида);

Контроли

За сравнение при различните специализирани изследвания са обособени две контролни групи:

- Група 1 - контролна група за имунохистохимичен анализ.

Групата е съставена от 10 пациента на средна възраст 67 години, при които е осъществена рутинна трепанобиопсия в процеса на стадиране на неходжкинов лимфом или болест на Ходжкин, при които липсват белези за костно-мозъчна патология.

- Група 2 - контролна група за изследвани факторите за вродена тромбофилия.

Групата е съставена от 112 случайно подбрани клинично здрави индивиди, мъже (56) и жени (56) на средна възраст 54 години от европейската раса, селектирани от 288 доброволци, подбрани по следните критерии:

- а) липсват анамнестични и физикални данни за тромботични събития,
- б) липсва фамилна анамнеза за тромботични инциденти сред роднини от първа линия определена при интервюта.
- в) жени без анамнеза за спонтанни аборти с поне едно здраво, живородено дете.

Пациентите и контролната група са с подобни демографски данни от един и същ географски район. Данните за демографските изходни характеристики и общите рискови фактори, са събрани чрез преглед на медицинската документация. Протоколът за генетични проучвания на факторите за вродена

тромбофилия е разгледан и одобрен от Комисията по етика на Медицински университет - Плевен. Всички включени лица са участвали доброволно след запознаване с целите и методите на изследване, и след даване на писмено информирано съгласие за участие.

Дефиниране на тромботично събитие: интраваскуларно образуване на кръвен съсирек, в която и да е част на кръвоносната система.

Артериални тромбози:

- Големи: Ишемичен Мозъчен Инсулт, Остър Миокарден Инфаркт, Тромбоза на магистрални артерии
- Малки: Преходни Нарушения на Мозъчното Кръвобращение, Нестабилна Ангина Пекторис

Венозни тромбози:

- Белодробен Тромбеболизъм (БТЕ), тромбози на спланхникуса, илео-феморални и други форми на Дълбока Венозна Тромбоза (ДВТ)

3. Рутинни изследвания. Клинични и биохимични маркери.

3.1. Анамнеза (с оценка на конституционални симптоми) и физикален преглед.

3.2. Вземане на биологичен материал за хематологични, биохимични и молекулярни изследвания.

На всички пациенти и лица от контролна Група 2 е взета 7 мл веноза кръв във вакутейнер, съдържащ ЕДТА (0,084 ml, 15% EDTA, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany). На част от пациентите и контролната група са взети 4 ml венозна кръв във вакутейнери (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) с обем 4,5 ml с 3,2% (0,105 M) натриев цитрат. Вакутейнерите с ЕДТА са съхранявани до 48 часа на температурен режим 4°C, преди екстракцията на ДНК. Вакутейнерите с натриев цитрат са центруфугирани най-късно до 2 часа след вземане на пробата на 2500 оборота за 15 минути, при което на повърхността се отделя кръвната плазма, която може да се съхранява до 6 месеца на температурен режим от -20°C.

- a. Костно-мозъчна биопсия за хистологична диагноза и оценка: фиксация в неутрален формалин, декалцинация, включване в парафиново блокче, стандартно оцветяване с хематоксилин-еозин, оцветяване по Gomori за определяне степента на костно-мозъчна фиброза.
- b. Абдоминална ехография с определяне размера на слезка.

3.3. Биологични и клинични маркери

- а) В периферна кръв: левкоцитен брой, тромбоцитен брой, еритроцитен брой, хематокрит, серумно ниво на ЛДХ, Jak^{V617F}, Фактор V Leiden (FVL), мутация G20210A в протромбиновия ген (PR G20210A), мутация C677T в гена на ензима метилентетрахидрофолат редуктаза (MTHFR C677T) и полиморфизъм-алел P1A2 в гена на тромбоцитния гликопротеинов рецептор Пб/IIIa (P1A2/GPIIIa).
- б) В костен мозък: определяне на целуларитета, степента на фиброза, MVDCD34+

4. Критерии за поставяне на диагноза и използвани прогностични скали

Критериите за диагноза значително се променят през годините. Включените пациенти са диагностицирани съобразно СЗО критериите за съответния период от време. В таблиците 10 и таблица 11 са представени критериите за диагноза на Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия, съобразно WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues в изданията от 2001; 2008 и 2016 години.

Рискова стратификация

Пациентите са оценени по общоприетата в момента рискова скала за развитието на тромбози по показатели възраст и анамнеза за прекарана тромбоза, и сърдечно-съдово заболяване..

*Таблица 2 Настояща Рискова скала за развитие на тромбози при ПВ и ET
ELN{Barbui, 2011 #5178}*

Категория	1. Възраст≥60 год 2. Анамнеза за Тромбоза	1. Артериална хипертония 2. Diabetes Mellitus 3. Хиперхолестеролемия 4. 4. Тютюнопушене
Нисък риск	Не	Не
Междинен	Не	Да
Висок риск	Да	

5. Специфични методи на изследване

5.1 Имунохистохимия. Използван бе индиректен имунопероксидазен метод за имунохистохимичен анализ с помощта на mini KIT high Ph DAKO K8024.

5.1.1 Антителата, реактивите за оцветяване са използвани в готови работни концентрации

Използвани са следните антитела: Anti-CD34, Антителата са производство на *DAKO*.

Негативни контроли: При негативните контроли, вместо първичното антитяло, срези от използваните парафинови блокчета се инкубират с нормален неимунен серум

5.1.2. Подготовка на биопсичните материали за имунохистохимия.

Биопсичните материали (фиксиращи в неутрален формалин и включени в парафинови блокчета) бяха нарязани на срези с дебелина 5 микрона и поставени върху силанизирани стъкла.

- . Депарафинизацията се осъществи в низходяща редица от алкохоли, както следва: Ethanol 100% 3 мин., Ethanol 90% 3 мин., Ethanol 80% 3 мин., Ethanol 70% 3 мин., Xylol 3 x 10 мин. След това срезите се измиха с течаща вода и се поставиха в дестилирана вода.

- Антигенно разкриване: разкриването на антигените се осъществи с предварително загрят до 65°C En Vision FLEX Target Retrieval Solution (работен разтвор) в PT Link контейнер, като срезите бяха инкубирани за 20 мин. при температура 97°C и pH=9. След охлаждане пробите бяха промити на стайна температура с измиващ буфер FLEX Wash Buffer (20x) за 1-5 минути

5.1.3. Имунохистохимичен протокол.

с пероксидазен блокиращ разтвор (3% H₂O₂) за 5 минути на стайна Срезите бяха оцветени по FLEX протокол, като за всички стъпки се използва влажна камера.

- Инкубация температура за блокиране на ендогенната пероксидазна активност.
- Изплакване с измиващ буфер за 5 мин.
- Инкубация с първичното антитяло Anti- CD34 с разреждане за 20 мин. на стайна температура
- Промиване с измиващ буфер за 2 x 5 мин. на стайна температура

Таблица 3 Критерии за диагноза Полицитемия Вера

	WHO 2001	WHO-2008	WHO 2016	
Големи критерии	A ₁	Увеличена еритроцитна клетъчна маса (ЕКМ>25% от No или Hg>185 g/l мъже Hg>165 g/l жени	Hg>185 g/l мъже Hg>165 g/l жени или други доказателства за увеличена ЕКМ	Hg>165 g/l мъже Hg>160 g/l жени или Hct>0,49% мъже Hct>0,48% жени или увеличена ЕКМ
	A ₂	Липсват причини за вторична еритроцитоза: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Фамилна еритроцитоза ✓ Хипоксия: (a pO₂≤92%) ✓ Хемоглобинози ✓ Неадекватна Tu Epo 	Наличие на Jak ^{V617F} или Jak exon 12	Панмиелоza с плеоморфни Mgc
	A ₃	Спленомегалия		Наличие на Jak ^{V617F} Или Jak exon 12
	A ₄	Клонални генетични аномалии различни Ph хромозома или BCR/ABL фузионнен ген в клетките на костния мозък		
	A ₅	Ендогенно еритроидно колони-образуване in vitro		
Малки критерии	B ₁	Тромбоцитоза>400x10 ⁹ /l	Панмиелоza	Субоптимално Epo ниво
	B ₂	Левкоцитоза>12x10 ⁹ /l	Серумен Epo<норма	
	B ₃	Панмиелоza	Образуване на ендогенни еритроцитни колони in vivo	
	B ₄	Ниско Epo ниво		
Диагноза	A ₁ +A ₂ +всеки друг А или A ₁ +A ₂ +всеки два В	A ₁ +A ₂ +В или A ₁ +два В	3 големи критерия или първите 2 големи + малък критерий	

Таблица 4 Критерии за диагноза Есенциална Тромбоцитемия

		WHO 2001	WHO-2008	WHO 2016
Големи критерии	Позитивни критерии	1. $PLT \geq 600 \times 10^9/l$ 2. КМ- с пролиферация на мегакариоцитната редица и увеличени големи зрели мегакариоцити	1. $PLT \geq 450 \times 10^9/l$ 2. КМ с пролиферация на мегакариоцитната редица и увеличени големи зрели мегакариоцити. Няма сигнификантно олевяване на неутрофилните гранулоцити или еритропоеза.	1. $PLT \geq 450 \times 10^9/l$ 2. КМ биопсия с пролиферация на мегакариоцитната редица и увеличени големи зрели мегакариоцити, с хиперлобулирани ядра. Много рядко слабо (grade I) увеличение на ретикулина.
	Критерии за изключване	1. Няма данни ва ПВ 2. Няма данни за ХМЛ 3. Няма данни за ИМФ 4. Няма данни за МДС 5. Няма данни за реактивна тромбоцитоза вследствие на: ✓ подлежаща инфекция ✓ подлежаща неоплазма ✓ предходна спленектомия	3. Няма WHO критерии за ПВ, ПМФ, VCR-ABL1+ХМЛ или МДС или друга миелодина неоплазия. 4. Наличие на JAK2 ^{V617F} или друг клонален маркер или при липса на JAK2 ^{V617F} без данни за реактивна тромбоцитоза.	3. Няма WHO критерии за ПВ, ПМФ, VCR-ABL1+ХМЛ или МДС или друга миелодина неоплазия 4. Наличие на JAK2, CARL, или MPL мутация.
Малки критерии				1. Наличие на клонален маркер или липса на доказателства за реактивна тромбоцитоза
Диагноза		A ₁ +A ₂ +всеки друг А или A ₁ +A ₂ +всеки два В	Необходими са всички критерии	4 големи критерия или първите 3 големи + малък критерий

- Инкубация с маркиран полимер HRP за 20 мин. на стайна температура
- Промиване с измиващ буфер за 3 x 5 мин. на стайна температура
- Инкубация на срезове с хромоген DAB пероксидазен разтвор за 2x 5 мин., при непрекъснато микроскопиране
- Промиване с буфер за 2 мин
- Изплакване с дестилирана вода за 2 мин.
- Контраоцветяване с Mayer's hematoxylin за 5 мин.
- Изплакване на пробите с дестилирана вода за 5 мин.
- Дехидриране в обратен възходящ ред етанол 70%, етанол 80%, етанол 90%, етанол 100% със същата продължителност както при депарафинизацията.
- Поставяне в монтираща среда.

Таблица 5 Резултати на MVD CD34+ контроли.

Контроли CD34+ microvessel density MVD	I поле	II поле	III поле	IV поле	V поле	Средна стойност
23673/16	10	9	11	12	13	11
23672/16	14.5	20.5	13	10	11.5	13.9
19846/16	9	7.5	8.5	9.5	12	9.3
21072/16	7.5	10	8	11	11	9.5
22351/16	20.5	17	14.5	12.5	18	16.5
24165/16	10	14	9	8	11	10.4
1879/16	13	9.5	13	11	101	11.8
19445/16	13.5	12	11.5	7.5	2	10.8
19565/16	16	18	15	15.5	12.5	15.4
19550/16	13	10.5	10	13	15	12.3

5.1.4. Нива на експресия на CD34 и интерпретация на резултатите

Методика на оценяване:

Оценяването е независимо осъществено от двама патолога на голямо увеличение (x 400). Изследвани са 5 последователни полета, като са изброени съдове с формиран съдов лумен, както и малки съдчета с наличие на повече от 3 ендотелни клетки. Изчислявана е средната стойност от всички 5 полета.

Характеристика на използваното антитяло – FLEX, Monoclonal Mouse anti-human CD34 class II, clone QBEnd 10, Ready-to-use

Тъканни проби:

Пациентите са подбирани така, че да имат добре запазени костномозъчни биопсични проби, подходящи за допълнителни оцветявания. Парафиновите срези са оцветени с HE и Gomori. Хистопатологичната диагноза на MPNs е извършена на базата на СЗО. Парафинови срези (5 μm дебели) са обработени с пероксидаза-антипероксидазна техника. За визуализация на MVD е използвано моноклоналното антитяло MoaHuMo, а Hu CD34 клас II клон QBEnd (Dako) беше използвано за визуализация на MVD. Съдовете са изброявани на увеличение 400 (10 x 40) в полетата на най-висока плътност. От всеки пациент бяха оценени по пет зрителни полета. MDV е определяна като средна стойност от всички измервания. Данните са представени като средни стойности и стандартно отклонения. Статистическото сравнение е осъществено чрез Student's тест. $P < 0.05$ беше прието за статистически значима разлика.

5.2. Изследване на соматична мутация на JAK2^{V617F} в периферна кръв

5.2.1. Изолиране на ДНК от кръвни левкоцити

Материалът за изследване е цялостна кръв, взета с антикоагулант EDTA. Изолиране на ДНК от левкоцити от пълна кръв е извършвана чрез Thermo Scientific™ Viral DNA/RNA Purification Kit на фирмата Thermo Scientific според протокола на производителя от 200 μl венозна кръв:

1. 200 μl венозна кръв се смесват с 50 μl протеиназа К (PK) и 200 μl лизиращ буфер (LS) и се инкубират при температура 56° C за 15 минути, след което се прибавят 300 μl абсолютен етанол и се инкубира за 3 минути на стайна температура.
2. Лизатът се натоварва върху предварително кондиционирана с 50 μl буфер CPL центрофужна колонка (SC) и се центрофугира за 1 минута при 6000 \times g, като преминалата през колонката течност се изхвърля и колонката се поставя в нова празна 2 ml епруветка.
3. Колонката се промива с буфер WB1 – поставят се 700 μl буфер WB1 и колонката се центрофугира за 1 минута при 6000 \times g, като преминалата през колонката течност се изхвърля и колонката се поставя в нова празна 2 ml епруветка.

4. Колонката се промива двукратно с буфер WB2 – поставят се 500 μ l буфер WB2 и колонката се центрофугира за 1 минута при 6000 \times g, като преминалата през колонката течност се изхвърля и колонката се поставя в нова празна 2 ml епруветка.
5. Колонката се центрофугира за 3 минути при скорост 16000 \times g за да се гарантира липсата на замърсяване от буфер WB2.
6. Колонката се поставя в нова епруветка 1,5 ml и ДНК се елуира като 50 μ l предварително загрят до 56° C елуиращ буфер (EL) се пипетира директно върху мембраната на колонката, инкубира се за 2 минути и се центрофугира за 1 минута при 13000 \times g. Изолираната ДНК се съхранява при температура –80° C до следващите стъпки от анализ ДНК анализ.
7. Методи на изолиране:

Принцип на изолиране на ДНК по метода на солевата екстракция (Miller и сътр., 1988),

Принцип: Изолирането на ДНК от венозна кръв протича в няколко последователни етапа, целящи лизис на ядрените кръвни клетки и премахване на белтъците от ДНК молекулата, участващи в изграждането на компактната ѝ структура.

Основни етапа на изолиране

- Отстраняване на еритроцитите, чрез лизирането им в хипотоничен буфер
- Лизиране на ядрата на белите кръвни клетки и разграждане на хистоните чрез протеолиза
- Утаяване (изсолване) на белтъците чрез наситен разтвор на NaCl
- Преципитиране на пречистената ДНК в абсолютен алкохол

Полимеразна верижната реакция (PCR).

Използвани са протоколи за амплификация на ДНК региони за изследване на FVL (rs6025), 20210 G>A (rs1799963) мутация в протромбиновия ген, 677 C>T вариант в MTHFR, PLA1/A2 в гена на тромбоцитен гликопротеин IIb/IIIa (rs5918ITGB3),

Определяне носителството на полиморфизми:

Протоколи за изследване носителството

1. Протокол за определяне носителството на полиморфизъм A1/A2 в гена на тромбоцитен гликопротеин IIb/IIIa (rs5918ITGB3)

Принцип. Замяната на Т със С на 1565 позиция в гена на тромбоцитения гликопротеин Пб/Ша води до създаване на рестрикционно място на ензима Msp I. След инкубирането на амплификационни продукти от изследвания ДНК регион с Msp I, алелите, съдържащи мутацията се хидролизират от ензима и остават с по-малка дължина, сравнено с тези ДНК фрагменти, несъдържащи мутацията. Визуализацията на резултата се извършва след електрофоретично разделяне на ДНК фрагментите върху 3.5% агарозен гел

2. FVL (rs6025),
3. 20210 G>A (rs1799963) мутация в протромбиновия ген
4. 677 C>T вариант в MTHFR.

Протоколите за амплификация на PCR продуктът са модифицирани по отношение количеството на използвани праймери (Alpha DNA, Quebec, Canada), Taq полимераза (AB gene, Epsom, UK, Genet Bio, Nonsan, Korea) и буфер (AB gene, Epsom, UK, Genet Bio, Nonsan, Korea), поради използвани реактиви от други фирми производители. По същата причина са променени времето на протичане на трите основни етапа на PCR, температурите на анилинг на праймерите, както и броя на циклите на PCR.

6. Статистически методи

Данните бяха въведени и обработени със статистическия пакет SPSS 19. (SPSS Inc. Chicago, Illinois). За ниво на значимост, при което се отхвърля нулева хипотеза бе избрано $p < 0,05$. Бяха приложени следните методи:

1. Дескриптивен анализ – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване.
2. Кростабулация – за търсене на връзка между категорийни признаци.
3. Графичен анализ – за визуализация на получените резултати.
4. Тест χ^2 - за проверка на хипотези за наличие на връзка между категорийни променливи.
5. Екзактен тест на Фишер - за проверка на хипотези за наличие на връзка между категорийни променливи.
6. Параметричен Т-тест на Студент – за проверка на хипотези за различие между средните аритметични на две независими извадки.
7. ANOVA – за сравняване средните на повече от 2 променливи.
8. Корелационен анализ – за откриване връзка между 2 величини.

РЕЗУЛТАТИ

След първоначалната обработка на данните и преди подаване за статистическа анализ, приехме няколко важни отправни постановки:

1. При оценка на влиянието на молекулярните и стандартни хематологични показатели върху тромботичния процес е необходим диференциран подход при двете заболявания. Затова разделихме болните по диагнози.
2. Обратно, за да оценим въздействието на факторите за вродена тромбофилия или костно-мозъчна ангиогенеза, преценихме, че такава разделяне не е необходимо

Удачно беше формулирането на конкретни групи въпроси които да бъдат подадени за статистическия анализ. Въпросите имаха различна насоченост при двете диагнози и касаеха следното:

- Група 1 Въпроси, свързани с мутационния статус на Jak^{V617F} и тромботични събития
- Група 2 Въпроси, свързани с влиянието на левкоцитозата и тромботични събития
- Група 3 Въпроси относно ефекта върху тромботичните събития на генетичните дефекти за вродената тромбофилия
- Група 4 Въпроси, свързани с влиянието на костно-мозъчната ангиогенеза
- Група 5 Въпроси, свързани с оценка на прогностичната стойност на изследваните показатели

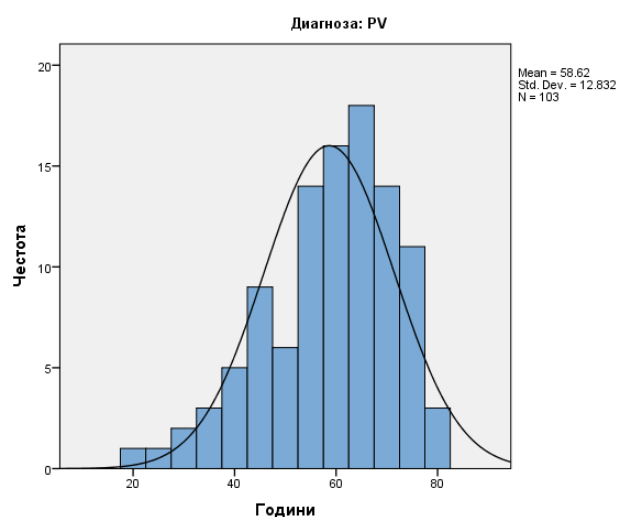
Първичната статистическа обработка ни позволи да групираме и представим демографски, лабораторни и клинични данни на включените пациенти по диагнози (таблица 6). При началния анализ разпределихме пациентите по класическите рискови фактори възраст и анамнеза за прекарани тромботични процеси. Възрастта под или над 60 години, определяна при поставяне на диагнозата, в настоящата рискова скала е независим рисков фактор за развитие на тромбози. При Полицитемия вера средната възраст на изследваните от нас пациенти беше 58,6 години, като при 54/103 от тях (52,4%) възрастта ги определя във високорисковата група. При разпределението по пол 28 са жени (52%) и 26(48%) мъже. С анамнеза за прекарани тромбози са 18 пациента (17%).

Разпределението на болните по диагнози и рискови групи по настоящата скала е показано на таблица 7. Както е показано на таблица 6 в изследваната група болни с Есенциална тромбоцитемия, средната възраст е 57 години, но 52% се определят като високорискови според възрастта им, определена при

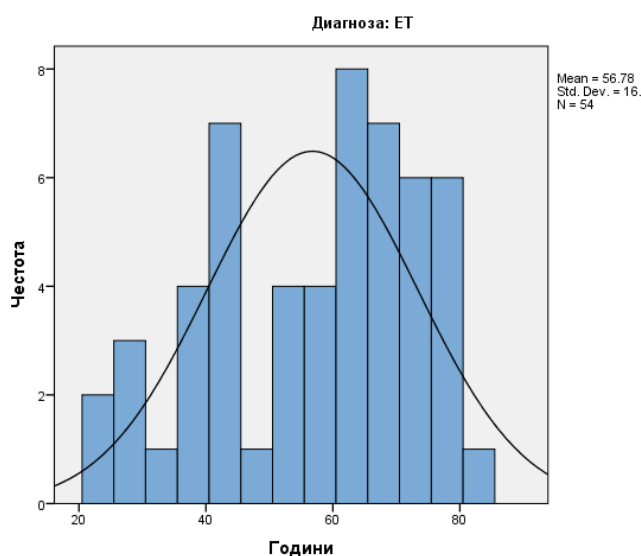
поставяне на диагнозата. От тях 46% са жени и 54% - мъже. Другият независим рисков фактор – анамнеза за прекарано ТС се установява при 6/54 пациента (11%), по-често при жените. Анализът на тромботичните събития, от една страна, ще покаже валидността на общоприетите рискови фактори за конкретната група пациенти, а от друга, ще верифицира събраните данни.

Таблица 6 Разпределение на болните по рискови групи и диагнози

Диагноза	Рискова стратификация			Общо
	Нисък	Интермитентен	Висок	
Есенциална тромбоцитемия	23	1	30	54
Полицитемия вера	33	14	56	103
Общо	56	15	86	157



Фигура 2 Разпределение на болните с ПВ по възраст



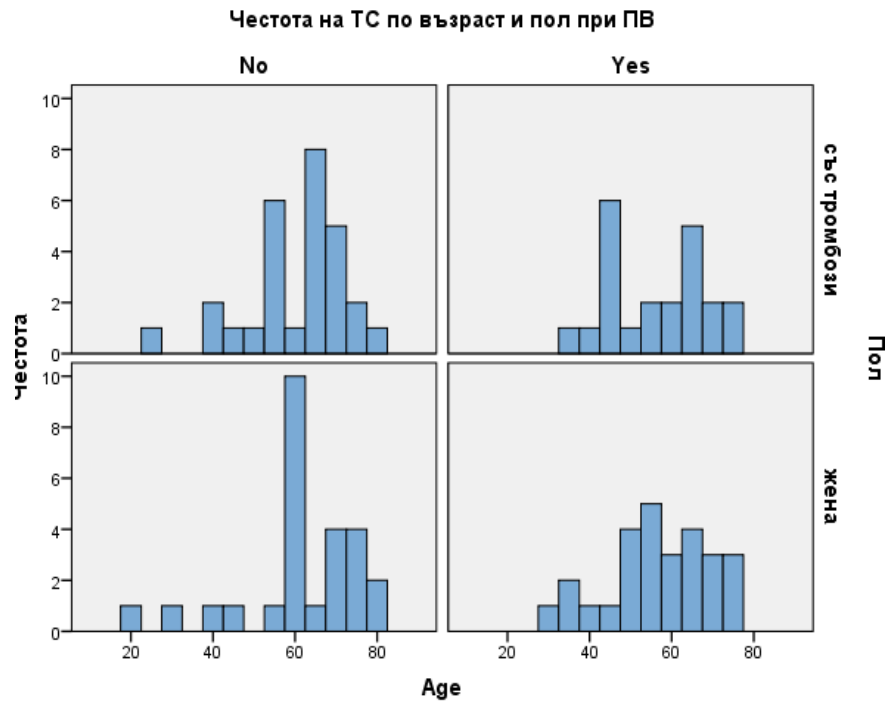
Фигура 3 Разпределение на болните с ET по възраст

Таблица 7 Основни характеристики на болните с ПВ

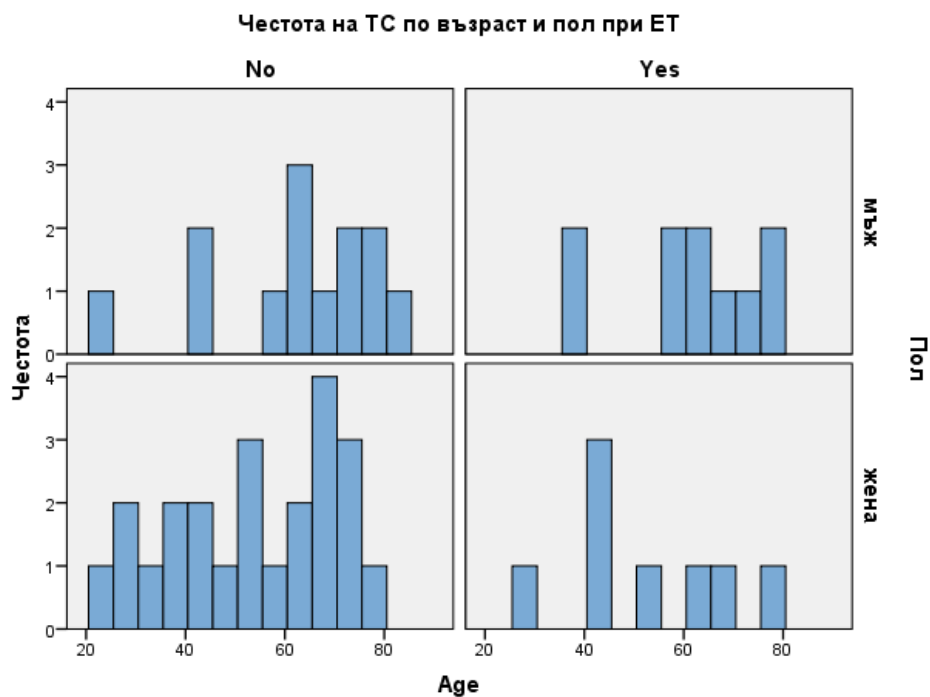
Характеристика	Брой изследвани	Средно	Граници	%
Възраст, години	103	58.6	20-80	
<60 години		49		47,6
≥60 години		54		52,4
Пол	103			
Мъже		50		48,5
Жени		53		51,5
Тромбоцити, брой, x 10⁹/l	103			
< 1000	94			91
>1000	9			9
Тромбоцити, брой, x 10⁹/l	103	538	100-1300	
Хемоглобин, g/l	103	195	155-237	
Хематокрит, l/l	103	0,58	0,46-0,78	
Левкоцити, брой, x10⁹/l	103	12,7	5,0-43,0	
Еритроцити, брой, x10¹²/l	103	7,09	5,0-9,9	
ЛДХ	103	633	239-4021	
Jak2^{V617F}	96			
Неизследвани	7			6.8
Див тип	11			11
Алелен товар<50%	45			47
Алелен товар≥50%	40			42
Конституционални симптоми	103			
Няма	27			26
Леко изразени	28			27
Изразени	48			47
С придружаващи заболявания	42			59
Без придружаващи заболявания	68			41
Палпируема спленомегалия	68			66
Спленомегалия, размери, mm		143x63		

Таблица 8 Основни характеристики на болните с ЕТ

Характеристика	Брой изследвани	Средно	Граници	%
Възраст, години	54	57	23-81	
<60 години		26		48
≥60 години		28		52
Пол	54			
Мъже		23		43
Жени		31		57
Тромбоцити, брой, $\times 10^9/l$	54	1207	532-3367	
< 1000		22		40,7
>1000		32		59,3
Тромбоцити, брой, $\times 10^9/l$	54			
Хемоглобин, g/l	54	140	81-174	
Хематокрит, l/l	54	0,42	0,27-0,56	
Левкоцити, брой, $\times 10^9/l$	54	12,1	4,1-54,2	
Еритроцити, брой, $\times 10^{12}/l$	54	4,89	2,9-7,3	
ЛДХ	54	547	228-1642	
JAK2^{V617F}	54			
Неизследвани		11		20
Див тип		25		46/58
Алелен товар<50%		15		28/35
Алелен товар≥50%		3		6/7
Палпируема спленомегалия	54	27		50
Спленомегалия/размери/m m/	27	90	90-180	



Фигура 4 Разпределение на болните по възраст, пол и ТС. Единствено при жени с ПВ възрастта доказва своето прогностично значение



Фигура 5 Разпределение на болните по възраст, пол и ТС. При ЕТ възрастта не показва самостоятелно прогностично значение за ТС

Група 1 Мутационен статус на Jak^{V617F} и тромботични събития

Честотата на носителството на $Jak2^{V617F}$ е различно при ПВ и ЕТ. При болните с Полицитемия вера интерес представлява съпоставянето на честотата

на хомозиготните форми и степента на левкоцитоза и тромбоцитоза. Основната задача, обаче е пряко изследване на честотата на тромботичните усложнения при различна алелна натовареност. Друг аспект е проучване на ефектите на $Jak2^{V617F}$ върху костно-мозъчната хемопоеза, върху ангиогенезата като модел на съдови промени и търсене на ефект върху тромбогенезата.

Полицитемия вера

$Jak2^{V617F}$ и възраст. При анализ по възраст на болни в Група 1 не установихме съобщаваната от някои автори по-висока честота на хомозиготно носителство при по-възрастни пациенти. Разпределението беше сходно, както е показано на таблица 16.

Таблица 9 Разпределение на болните по $Jak2$ и възраст

Jak2	Възрастова група		Общо
	<60 години	≥ 60 години	
Неизследвани	3 (6,1%)	4 (7,4%)	7 (6,8%)
$Jak2^{WT}$	7 (14,3%)	4 (7,4%)	11 (10,7%)
$Jak2^{V617F}$ алелен товар<50%	21 (42,9%)	24 (44,4%)	45 (43,7%)
$Jak2^{V617F}$ алелен товар≥50%	18 (36,7%)	22 (40,7%)	40 (38,8%)
Общо	49 (47,6%)	54 (52,4%)	103 (100%)

$Jak2^{V617F}$ и пол. При част от пациентите (6,8%) диагнозата е поставена в началния период на набиране на данни (2007 год.) когато по обективни причини молекулярно изследване не е провеждано. Сравнително висок е броят на пациентите с $Jak2^{WT}$ (10,7%), но той съответства на честотата на мутацията, установена в началните проучвания (Schafer 2006) и е напълно обясним с различните диагностични критерии за този период. За разлика от сходните характеристики в разпределението по възраст, установихме по-висока честота на алелно натоварване ≥50% при жени (таблица 17) (26 пациентки (65%) срещу 14 пациента (35%).

Таблица 10 Разпределение на болните по пол и $Jak2$ при ПВ

Jak2	Мъже	Жени	Общо
Неизследвани	5 (10%)	2 (3,8%)	(6,8%)
$JAK2^{WT}$	7 (14%)	4 (7,5%)	11 (10,7%)
$JAK2^{V617F}$ алелен товар<50%	24 (48%)	21 (39,6%)	45 (43,7%)
$JAK2^{V617F}$ алелен товар≥50%	14 (28%)	26 (49%)	40 (38,8%)
Общо	50 (48,5%)	53 (51,5%)	103 (100%)

Пол и тромботично събитие. При събиране на данните установихме наличие на повече от едно тромботично събитие при един и същ болен В

изследваната група намерихме по-висока честота на единично ТС при жени (които са и по-често хомозиготи) и почти двукратно по-висока честота на х2 ТС при мъже.

Таблица 11 Разпределение на тромботичните събития по пол

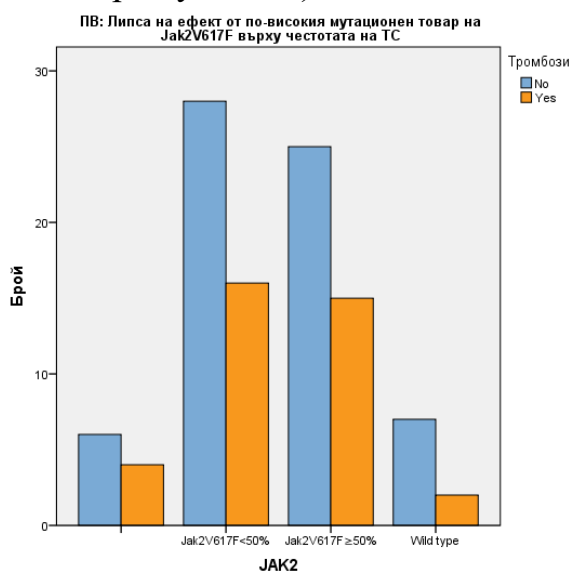
Тромботични събития	Мъже	Жени	Общо
без ТС	32 (54%)/64%	27 (46%)/51%	59 (100%)
х 1 ТС	11 (33%)/22%	22 (67%)/41,5%	33 (100%)
х 2 ТС	7 (64%)/14%	4 (36%)/7,5%	11 (100%)
Общо	50 (48,5%)	53 (51,5%)	103 (100%)

Jak2^{V617F} и тромботично събитие. Проведохме анализ на :

- въздействието на мутационния товар на Jak2^{V617F}. върху общата честота на ТС
- степента на мутационен товар при пациент с х2 ТС

Резултатите не показаха по-висока честота на ТС при по-голям мутационен товар. Пациентите с Jak2^{V617F} $\geq 50\%$ нямат повече ТС от тези с Jak2^{V617F} $< 50\%$ както личи от фигура 16 и таблица 19.

Не намерихме сигнификантна корелация между по-високия брой на тромботични събития и степента на алелно натоварване, като е необходимо да се отбележи малкия брой пациенти (общо 11 с х2 ТС). Все пак се очертава тенденция, според която по-високия алелен товар предизвиква повече тромботични събития (45,5% срещу 36,4%) както е показано на фигура 16.



Фигура 6 Мутационния товар на Jak2^{V617F} не оказва ефект върху честотата на ТС

Общо не се установи сигнификантна разлика в честотата на ТС между групата с Jak2^{V617F} $< 50\%$ и тази с Jak2^{V617F} $\geq 50\%$, (таблица 19), но се установи

по-висока честота ва единично ТС при жени (които са и по-често хомозиготи) и почти двукратно по-високата честота на x2 ТС при мъже.

Таблица 12 Брой и разпределение на тромботични събития в зависимост от мутационния товар.

Jak2^{V617F}	без ТС	x1 ТС	x2 ТС
Неизследвани	4 (6,8%)	3 (9,1%)	0
Jak2 ^{V617F} див тип	7 (11,9%)	2 (6,1%)	2 (18%)
Jak2 ^{V617F} алелен товар<50%	24 (40,7%)	17 (51,5%)	4 (36,4%)
Jak2 ^{V617F} алелен товар≥50%	24 (40,7%)	11 (33,3%)	5 (45,5%)
Общо	59 (57%)	33 (32%)	11 (10%)

Jak2^{V617F} и спленомегалия. При обработка на данните за размерите на далака обособихме три групи както е показано на таблица 20.

Таблица 13 Групиране по степен на спленомегалия

Групи	Ехографски надлъжен размер, mm
Група без спленомегалия	<120 mm
Група с умерена спленомегалия	между 120-150 mm
Група с масивна спленомегалия	>150 mm

От всички изследвани болни, 42 (41%) бяха в групата без спленомегалия. От тях 23 (55%) бяха хетерозиготи по Jak2^{V617F}, за разлика от 10 (24%) хомозиготни носители. От останалите 61(59%) пациента със спленомегалия, хетерозиготи са 22 (36%), а хомозиготи - 30 (49%). В групата с масивната спленомегалия хомозиготно носителство се установява в 62,5%, за разлика от хетерозиготните форми при 25%.

Таблица 14 Разпределение на болните в зависимост от JAK^{V617F} и размери на лиен

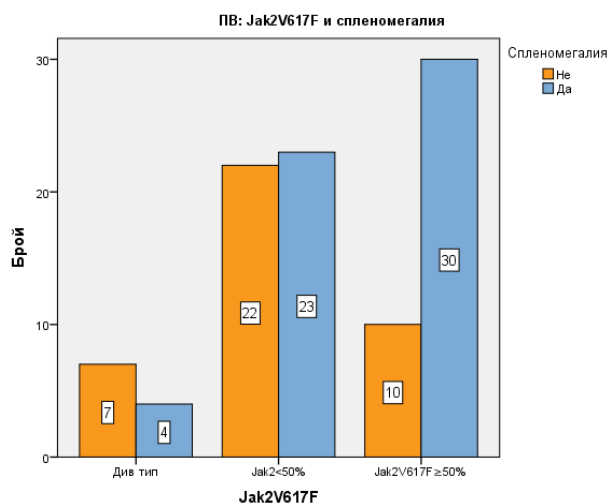
	Група без спленомегалия	Група с умерена спленомегалия 120-150 mm	Група с масивна спленомегалия ≥ 150 mm
Неизследвани	2/5%	2/5%	3/12,5%
Jak^{WT}	7/16%	4/11%	0
Jak^{V617F} алелен товар<50%	23/55%	16/43%	6/25%
Jak^{V617F} алелен товар>50%	10/24%	15/41%	15/62,5%

Ако разгледаме разпределението на болните по-общо по признака наличие на спленомегалия установяваме сигнификантна разлика в честотата ѝ, която при wild type е 36%, при $Jak2^{V617F}$ алелен товар<50% - 49%, а при Jak^{V617F} алелен товар>50% - 75% (в таблица 23) (Pearson $p < 0,03$).

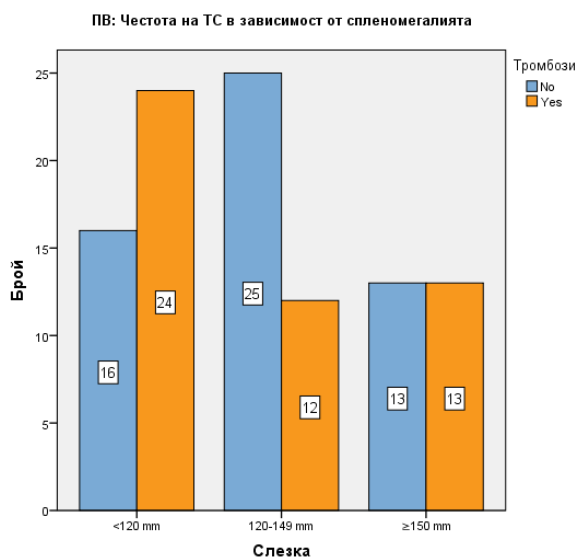
Таблица 15 Връзка на мутационния товар на $Jak2^{V617F}$ и спленомегалията.

	Без спленомегалия	Спленомегалия ≥ 120 mm
Неизследвани	2/29%	5/71%
$Jak2$ Див тип	7/64%	4/36%
$Jak2^{V617F}$ алелен товар<50%	23/51%	22/49%
$Jak2^{V617F}$ алелен товар $\geq 50\%$	10/25%	30/75%

Спленомегалия и тромботични събития. Както е показано на фигура 18 степента на спленомегалия не влияе върху честотата на тромботични събития. При масивна спленомегалия броят на пациентите със и без тромботични събития е еднакъв, което говори че нарушената регионална хемодинамика сама по себе си няма основно значение за развитието на тромботични събития. Обратно е при групата пациенти без спленомегалия при които други фактори водят до тромботични събития и честота на тромбозите е значителна.



Фигура 7 $Jak2^{V617F}$ и размери на далака. При $Jak^{V617F} > 50\%$ в $\frac{3}{4}$ от пациентите има спленомегалия.



Фигура 8 Спленомегалията няма значение за честотата на тромботичните събития при ПВ.

Есенциална тромбоцитемия

От пациентите с Есенциална тромбоцитемия (общо 54) при 18 (33%) е регистрирано тромботично събития, като 50% са над 60 години и 50% са под 60 години. В групата без тромботични събития 17 (47%) са под 60 години и 19 (53%) са над тази възраст. Нашият анализ не успя да потвърди възрастта като независим прогностичен фактор за развитието на тромбози-таблица 23.

Другият рисков показател - прекарани тромбози също бе анализиран, но поради ретроспективния едновременен характер на проучването, не би могъл да бъде интерпретиран коректно.

Таблица 16 Тромботични събития и възраст при ЕТ

Възраст	Тромбози		Общо
	Не	Да	
брой на възраст <60год	17	9	26
% във възрастова група	65%	35%	100%
% в тромбози	47%	50%	48%
брой на възраст ≥60 год	19	9	28
% във възрастова група	68%	32%	100%
% в тромбози	53%	50%	52%
Общо	36	18	54

Тромботични събития и рискова стратификация. На таблица 24 е дадена рисковата стратификация при поставяне на диагнозата и установените ТС. Интересно е да се отбележи, че във високорисковата група 19 (63%) от пациентите нямат ТС при среден период на наблюдение 5,5 години (от 0-13 години), а 11 (37%) имат, докато в нискорисковата група 7 (30%) имат ТС, а 16 (70%) нямат. В заключение, общоприетият в момента стратифициращ модел приложен при изследваната група болни няма коректна прогностична стойност.

Таблица 17 Тромботични събития и рискова статификация при есенциална тромбоцитемия

Рискова стратификация	Тромбози		Общо
	Не	Да	
Нисък	16 (70%)	7 (30%)	23 (43%)
Интермедиерен	1	0	1 (2%)
Висок	19 (63%)	11 (37%)	30 (55%)
Общо	36 (67%)	18 (33%)	54

Jak2^{V617F} при ЕТ. В групата от 54 пациента с Есенциална тромбоцитемия, носителство на Jak2^{V617F} се установи при 18 (42%), от които при 3 (7%) то е хомозиготно. При 11 пациента (21%) молекулярно изследване не е проведено.

Jak2^{V617F} и възраст. Разпределението на пациентите с ЕТ според мутационния товар и възраст е сходно, като е необходимо да отбележим, че общият им брой е малък. Хетерозиготните носители на възраст <60 год. са 8 (31%), а тези на ≥60 год са 7 (25%). Хомозиготен е само 1 носител (4%) на

възраст под 60 год. и 2 (7%) над 60 години, като и тримата до момента нямат регистрирани тромботични събития.

Таблица 18 Разпределение на болните по $Jak2^{V617F}$ и възраст при Есенциална тромбоцитемия.

$Jak2^{V617F}$	Възрастова група		Общо
	<60 години	≥ 60 години	
Неизследвани	3 (11,5%)	8 (28,6%)	11 (20,4%)
$Jak2^{V617F}$ див тип	14 (53,8%)	11 (38,3%)	25 (46,3%)
$Jak2^{V617F}$ алелен овар<50%	8 (30,8%)	7 (25%)	15 (27,8%)
$Jak2^{V617F}$ алелен овар≥50%	1 (3,8%)	2 (7,1%)	3 (5,6%)
Общо	26 (48,1%)	28 (51,9%)	54 (100%)

$Jak2^{V617F}$ и пол. При Есенциалната тромбоцитемия се установи преобладаване на женски пол 10 (23%) пациентки срещу 5 (11%) мъже при хетерозиготното носителство на $Jak2^{V617F}$ и таблица. 26. Необходимо е да се отбележи че броя на неизследвани мъже е по-голям.

Таблица 19 Разпределени на болните с Есенциална тромбоцитемия по пол и $Jak2^{V617F}$

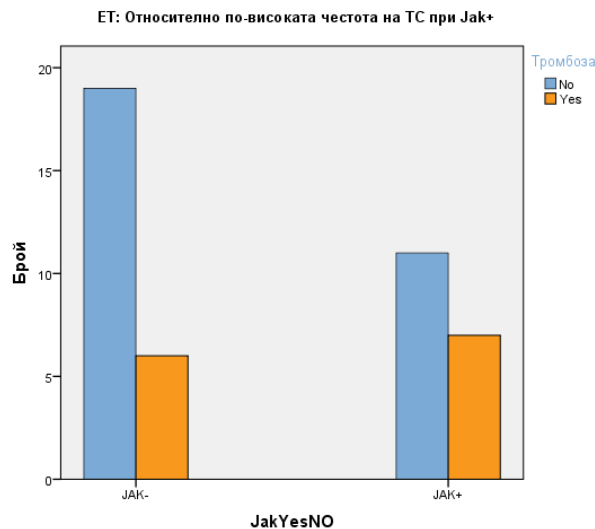
$Jak2^{V617F}$	Мъже	Жени	Общо
Неизследвани	7 (30,4%)	4 (12,9%)	11 (20,4%)
$Jak2^{WT}$	10 (43,5%)	15 (48,4%)	25 (46,3%)
$Jak2^{V617F}$ алелен овар<50%	5 (21,7%)	10 (32,3%)	15 (27,8%)
$Jak2^{V617F}$ алелен овар≥50%	1 (4,3%)	2 (6,5%)	3 (5,6%)
Общо	23 (42,6%)	31 (57,4%)	54 (100%)

$Jak2^{V617F}$ и ТС. На таблица 27 и фигура 19 са посочени резултатите от анализа за тромботични събития при наличието на $Jak2^{V617F}$. Както беше отбелязано при 11 пациента (21%) молекулярно изследване не е проведено. В групата на изследваните болни, в подгрупата без тромботични събития, липса на мутация се установява при 19 (61%). В подгрупата с едно прекарано ТС носителство на $Jak2^{V617F}$ се установява при 6 пациента (60%). Интересно е, че при 3 пациента има две тромботични събития, като единия не е изследван за молекулярна аномалия, а двама са без мутация, което говори за друга водеща причина за поява и развитие на тромботичните усложнения.

В заключение, налице е тенденция за по-често развитие на тромботични събития при $Jak2^{V617F}$ ET пациенти в сравнение с тези, неносители на мутацията. Въпреки малкия брой болни, тази тенденция потвърждава въвеждането на $Jak2^{V617F}$ като рисков фактор в *IPSET thrombosis* (Rumi and Cazzola 2017).

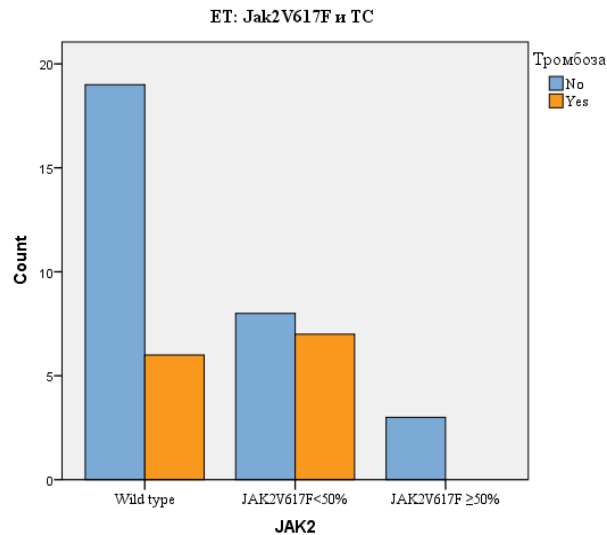
Таблица 20 Брой ТС в зависимост от мутационния товар при Есенциална тромбоцитемия.

ЈАК2	без ТС	х1 ТС	х2 ТС	Общо
Неизследвани	7	3	1	11(21%)
ЈАК2^{WT}	19 (61%)	4(40%)	2	25(46%)
ЈАК2^{V617F}	12 (39%)	6 (60%)	0	18(33%)
Общо	31 (70%)	10 (24%)	2(6%)	54(100%)



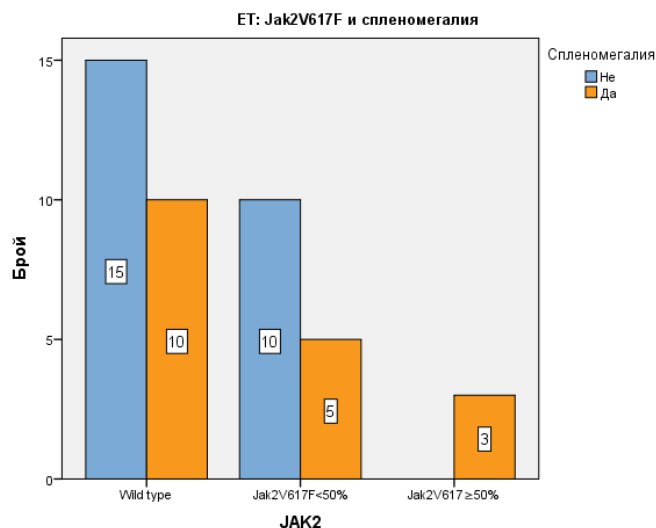
Фигура 9 ET Относително по-висока честота на ТС при мутацията в сравнение с $Jak2^{WT}$

При анализ на степента на мутационния товар и честотата на ТС при 3 пациенти установихме $Jak2^{V617F} \geq 50\%$ без да имат прекарано тромботично събитие. Тенденцията за нарастване на ТС при наличие на $Jak2^{V617F}$ обаче се потвърди –фигура 20.



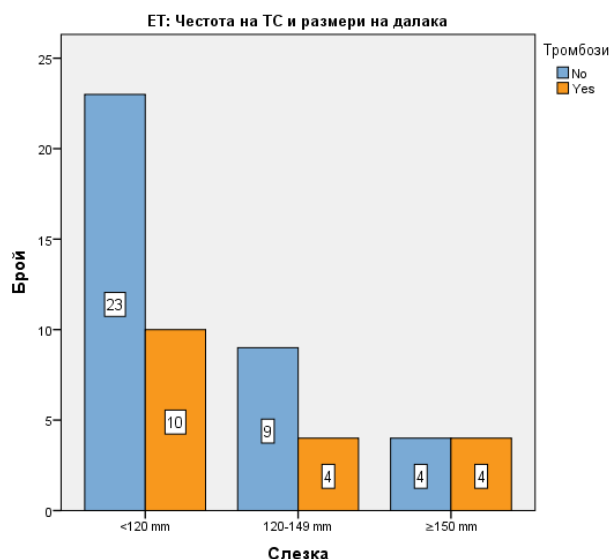
Фигура 10 При $Jak2^{WT}$ относителния дял на ТС е малък, Наличието на $Jak2^{V617F}$ води до увеличаване на ТС. Носителите на $Jak2^{V617F} \geq 50\%$ все още не са развили ТС.

Jak2^{V617F} и спленомегалия. В анализираната група пациенти с ЕТ, установихме значителна спленомегалия при $Jak2^{WT}$, по-малка честота при $Jak2^{V617F} < 50\%$ и 100% при $Jak2^{V617F} \geq 50\%$. Броя на пациентите не е висок за да се правят статистически обобщения, но по-високия мутационен товар вероятно води в по-висок процент до спленомегалия-фигура 21.



Фигура 11 При носителство на $Jak2^{V617F} \geq 50\%$ всички болни имат спленомегалия.

Спленомегалия и тромботични събития. При ЕТ с нарастване на степента на спленомегалия се установява и по-висока честота на тромботични събития-фигура 22. Това поставя въпроса за причините, механизмите и следствията от спленомегалията при ЕТ.



Фигура 12 ET: Относително увеличаване честотата на ТС при нарастване степента на спленомегалия.

Група 2 Въпроси, свързани с влиянието на левкоцитозата и ТС

Полицитемия вера

Общо при 103 изследвани пациента с Полицитемия вера са регистрирани 44 тромботични събития, като болните отново са разпределени съответно в 3 групи: без ТС, с х1 ТС, с х2 ТС-(таблица 28).

Таблица 21 Полицитемия Вера: влияние на левкоцитния брой върху честотата на тромботични.

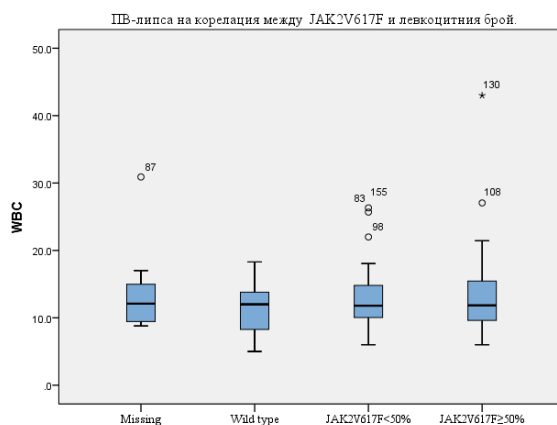
Брой ТС	Левкоцити		Стандартна девиация	Range
	средно $\times 10^9/l$	Пациенти		
0	12.109	59	4.1517	22.1
х 1	12.322	33	4.0283	19.3
х 2	13.349	11	5.5773	20.3
Общо	12.310	103	4.2523	22.1

Както се вижда от проведеня анализ, левкоцитният брой в трите групи пациенти почти не се различава. Левкоцитозата установена при поставяне на диагнозата, макар и да дава представа за индивидуалното протичане и биологичната характеристика на заболяването, не определя по-висока честота на тромботични събития в изследваната група пациенти. Другото очакване за по-изразена левкоцитоза при $Jak2^{V617F}$ алелен товар $\geq 50\%$ също не се потвърждава от проведеня от нас анализ (таблица 29 и фигура 23).

Таблица 22 $Jak2^{V617F}$ и левкоцитен брой

$Jak2^{V617F}$	Левкоцити средно $\times 10^9/l$	Пациенти	Стандартна девиация	Range
Неизследвани	11.520	7	2.8502	8.2
Wild type	11.344	11	3.9127	13.3
$Jak2^{V617F}$ алелен товар <50%	12.606	45	4.3776	20.3
$Jak2^{V617F}$ алелен товар $\geq 50\%$	12.380	40	4.4737	21.1

Освен прицелната зависимост, между левкоцитния брой и ТС са изследвани и други значими параметри посочени в таблица 30. В конкретната група пациенти не се установява корелация между левкоцитния брой и броя ТС, типа им (артериални и венозни), вида на ТС (ОМИ, ИМИ, тромбоза на вена порте, БТЕ), животозастрашаващи или не. Не може да се установи корелация и с пола и възрастовата група $<60 \geq$ години.

Фигура 13 Липса на корелация между $Jak2^{V617F}$ и левкоцитния брой при ПВ.

Изключение е установяването на левкцитозата (Лев= $13,08 \pm 4,4 \times 10^9/l$) при болните със спленомегалия за разлика от нормалния левкоцитен брой при болните без спленомегалия (Лев= $11,17 \pm 3,7 \times 10^9/l$). Тук се установява сигнификантна корелациона зависимост. (Anova $p=0,024$) - таблица 30.

Таблица 23 Спленомегалия и левкоцитен брой при ПВ

лиен	Левкоцити $\times 10^9/l$	Пациенти	Стандартна девиация	Range
Нормален	11.178	42	3.7853	21.3
Увеличен	13.089	61	4.4085	20.7
Общо	12.310	103	4.2523	22.1

Есенциална Тромбоцитемия

Левкоцитоза и тромботични събития. При 54 изследвани пациента с Есенциална тромбоцитемия и регистрирани 16 тромботични събития, разпределени съответно в 3 групи (без ТС, с х1 ТС, с х2 ТС), бяха анализирани стойностите на левкоцитния брой за оценка прекия ефект на левкоцитозата върху ТС (табл. 33). От получените данни не се установи връзка на левкоцитния брой с честотата или броя на ТС.

Таблица 24 Есенциална тромбоцитемия: влияние на левкоцитния брой върху честотата на ТС

Брой ТС	Левкоцити		Стандартна девиация	Range
	средно	Пациенти		
0	11.518	38	5.8558	30.0
х 1	10.920	13	3.1292	8.6
х 2	8.977	3	4.2729	8.1
Общо	11.233	54	5.2168	30.9

Осъществихме допълнителен анализ за оценка ефекта на левкоцитозата в групата на Jak2^{V617F} пациента с ЕТ, посочен на таблица 34. Общо от 18 пациента 12 са без ТС и стойност на Лев=11.635 x10⁹/l и 6 с ТС и Лев=10.512.

В заключение, в нашето проучване не се установи връзка между честотата и/или броя на тромботични събития и величината на левкоцитния брой при пациентите с Есенциална тромбоцитемия.

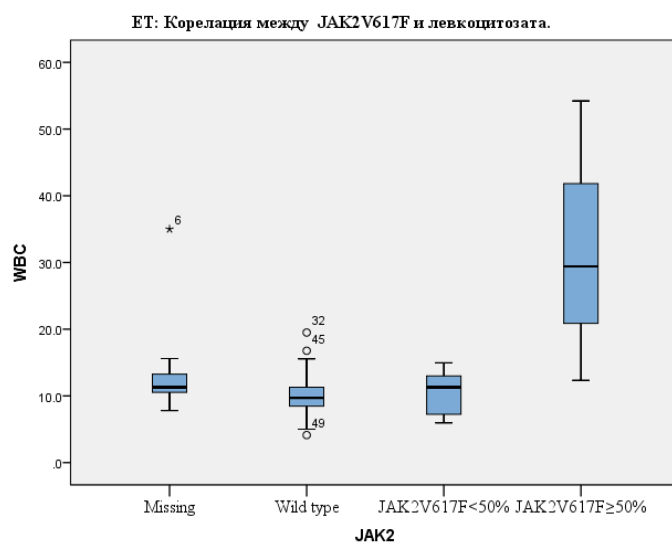
Таблица 25 ЕТ: влияние на левкоцитния брой върху честотата на ТС при Jak2^{V617F} пациенти

Брой ТС	Левкоцити средно x10 ⁹ /l	Пациенти	Стандартна девиация
0	11.635	12	6.4645
х 1 ТС	10.512	6	3.1886
х 2 ТС		0	
Общо	11.261	18	5.5070

За разлика от Полицитемия вера, при Есенциалната тромбocyтeмия хомозиготното носителство на $Jak2^{V617F}$ води до левкоцитоза (Лев=15.65 x 10⁹/l), в сравнение с $Jak2^{WT}$ (Лев=10.16 x 10⁹/l), като тази разлика е статистически значима (Anova p=0.004) (табл. 35).

Таблица 26 Мутационен товар и левкocитен брой при Есенциална тромбocyтeмия

JAK2 ^{V617F}	Левкоцити x10 ⁹ /l	Пациенти	Стандартна девиация
Неизследвани	13.621	11	7.38
JAK2 ^{WT}	10.162	25	3.47
JAK2 ^{V617F} алелен товар <50%	10.381	15	3.12
JAK2 ^{V617F} алелен товар ≥50%	15.657	3	12.43
Общо	11.235	54	5.21



Фигура 14 Наличие на корелация между $Jak2^{V617F} \geq 50\%$ и левкоцитния брой при E

Група 3 Въпроси относно ефекта на генетичните дефекти за вродената тромбocyфия върху тромботичните събития при пациентите с ПВ и ET

При пациентите от Група 2 (от Клиника по Хематология при УМБАЛ „Д-р Георги Странски“-Плевен) освен рутинните кръвни показатели изследвахме наличието на носителство на факторите за вродена тромбocyфия, като сравнихме резултатите с тези на контролната група от здрави лица. При 20 от

общо 42 изследвани пациенти с Есенциална тромбоцитемия и Полицитемия вера (47,6%) установихме наличие на поне един от изследваните маркери за вродена тромбофилия.

В група от 112 здрави контроли, генетични маркери за тромбофилия доказахме в 32 случая или 28.57% ($p=0.04$; OR-2.27) (таблица 36). Тази разлика е значима.

При подгруповия анализа по диагнози по-висока честота на факторите за вродена тромбофилия наблюдавахме и при двете заболявания: ЕТ (50%; $p=0.10$; OR-2.50), ПВ (45.45%; $p=0.19$ OR-2.28). При анализа по фактори за вродена тромбофилия, представен в таблица 37, установихме значителна хетерогенност. За FVLeiden не намерихме значима разлика в честотата, спрямо контролите. Той беше установен при 2/42 (4.75%) от Група 2 и при 7/112 (6.25%; OR-1.25) от контролите. Тези честоти са сходни, очаквани и в рамките на установените за кавказката раса и географския регион. Всички носители на FVLeiden бяха хетерозиготи. Мутация в гена на протромбина (PR G20210A) беше открита при 4/42 (9.52%) от Група 2 и при 3/112 (2.68%) от контролите ($p=0.17$; OR-3.82). И в двете групи тя беше в хетерозиготно състояние. Анализът по диагнози показва наличието ѝ само при пациентите с Есенциална тромбоцитемия 4/20 (20%; $p=0.009$; OR-9.08), и липсата на дефект при тези, с Полицитемия вера. Честотата на хомозиготното носителство на мутацията MTHFR C677T в изследваната Група 2 беше 8/42, (19.05%), а в контролите 13/112, (11.61%; $p=0.29$; OR-2.24). При подгруповия анализ по диагнози честотата при пациенти с Полицитемия вера беше два пъти по-висока от тази, установена в контролите 5/22 (22.75%, $p=0.29$ OR-2.24).

Сигнификантно по-висока честота се установи при изследване за полиморфизъм в гена на тромбоцитния гликопротеинов рецептор Пв/IIIa-PIA2/GPIIIa. В Група 2 полиморфизъм се намери при 12/42 (28.57%; $p=0.05$; OR-2.59), а при контролите в 15/112 (13.39%). По диагнози мутацията се установи по-често при Полицитемия вера – в 7/22 (31.82%; $p=0.07$; OR-3.02). Хомозиготните носители бяха 2/12 (16,6%).

Носителство на повече от един маркер за вродена тромбофилия (двойно носителство) беше установено при 6 от общо 42 изследвани пациенти (14.28%) и в 5 от 112 контроли (4.46%; $p=0.08$; OR-3.57). Разпределението на факторите за вродена тромбофилия по диагнози е равномерно: 3 са с Есенциална тромбоцитемия (15%, $p=0.19$ OR-3.78) и 3 - с Полицитемия вера (13.68%, $p=0.24$ OR-3.38). При всички двойни носители единият от маркерите в комбинацията винаги е PIA2/GPIIIa, като при 5 пациента е съчетан с MTHFR C677T, а при 1 с PR G20210A. Отчетените тромботични събития (ТС) в Група 2 бяха 24 (57%) за периода на проследяване. От общо 42 изследвани пациента,

със сходно разпределение по диагнози, 11 (55%) ТС бяха регистрирани при ЕТ и 13 (59%) - при ПВ. Преобладаващи бяха артериалните тромбозите (20/24, 83%), при 3 случая имаше прояви на венозни тромбози (белодробен тромбемболизъм), а при 2 - съчетание на артериални и венозни тромбози.

Таблица 27 Сравнение на честотата на генетични дефекти за ВТ между Група 2 и контроли.

Генетичен дефект	Контролна група n = 112 (%)	Група 2 общо n = 42 (%)	Пациенти с ЕТ n = 20 (%)	Пациенти с ПВ n = 22 (%)
FVL	7 (6.25%)	2 (4.76%) p=1.0 OR-0.75	1 (5%) p=1.0 OR-0.79	1 (4.54%) p=1.0 OR-0.71
PR G20210A	3 (2.68%)	4 (9.52%) p=0.17 OR-3.82	4 (20%) p=0.009 OR-9.08	0
MTHFR C677T	13 (11.61%)	8 (19.05%) p=0.35 OR-1.79	3 (15%) p=0.95 OR-1.34	5 (22.73%) p=0.29 OR-2.24
PLA2 /GPIIIa	15 (13.39%)	12 (28.57%) p=0.05 OR-2.59	5 (25%) p=0.32 OR-2.16	7 (31.82%) p=0.07 OR-3.02
Носителство на поне 1 дефект	32 (28.57%)	20 (50%) p=0.04 OR-2.27	10 (50%) p=0.10 OR-2.50	10 (45.45%) p=0.19 OR-2.28
Двойно носителство	5 (4.46%)	6 (14.28%) p=0.08 OR-3.57	3 (15%) p=0.19 OR-3.78	3 (13.68%) p=0.24 OR-3.38

Честотата на носителство на генетични дефекти за вродена тромбофилия в Група 2 с ТС (табл. 37) беше 15/24, (62.5%), значително по-висока от тази в контролната група 5/18 (27.8%; p=0.004 OR-4.17). При разпределянето ѝ според диагнозата тя беше сходна - 7/11 при Есенциална тромбоцитемия, (63.5%, p=0.04, OR-4.37) и 8/13 (61.5%, p=0.03, OR-4.0) при Полицитемия вера. Анализът по генетични маркери установи най-висока степен на асоциация с възникване на тромбози при PLA2/GPIIIa, както в общата изследвана група (41.7%; p=0.004 OR- 4.62), така и особено за полицитевия вера (46.2%; p=0.01; OR-5.54). Мутацията PR G20210A беше 3 пъти по-честа в общата група с тромботични събития (8.3%, OR-3.3) и с особено висока честота при пациентите с Есенциална тромбоцитемия (18.2%, OR-8.0), в сравнение с контролите (2.68%).

Таблица 28 Сравнение на честотата на генетични дефекти за ВТ при Група 2 с и без ТС

Генетичен дефект	Група 2 с ТС(n = 24) без ТС(n = 18)		Пациенти с ЕТ с ТС(n = 11) без ТП(n = 9)		Пациенти с ПВ с ТС(n = 13) без ТП(n = 9)	
FVL	2 (8.3%)	-	1 (9.1%)	-	1 (7.7%)	-
PR G20210A	2 (8.3%)	2 (11.1%)	2 (18.2%)	2 (22.2%)	-	-
MTHFR C677T	6 (25%)	2 (11.1%) p-0.46 OR -2.67	3 (27.3%)	-	3 (23.1%)	2 (22.2%)
PA2/GPIIIa	10 (41.7%)	2 (11.1%) p-0.06 OR -5.71	4 (36.4%)	1 (11.1%) p-0.44 OR -4.57	6 (46.2%)	1 (11.1%) p-0.20 OR-6.86
PA2/GPIIIa +/-или MTHFR C677T	12 (50%)	3 (16.7%) p-0.05 OR -5.0	5 (45%)	1 (11.1%) p-0.24 OR -6.67	7 (54%)	2 (22.2%) p-0.29 OR -4.08
Двойно носителство	5 (20.8%)	1 (5.6%) p-0.34 OR -4.47	3 (27.3%)	-	2 (15.3%)	1 (11.1%)
Носителство на поне 1 дефект	15 (62.5%)	5 (27.8%) p-0.05 OR -4.33	7 (63.6%)	3 (33.3%) p-0.37 OR -3.50	8 (61.5%)	2 (22.2%) p-0.17 OR -5.60

Двойното носителство бе 5 пъти по-често при пациентите общо с тромботични събития (21%, p-0.01, OR-5.63) и до 8 пъти по-често при пациенти с Есенциална тромбоцитемия и тромбози (27.3%, p-0.02, OR-8.0), в сравнение с контролите (4.5%). За да оценим влиянието на факторите за вродена тромбофилия върху тромботичния процес сравнихме тяхната честота в Група 2 със и без тромботични събития (таблица 37).

Всички носители на FVLeiden 2/24 са преживели тромботични събития при честота на носителство 8.3%. Честотата на мутация PR G20210A в групата с тромбози и в групата без тромбози е сходна. Носителството на полиморфизъм PA2/GPIIIa, обаче, е над 5 пъти по-често при пациентите с тромботични събития, в сравнение с асимптомни (p-0.06; OR-5.71), като това е особено валидно за подгрупата с Полицитемия вера (OR-6.86). От двама хомозиготни носители на PA2/GPIIIa, единият е на 49 год. с артериална тромбоза, а другият на 45 год., двоен носител на PA2/GPIIIa и MTHFR C677T, без регистрирано тромботично събитие.

Не се установи пряко влияние на мутацията MTHFR C677T върху честота на тромботични събития. Установихме, че този дефект оказва влияние в случаите, когато е в комбинация с PA2/GPIIIa. Така например в 5 от общо 8 случая на носителство, мутацията MTHFR е съчетана с PA2/GPIIIa, като 4 от тези носители (80%) имат вече тромботично събитие.

Таблица 29 Сравнение на дела на ТС при носители и неносители на ВТ при пациенти с ЕТ и ПВ

Генетичен дефект	Дял на ТС при Група 2	Дял на ТС сред пациенти с ЕТ	Дял на ТС сред пациенти с ПВ
Носители FVL	2/2 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)
Носители PR G20210A	2/4 (50%)	2/4 (50%)	-
Носители MTHFR C677T	6/8 (75%)	3/3 (100%)	3/5 (60%)
Носители P1A2/GPIIIa	p-0.12 OR-4.33 10/12 (83%)	4/5 (80%)	p-0.87 OR-2.10 6/7 (86%)
Носители P1A2/GPIIIa +/ или само MTHFR C677T	p-0.04 OR-7.22 12/15 (83%)	p-0.61 OR-6.00 5/6 (83%)	p-0.16 OR-8.40 7/9 978%)
Двойни носители	p-0.04 OR-5.78 5/6 (83%)	p-0.24 OR-7.50 3/3 (100%)	p-0.22 OR-4.90 2/3 (67%)
Носители на поне 1 дефект	p-0.17 OR-7.22 15/20 (75%)	7/10 (70%)	p-0.89 OR-2.80 8/10 (80%)
Неносители на генетични дефекти	p-0.05 OR-4.33 9/22 (41%)	p-0.37 OR-3.50 4/10 (40%)	p-0.17 OR-5.60 5/12 (42%)

Така 12/24 от пациентите (50%) с тромбози са носители на P1A2/GPIIIa и/или MTHFR C677T, в сравнение с 3/18 (16.7%) при асимптомните пациенти (p-0.05; OR-5.0). Носителство на поне 1 дефект беше установено в 62.5% (15/24) от пациентите с тромботични събития и в 27.8% (5/18) от асимптомните пациенти, т.е. вродената тромбофилия като цяло показва асоциация с тромбози при пациентите с МПН (p-0.05; OR-4.33). Сравнението на дела на тромботичните събития при носители и неносители на генетични маркери за тромбофилия ни позволи да проучим в каква степен това носителството е рисков фактор за тромбози (таблица 38). Всички носители на FVL и 50% от тези с PR G20210A са развили тромботични събития, в сравнение с 41% от неносители.

Носителството на P1A2/GPIIIa е свързано с 2 пъти по-висок риск за тромбози (p-0.04; OR-7.22), особено изразен при пациентите с Полицитемия вера (OR-8.40).

Анализът на данните за влиянието на факторите за вродена тромбофилия показва, че носителството на поне един тромбофилен маркер е свързано с около 2 пъти по-висок риск от възникване на тромботични усложнения при пациентите с Ph(-)МПН (p-0.05 OR-4.33), особено при тези с Полицитемия вера (OR-5.60). Сред двойните носители делът на тромботични събития е 83%, в сравнение с 41% при липсата на носителство (p-0.17, OR-7.22). От 15 носителя на P1A2/GPIIIa и/или MTHFR C677T 12 (83%) имаха ТС, сравнени с 9/22 (43%) при лицата -неносители (p-0.04; OR-5.78).

С оглед прецизиране на получените от нас резултати е необходимо изследване на честота на тромбофилното носителство в по-голяма група пациенти.

Факторите за вродена тромбофилия влияят върху честота на тромботичните събития при пациенти с Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия. Това влияние е различно, но е най-силно изразено за P1A2/GPIIIa и FVLeiden. Двойното носителство също води до по-висока честота.

Група 4 Въпроси, свързани с КМ ангиогенеза. Оценка на костно-мозъчната ангиогенеза чрез изследване на microvascular density (MVD) CD34+ проведехме при 33 пациенти, от които 7 с есенциална тромбоцитемия и 26 с Полицитемия вера. Съставихме контролна група от изследвани чрез костно-мозъчна биопсия 10 пациента с диагноза НХЛ или болест на Хочкин, при които категорично липсваха данни за ангажиране на костния мозък от патологичен процес. Първоначално приложихме непараметричен анализ по Спирман за търсене на корелация с някои от основните показатели, характеризиращи заболяванията. Установихме статистически значима връзка с диагнозата ПВ или ЕТ, с $Jak2^{V617F}$ мутация или $Jak2^{WT}$; със степента на мутационния товар $\geq 50\%$ или $< 50\%$, с размера на слезката и броя на тромботичните събития (таблица 39).

Таблица 30 Резултати от анализ по Spearman за търсене на корелация на $MVDCD34^+$ с $Jak2^{V617}$, мутационния товар на $Jak2^{V617}$, размери на слезка и брой ТС

$MVDCD34^+$	Диагноза ЕТ/ПВ	$Jak2^{V617F}$ наличие/липса	$Jak2^{V617F}$ Алелен товар </ $\geq 50\%$	Размер на далака	Брой тромбози
Корелационен коефициент ($p < 0.005$)	-0.441 0.003	0.548 0,000	0.588 0.000	0.623 0.000	0.336 0,028
Брой	43	43	43	43	43

Установена беше сигнификантно увеличена костно-мозъчна ангиогенеза и при двете миелопролиферативни заболявания, като при Есенциалната тромбоцитемия тя беше значително по-изразена, в сравнение с контролите, а при Полицитемия вера е повече от Есенциална тромбоцитемия (таблица 40)

Таблица 31 MVDCD34+ при болни с ЕТ и ПВ

<i>Jak2</i> ^{V617F}	MVDCD34+	пациенти	Стандартна девиация
Неизследвани	15.000	1	26.8710
<i>Jak2</i> ^{WT}	29.194	18	35.5739
<i>Jak2</i> ^{V617F}	65.750	24	36.6218

Ефектът на *Jak2*^{V617F} мутацията върху степента на ангиогенеза беше търсен първоначално като сравнение с „дивия тип“ *Jak2*. Установихме сигнификантно увеличение на костно-мозъчната ангиогенеза при пациентите, носители на *Jak2*^{V617F+} (p=0.002) (таблица 41).

Таблица 32 Костно-мозъчна ангиогенеза (MVDCD34⁺) при нормален *Jak2*^{WT} и мутирал *Jak2*^{V617F}.

Диагноза	MVACD34+	Пациенти	Стандартна девиация
Есенциална тромбоцитемия	39.429	7	23.0424
Полицитемия вера	66.615	26	34.5532
Контроли	11.050	10	4.5522
Общо	49.267	43	36.6218

Детайлният анализ на степента на ангиогенезата при различен мутационен товар доказва статистически значимо по-висока степен на ангиогенеза при *Jak2*^{V617F}≥50% (p=0.001) (таблица 42).

Таблица 33 Костно-мозъчна ангиогенеза (MVDCD34⁺) при различен мутационен товар на *Jak2*^{V617F}

<i>Jak2</i> ^{V617F}	MVDCD34+	Пациенти	Стандартна девиация
Неизследвани	15.000	1	
Wild type	29.194	18	26.8710
<i>Jak2</i> ^{V617F} <50%	50.909	11	22.5187
<i>Jak2</i> ^{V617F} ≥50%	78.308	13	40.3761

Особено интересни резултат получихме при анализа на костно-мозъчната ангиогенеза и степента на изразеност на спленомегалията при пациентите с ПВ и ЕТ. Противно на първоначалните очаквания, установихме по-висока ангиогенеза при по-масивна спленомегалия, което може да бъде обяснено с общо повишената васкуларизация на слезката (p=0.000) (таблица 43).

Таблица 34 MVDCD34⁺ и спленомегалия

Далак	MVDCD34 ⁺	Пациенти	Стандартна девиация
нормални размери <120 mm	30.438	24	22.6763
умерена спленомегалия 120-150 mm	64.600	10	44.3401
масивна спленомегалия ≥150 mm	82.444	9	27.4778

При първичния анализ на MVDCD34⁺ и броя на тромботични събития се установи сигнификантна корелационна зависимост ($p=0.028$). При проверка на средните стойности на MVDCD34⁺, обаче, при различни тромботични състояния, те не се различават статистически значимо, въпреки наличието на тенденция за по-висока КМ ангиогенеза при по-голям брой тромботични събития (таблица 44). Детайлният анализ по диагнози - ЕТ ($p=0.167$) и ПВ ($p=0.161$) спрямо контролите също не установи сигнификантна връзка между степента на КМ ангиогенеза и броя тромботични усложнения.

Таблица 35 MVDCD34⁺ и брой ТС

Брой ТС	MVDCD34 ⁺	Пациенти	Стандартна девиация
0	43.146	24	39.7979
х 1	63.500	10	33.2708
х 2	86.000	2	21.2132
Общо	51.181	36	38.6683

Резултати Група 5. Изработената анкетна карта за описване на тромботично събитие, валидна за групата Пациенти 2 (УМБАЛ“Д-р Георги Странски“ Плевен) е посочена в Приложение 1.

Резултати Група 6. При анализа на влиянието, което оказват молекулярните, патологоанатомичните и рутинни показатели при пациентите с ПВ и ЕТ не се установи сигнификантна корелационна зависимост и не се обособи независим прогностичен показател за развитието на тромботично събитие.

Резултати група 7. Ефектът на променените стандартни хематологични показатели върху развитието на тромботични събития бе проучено чрез корелационен анализ по Пийърсън, за всяка от двете диагностични групи. На таблица 45 е показана липсата на корелация между броя на тромботични събития и стойностите на хемоглобина, еритроцитния и тромбоцитен брой при Есенциална тромбоцитемия.

Таблица 36 Липса на корелация между стандартни хематологични показатели и честотата на ТС при ЕТ.

		Хемоглобин	Еритроцити	Брой тромбози	Тромбоцити
Хемоглобин	Pearson Correlation	1	.606**	-.084	-.168
	Sig. (2-tailed)		.000	.545	.223
	N	54	54	54	54
Еритроцити	Pearson Correlation	.606**	1	-.004	.003
	Sig. (2tailed)	.000		.976	.984
	N	54	54	54	54
Брой тромбози	Pearson Correlation	-.084	-.004	1	.109
	Sig. (2-tailed)	.545	.976		.431
	N	54	54	54	54
Тромбоцити	Pearson Correlation	-.168	.003	.109	1
	Sig. (2-tailed)	.223	.984	.431	
	N	54	54	54	54

*. *. Корелацията е значителна на ниво 0.05 (2 знака).

** . Корелацията е значителна на нивото 0.01 (2 знака).

a. Диагноза = Есенциална тромбоцитемия

На следващата таблица 46 е показана липсата на сигнификантна корелация между тромботичните събития и хематологичните показатели при Полицитемия вера.

Таблица 37 Липса на корелация между стандартни хематологични показатели и честотата на ТС при ПВ

		Хемоглобин	Еритроцити	Брой тромбози	Тромбо- цити
Хемоглобин	Pearson Correlation	1	.439**	-.153	-.308**
	Sig. (2-tailed)		.000	.123	.002
	N	103	103	103	103
Еритроцити	Pearson Correlation	.439**	1	-.053	.040
	Sig. (2tailed)	.000		.597	.686
	N	103	103	103	103
Брой тромбози	Pearson Correlation	-.153	-.053	1	.063
	Sig. (2-tailed)	.123	.597		.529
	N	103	103	103	103
Тромбоцити	Pearson Correlation	-.308**	.040	.063	1
	Sig. (2-tailed)	.002	.686	.529	
	N	103	103	103	103

*.Корелацията е значителна на ниво 0.05 (2 знака).

**. Корелацията е значителна на нивото 0.01 (2-знака).

а. Диагноза =Полицитемия вера

ДИСКУСИЯ

Мутационен товар на $Jak2^{V617F}$ и тромботични събития

В оформената работна хипотеза, базирана върху множество експериментални данни, наличието на мутацията $Jak2^{V617F}$ води до доказани патолофизиологични последици, които се изразяват във:

- автономна еритроцитна пролиферация с увеличена еритроцитната клетъчна маса, увеличен хематокрит и вискозитет, нарушена реология, забавен кръвоток, стаза и нарастване на тромбогенния риск.
- пролиферация и циркулиране на активирани $Jak2^{V617F}$ левкоцити, които освобождават миелопероксидаза и еластаза и причиняват ендотелна активация и дисфункция. Те губят своята модулиращата роля в тромботичния процеси и образуват увеличени количество левкоцит-тромбоцитни комплекси, които си взаимодействат с активираните ендотелни клетки и отключат процеса на тромбогенеза.
- образуване и циркулиране на активирани тромбоцити, с увеличена склонност към адхезия и агрегация, които са изтласкани маргинално до съдовата стена от увеличения брой на еритроцитите. Това увеличава продължителността и честотата на контакт с активираните ендотелни клетки и левкоцити, и създава условия за тромбообразуване.

В резултат на тези патолофизиологични последици, по-високият мутационен товар би трябвало да води до пролиферация на повече активирани клетки от миелоидната редица и съответно до нарастване на тромбогенния риск.

Нашите резултати, обаче, не успяха да потвърдят тази хипотеза и да установят корелация между честотата на тромботични събития и степента на алелен товар на мутацията $Jak2^{V617F}$ при пациентите с Полицитемия вера. Тези резултати са в съответствие с данните на голямо проучване на Passamonti et al (Passamonti, Rumi et al. 2010), обхващащо 338 пациента с Полицитемия вера, което не установява връзка между честотата на тромботичните събития и мутационния товар. Такива са и по-ранните резултати в проучване на Tefferi et al (Tefferi, Lasho et al. 2006).

Независимо че изглежда логична, патолофизиологичната зависимост между степента на мутационния товар на $Jak2^{V617F}$ и честотата на тромботичните събития не може да докаже влиянието си на практика. Вероятно обяснение за това се крие във факта, че при рутинната методиката на Real-Time PCR количествено определяме броя на мутиралите алели в общия брой левкоцити. Клетъчното разпределение на мутиралите алели, обаче, е различно при болните

с еднаква степен на мутационен товар. Например, при „хомозиготно“ носителство (алелен товар на $Jak2^{V617F}=50\%$), мутиралите алели могат да бъдат разпределени минимално в 25% от циркулиращите левкоцити (по 2 алела), максимално в 50% от клетките (по 1 алел), или в различен брой между двете стойности. Така броят на активираните от мутацията левкоцити варира и това би обяснило несъответствието между наличието на мутация и липсата на тромботични събития при множество проучвания, включително и в нашето. В общия случай, ако приложим математическо моделиране, гарантираният брой засегнати клетки би трябвало да се изчисли по формулата $2x - 100\%$. т.е при 50% алелен товар сигурният брой хомозиготни носители е 0. Косвена подкрепа на тези съждения може да намерим в известно проучване на Vanucchi et al (Vannucchi, Antonioli et al. 2007), които сравняват честотата на тромботични събития при различни стойности на мутационния товар на $Jak2^{V617F}$. Техните резултати показват, че при пациенти с мутационен товар на $Jak2^{V617F} >75\%$ се установява сигнификантно по-висока честота на тромботични събития в сравнение с пациенти с $Jak2^{V617F} <25\%$. Ако приложим формулата за математическо моделиране за високия мутационен товар, то $2x75-100\%=50\%$ от левкоцитите са гарантирано носители на $Jak2^{V617F}$ и съответно активирани. Това е минималният сигурен процент, а на практика реалният процент ще варира най-често между 60 и 70%, което обуславя и вероятността за по-висока честота на тромботични събития. Изключително малко са проучванията, които проследяват еволюцията в клоналността при двете заболявания. Според някои водещи автори клонално доминиране настъпва много бавно при Полицитемия вера и почти не се установява при Есенциална ромбоцитемия. (Spivak 2017)

При ЕТ не установихме статистически значима зависимост между носителството на $Jak2^{V617F}$ и честотата на тромботичните събития. Детайлното им разглеждане, обаче, показва, че при наличие на тромбози, носителство на $Jak2^{V617F}$ се установява в 60% от случаите, а в групата без ТС липса на мутация се установява при 61% от пациентите. Без да е сигнификантна, в случая е налице тенденция за по-често развитие на ТС при пациенти с ЕТ и мутация $Jak2^{V617F}$ в сравнение с неносители. Въпреки малкия брой случаи, тази тенденция потвърждава идеята за въвеждането на $Jak2^{V617F}$ като рисков фактор в началната рисковата стратификация при Есенциална тромбоцитемия. Тези данни са в съответствие с резултатите на Lussana F et al в голям мета-анализ, обобщаващ данните от 21 клинични проучвания. Общо при 1734 носители на $Jak2^{V617F}$ са регистрирани 551 тромботични събития (32%), за разлика от 277 при 1416 неносители на $Jak2^{V617F}$ (20%). Изводите от този анализ показват, че носителството на $Jak2^{V617F}$ води до двукратно нарастване на риска от тромбози (OR 1.92, 95% CI 1.45-2.53) (Lussana, Caberlon et al. 2009). Потвърждение на

тези данни се получиха при разработване и в следствие при валидирането на Международния Прогностичен Индекс за тромбози при ЕТ (IPSET thrombosis), а по-късно и при неговата ревизия (rIPSET thrombosis (Passamonti, Thiele et al. 2012)).

Ролята на левкоцитозата като начален рисков фактор при ПВ и ЕТ

Анализът на нивото на левкоцитния брой, установен при поставяне на диагнозата Полицитемия вера не показва статистически значими разлики при пациентите без ТС (Лев=12,1x10⁹/l) или прекарали едно или две ТС (Лев=12,3x10⁹/l; Лев=13,3x10⁹/l). Тези резултати не съответстват на изводите, направени от Caramazza D. при проучване върху 187 пациента с ПВ и ЕТ за период от 7 години. Според тях Лев>9,5x10⁹/l, установени при поставяне на диагнозата, се асоцират с увеличен риск от тромбози през периода на проследяване (HR=1.8, p=0,03). Тази зависимост се губи при снижаване на левкоцитния брой с 35%, постигнато след лечение с Хидрокиурея и на практика важи за low-risk пациенти, неполуучаващи циторедуктивна терапия. Друг важно заключение в същото изследване е, че Jak2^{V617F} няма роля като рисков фактор за тромбози (Caramazza, Caracciolo et al. 2009). Друго проучване върху 457 пациента с Полицитемия вера на Gangat N, устянявява, че левкоцитоза >15x10⁹/l е независим предиктор за левкемична трансформация и венозна тромбоза през периода на проследяване на пациентите (Gangat, Strand et al. 2007). В най-голямото проучване ECLAP левкоцитозата >15x10⁹/l е рисков фактор конкретно за възникване на миокарден инфаркт (Landolfi, Di Gennaro et al. 2007).

Противоположни резултати получава отново Gangat N при проследяване на 407 пациенти с ЕТ и нисък риск като намира, че началната левкоцитозата не влияе върху честотата на тромботичните събития (Gangat, Wolanskyj et al. 2009).

Обяснение за разликата в резултатите на описаните по-горе проучвания може да получим ако анализираме причините за левкоцитозата. Тя е следствие на ефекта на патогенетичната driver мутация Jak2^{V176F}. Както бе подчертано по-горе, процентът на патологично активираните Jak2^{V617F} левкоцити варира при еднакъв мутационен товар, което променя и вероятността за развитие на тромботични събития. От тази гледна точка по-важно би било да се търси ефекта на абсолютния брой на качествено променените Jak2^{V617F} левкоцити върху честотата на тромботични събития, а не на общо увеличени левкоцитен брой при поставяне на диагнозата. В подкрепа на тези разсъждения е и наблюдаваната промяна на „тромбогенната гранична стойност“ на левкоцитите, която започва от 9.5x10⁹/l (Caramazza, Caracciolo et al. 2009), а в останалите

проучвания е над $15 \times 10^9/l$ (Gangat, Strand et al. 2007, Landolfi, Di Gennaro et al. 2007).

В общата група от 54 пациента с ЕТ ние не установихме сигнификантна зависимост между левкоцитния брой и честотата на тромботичните събития. По-интересен бе анализът на влиянието на левкоцитния брой върху честотата на ТС при пациентите, носители на $Jak2^{V617F}$. От общо 18 пациента, 12 при среден левкоцитен брой $=11.63 \times 10^9/l$ бяха без тромботични събития, а при 6 бяха регистрирани ТС при среден левкоцитен брой $=10.51 \times 10^9/l$. Получените резултати отхвърлят тезата, че левкоцитният брой, установен при поставяне на диагнозата, може да бъде предиктор за развитие на тромботични събития в периода на проследяване на пациентите с Есенциална тромбоцитемия, както в общата група така и в подгрупата на носителите на $Jak2^{V617F}$.

И при двете диагностични групи левкоцитозата не доказва своето значение като самостоятелен рисков фактор за развитие на тромботични събития. Вероятната причина според нас е, че тя няма самостоятелна роля в развитието на тромботичните събития, а всъщност опосредства ефекта на $Jak2^{V617F}$ мутацията. От друга страна тя е маркер на биологично различен фенотип на болестта, което се подкрепя от значителното наличие на $Jak2^{V617F}$ в левкицитите (Wolanskyj et al, 2005; Campbell et al., 2006) (Gangat, Strand et al. 2007). В тази връзка въвеждането на левкоцитозата като рисков фактор за обща преживяемост в IPSS при Полицитемия вера (Tefferi, Rumi et al. 2013) и IPSET при Есенциална тромбоцитемия (Gangat, Wolanskyj et al. 2007, Passamonti, Thiele et al. 2012) е обосновано предвид сходните резултати от няколко значими проучвания.

От клинична гледна точка, може би по-важна е динамиката на левкоцитния брой при проследяване, защото нарастването му налага започване на циторедуктивна терапия и при пациентите с нисък риск. В такива случаи интерес би представлявало изследването на причината за нарастващата левкоцитоза - загуба на хетерозиготност на $Jak2^{V617F}$, поява на друга мутация или пълна загуба на вътреклетъчен контрол на STAT.

Фактори за ВТ при пациенти с ПВ и ЕТ

При нашето изследване установихме значително по-висока честота на фактори за ВТ при пациенти с ПВ и ЕТ (47,6%) в сравнение с общата популация (28,57%). Тези данни се различават от публикуваните резултати от други проучвания (Ruggeri, Gisslinger et al. 2002, De Stefano, Za et al. 2009), в които тази честота не се различава от установената в общата популация (табл.47).

Основен дял заемат регистрираните по-високи честоти на FII G20210A и PLA1/A2, което вероятно се дължи на сравнително ограничени брой проучени пациенти. Изследването за PLA1/A2, обаче, не се включва рутинно при скрийнинг за тромбофилия и анализът му фигурира само още в едно проучване.

Разпределението на факторите за вродена тромбофилия между двете диагнози не показва разлики, което съответства на публикуваните в литературата данни. Интерес представляват случаите с носителство на повече от един маркер за вродена тромбофилия (т.н. двойно носителство), което установихме в по-висока степен при ПВ и ЕТ (14.28%) в сравнение със здравите контроли (4.46%). При всички двойни носители единият патологичен фактор винаги е PLA2/GPIIIa, като в 5 случая той е съчетан с MTHFR C677T, а в 1 - с FII G20210A. Тромботично събитие има регистрирано при 5 от тези 6 пациента (83%). MTHFR C677T няма самостоятелната роля в тромбогенезата. Съчетанието му с втори фактор за вродена тромбофилия, обаче, има адитивен ефект и това увеличава риска от развитие на тромбози. Полиморфизмът PLA2/GPIIIa увеличава адхезията и агрегацията на тромбоцитите, което в съчетание с активираното състояние, генерирано от Jak2^{V617F}, увеличава тромбогенния риск. В достъпната литература такава клинична ситуация не е разглеждана, вероятно поради рядкото изследване на PLA2/GPIIIa полиморфизъм.

Таблица 38 Честота на факторите за вродена тромбофилия при ЕТ и ПВ

	Собствено проучване 2007 год		A. Trifet al. 2013 (n=181)	M. Ruggeriet al., 2002 (n=304)	H. Gisslinger et al. 2005 (n=214)	V. De Stefano et al. 2009 (n=132)	V. Afshar-Kharghana et al. 2002 (n=86)
	Контр оли (n=112)	Пациент и (n=43)					
ПВ/ЕТ	20/23		86/95	178/126	131/83	/132	43/43
FVLeiden	6.25%	4.75%	9.3%/8.4%	4.6%	7%	3%	8%
FII G20210A	2.68%)	9.52%)	9.3%/3.2%	не е изследван	4.2%	3%	5%
MTHFR (697C>T)	11.6%	19.05%	12.7%/13.7%	не е изследван	не е изследван	не е изследван	не е изследван
PLA2	13.39%	28.57%	не е изследван	не е изследван	не е изследван	не е изследван	няма данни

Само в едно проучване на V. Afshar-Kharghan (Afshar-Kharghan, Lopez et al. 2004) е изследвано протромбогенното въздействие на полиморфизъм на повърхностни тромбоцитни рецептора (glycoprotein GP Ib/ α , GPIa, GPIIb) и полиморфизъм на най-честите коагулационни фактори (FVLeiden и FIIIG20210A). Резултатите показват, че само P1A2/GPIIb води до статистически значимо увеличаване на честотата на артериални тромбози при пациентите с Полицитемия вера ($p < 0.05$).

Нашият анализ установи най-висока степен на асоциация с тромбози на P1A2/GPIIb, както в общата изследвана група (41.7%; $p = 0.004$ OR- 4.62), така и особено при Полицитемия вера (46.2%; $p = 0.01$; OR-5.54), като на практика потвърди резултатите на V. Afshar-Kharghan. В 83% от случаите тромбозите са артериални. Двойното носителство е над 4 пъти по-често при пациенти с Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия, протичащи с тромботични събития (21%, $p = 0.01$, OR-5.63) в сравнение с контролите (4.5%).

Установяването на носителство на единичен фактор за вродена тромбофилия при 62.5% от прекаралите тромботични събития и в 27.8% от асимптомните пациенти налага извода, че наличието на вродена тромбофилия увеличава тромбогенния риск при Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия. Това нарастване е около 2 пъти и е най-изразено за P1A2/GPIIb и FVLeiden. Двойното носителство увеличава до 5 пъти риска за тромбози и не се среща като изключение. Мутация MTHFR C677T няма пряко влияние върху честота на тромботичните събития, което е в съответствие с публикуваните в литературата данни през последните години (Hickey, Curry et al. 2013). Носителството на P1A2/GPIIb не е проучено достатъчно, но в нашето изследване наличието му обуславя до 2 пъти по-висок тромботичен риск. Като вземем предвид сравнително високата честота на дефекта P1A2/GPIIb в кавказката раса - 15-20%, то вероятността за двойно носителство е съвсем реална. В патофизиологичен аспект двойното носителство генерира промени както в адхезията и агрегацията на тромбоцитит, така и в плазмените коагулационни фактори, което обуславя и по-високия тромбогенен риск в нашето изследване - 83%. Необходимо е реализиране на по-голямо проспективно проучване, оценяващо ефектите на двойно носителството и на P1A2/GPIIb върху тромбогенезата при двете заболявания.

В литературата има ограничени и противоречиви оценки на влиянието на факторите за вродена тромбофилия при МПН въпреки, че първите изследвания започват още през 2004 год. Няма и уточнен терапевтичен подход при установяване на наличието им. Приема се концепцията за влиянието на тромбофилите върху общата популация, което не е най-удачно. Едва ли настоящия свръхконсервативен подход, при който вродената тромбофилия не

се отчита като значим тромбогенен фактор, е най-удачен. От друга страна, в реалната, ежедневна клинична дейност не е необходим масов скрийнинг на пациентите с Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия. Многообразието в клиничната изява и в хода на МПН налага диференциран подход и обособяване на подгрупа, при която изследването за вродена тромбофилия би имало прогностична стойност и би повлияло вземането на решение за общото лечение на пациентите. Според нас тя би включвала следните общоприети критерии (Connors 2017):

1. Пациенти с тромбоза настъпила при възраст <50 год. при липса или при незначителни провокиращи фактори;
2. Тромбоза на необичайни места (спланхникусови, sinus venosus);
3. Пациенти с повторни тромбози при добър контрол на основното заболяване;
4. Пациенти с фамилна анамнеза за роднини от първа линия, при които е налице доказана вродена тромбофилия;
5. Пациентки с минала анамнеза за > 3 спонтанни аборта

Връзка на костно-мозъчната ангиогенеза с $Jak2^{V617F}$, степента на спленомегалия и ТС

При първоначално проведения анализ установихме сигнификантна корелация между степента на костно-мозъчна ангиогенеза, диагнозата (ПВ или ЕТ), носителство/неносителство на $Jak2^{V617F}$, степента на мутационен товар - $Jak2^{V617F} < 50\%$ или $Jak2^{V617F} \geq 50\%$, размера на далака и честотата на тромботични събития. Изследванията показаха, че при ПВ и ЕТ е налице значителното увеличение на костно-мозъчната ангиогенеза за $MVDCD34^+$ в сравнение с контроли, както и градация по диагнози: $ПВ > ЕТ > контроли$. Доказахме, че степента на костно-мозъчната ангиогенеза при носители на мутацията $Jak2^{V617F}$ е около два пъти по-голяма от тази при неносители, а по-високата степента на мутационен товар се асоцира с по-изразена ангиогенеза. Сходни данни са намерени в публикациите на Gianelli U et al. (Gianelli, Vener et al. 2007).

В друго голямо проучване на M. Medinger et al., костно-мозъчната ангиогенеза е оценена чрез успоредното изследване на $MVDCD105^+$ и $MVDCD35^+$ (Таблица 48). Те също утановяват нарастване на КМ ангиогенеза по двете методики, но излагат по-консервативно виждане за влиянието на $Jak2^{V617F}$ (Medinger, Skoda et al. 2009, Medinger and Passweg 2014). Според тях костно-мозъчната ангиогенеза е независима от $Jak2^{V617F}$ и няма доказана пряка

патофизиологична връзка между тях. От друга страна, тези автори приемат, че при висок мутационен товар, $Jak2^{V617F} \geq 55\%$ може да повлияе ангиогенезата, но не чрез ключовия регулатор VEGF.

Таблица 39 Сравнение на резултатите за костно-мозъчна ангиогенеза.

CD34 ⁺ MVD микросъда/mm ²		
	Собствено проучване 2017	М. Medinger et al. 2009
ЕТ	39.4	22,7±
Jak^{WT}	28	28±23
Jak2^{V617F}	44±31	18±8
ПВ	66.6	33±24
Jak^{WT}	39±16	25±11
Jak2^{V617F}<50%	53±24	30±14
Jak2^{V617F}≥50%	66±34	40±34

Всъщност възниква въпросът доколко костно-мозъчната ангиогенеза е локален процес и дали не са касае за обща дисрегулация, нарушена съдова регенерация и ангиогенеза изобщо в съдовете на целия организъм. Като основания за подобна хипотеза може да се изложат следните аргументи: 1) високите, а не локални серумни нива на множество проицфламаторни и регулаторни цитокини (Hoermann, Greiner et al. 2015); 2) доказано високи нива на циркулиращи ендотелни клетки в различно физиологично състояние (покой, апоптоза, активация, ендотелни прекурсори) (Alonci, Allegra et al. 2008, Trelinski, Wierzbowska et al. 2010, Belotti, Elli et al. 2012); 3) наличие на $Jak2^{V617F}$ ендотелни клетки в съдовете на черния дроб и далака (Sozer, Fiel et al. 2009, Teofili, Martini et al. 2011, Rosti, Villani et al. 2013); 4) тясна връзка между увеличената костно-мозъчната ангиогенеза и степента на спленомегалията.

Нашето проучване потвърди силната корелационна зависимост между увеличената костно-мозъчната ангиогенеза и степента на спеномегалия, което съответства на данните от други проучвания (Mesa, Hanson et al. 2000, Medinger, Skoda et al. 2009). В литературата липсват хипотези, обясняващи тази находка. Според нас, в етапа на заболяванията, когато липсва костно-мозъчна фиброза и екстрамедуларна хемопоеза би могло да се касае за компенсаторна реакция, с увеличение на резервоарната функция на далака, вследствие значителната еритроцитна клетъчна маса (при ПВ). Подобна хипотеза се среща в проучванията на Wolf, Banks et al. 1988, O'Keane, Wolf et al. 1989. Алтернативно обяснение би било, че се касае за общ процес на съдовата

система който нарушава ендотелната функция, съдовата регенерация и ускорява развитието на атеросклерозата. В тази насока могат да се интерпретират и получените резултати за евентуална връзка между КМ ангиогенеза и честотата на тромботичните събития. Може би те са израз на една обща ендотелна болест, която с времето се разраства и ангажира все по-голяма част от съдовете. В нашето изследване независимо, че не установихме статистическа корелация между по-високата костно-мозъчна ангиогенеза и честота на тромботични събития се оформи подобна тенденция. Необходими са повече проучвания, реализирани от различни изследователски групи върху ендотелните промени при двете заболявания и ефектите на увеличените нива на системните регулаторни цитокини.

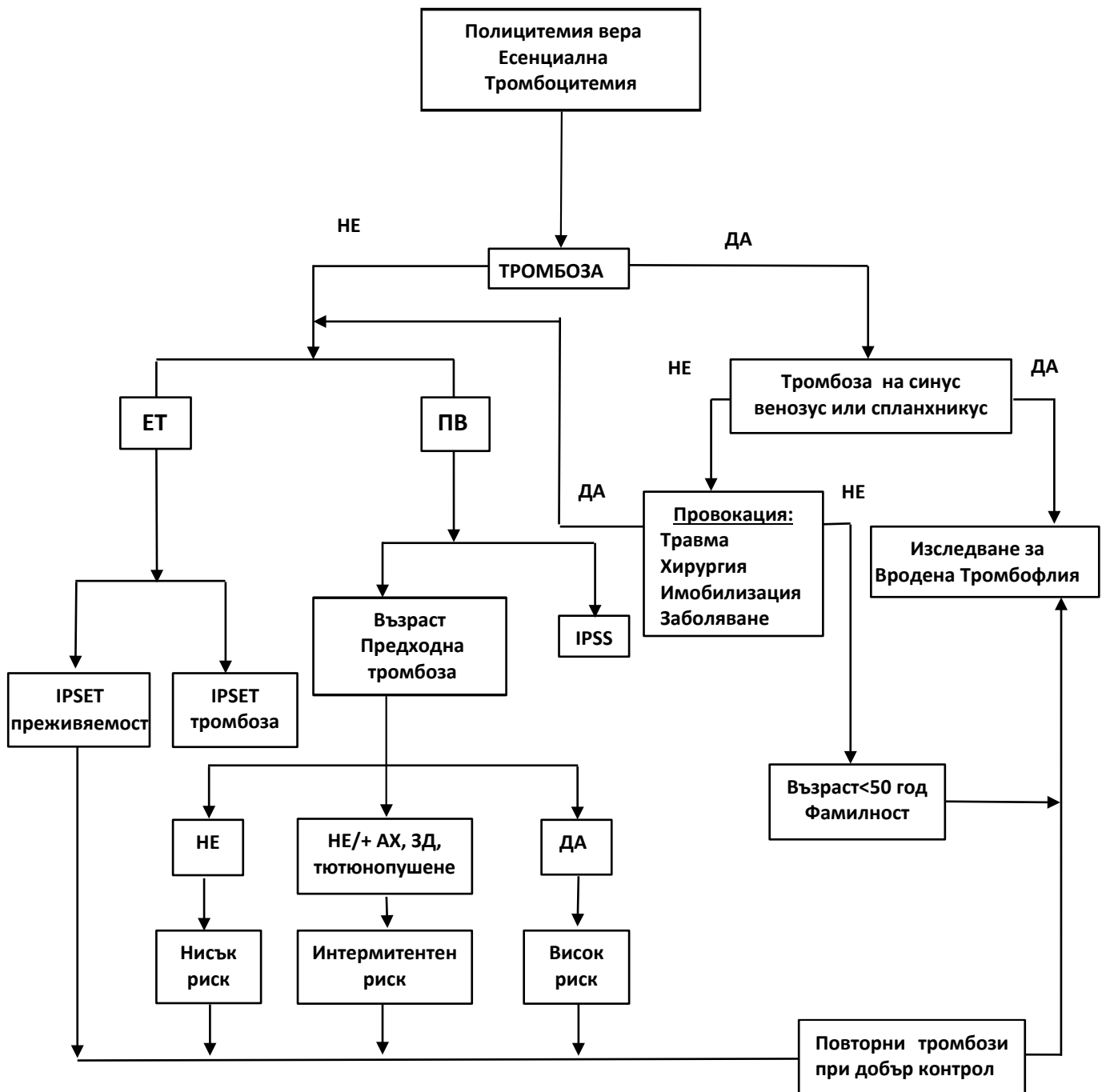
Определяне на независим прогностичен показател

Анализът на събраните данни установи корелационна зависимост единствено между част от факторите за вродена тромбофилия и честотата на тромботични събития при пациентите с ПВ и ЕТ. Тези факторите се срещат в различна честота и увеличават риска за тромботични събития в различна степен. Пациентите с Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия и носителство на P1A2/GPIIIa или FVLeiden са изложени на 4 пъти по-голям риск за тромбози в сравнение с неносителите. Двойното носителство на P1A2/GPIIIa и MTHFR или FPG20210A увеличава риска от ТС до 7 пъти. При част от пациентите, отговарящи на определените вече критерии, ВТ е рисков фактор, който трябва да бъде включен при началното стратифициране в подходящата рискова група за развитие на тромботични събития.

Един рационален подход за уточняване на ВТ би включвал:

- 1) анамнеза за възрастта и локализацията при настъпило първо ТС;
- 2) търсене на провокираща причина при първи епизод за тромбоза (масивна травма, продължителна имобилизация, хирургична интервенция, тежки придружаващи заболявания, фамилна анамнеза).

На фигура 15 е показан примерен алгоритъм за определяне на риска от ТС при поставяне на диагнозата.



Фигура 15 Алгоръм за провеждане на изследвания за фоктори за вродена тромбофилия

IPSET-тромбоза (Международен Прогностичен Скор за ЕТ)

Рискови фактори /точки:

- Възраст ≥ 60 г. /1 точка *Нисък риск: 0-1 точки*
- Анамнеза за ТС /2 точки *Междинен риск: 2 точки*
- Сърдечно-съдови рискови фактори/1 точка *Висок риск: ≥ 3 точки*
- JAK2 V617F /2 точки

IPSET преживяемост (Международен Прогностичен Скор за ЕТ)

Рискови фактори /точки:

- Възраст ≥ 60 г. /1 точка *Нисък риск: 0*
- Анамнеза за ТС /2 точки *Междинен риск: 1-2 точки*
- Лев. $> 11 \times 10^9$ /л /1 точка *Висок риск: 3-4 точки*

IPSS преживяемост (Международен Прогностичен Скор за ПВ)

Рискови фактори /точки:

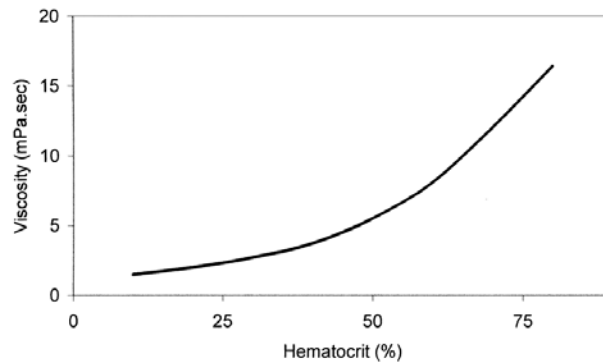
- Лев $\geq 15 \times 10^9$ /л (1 точка) *Нисък риск: 0*
- Предходна тромбоза (1 точка) *Междинен риск: 1-2*
- Възраст: 57-66 години (2 точки) *Висок риск: ≥ 3*
- Възраст: > 67 години (5 точки)

Влияние на промените в стандартните хематологични показатели

Промените в стандартните хематологични показатели засягат основно хемоглобина, хематокрита, броя на еритроцитите, левкоцитите и тромбоцитите.

Статистическата обработка на нашите данни не показва връзка между честотата на тромботичните събития и промените стойности на някой от тези показатели. Такива са заключенията и от проведените проучвания, отразени в литературата през последните 10 години.

Най-изследвана и логична в патофизиологично отношение е зависимостта на тромботичните събития от нивото на хематокрита. Увеличения хематокрит отразява промените не само в броя на еритроцитите, но и в техния обем. Той е основният фактор, който определя кръвния вискозитет (Begg and Hearn 1966). Съществуващата логаритмична зависимост между вимана на кръвния вискозитет и нивото на хематокрит е показана на фиг. 20.



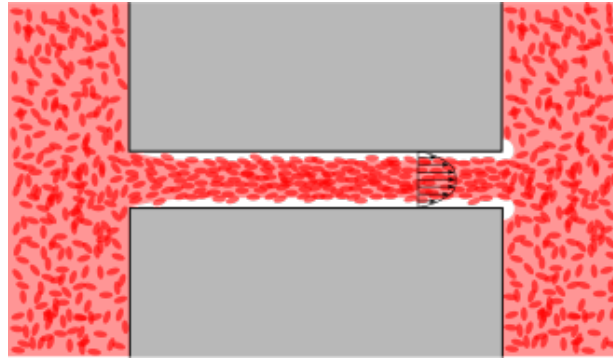
Фигура 16 Ефект на хематокрита върху вискозитета на кръвта (Baskurt and Meiselman 2003)

Теоретично това прави хематокрита изключително подходящ за оценка на кръвния ток като част от триадата на Вирхоф. Още първите проучвания при Полицитемия вера насочено търсят връзка между променения хематокрит и честотата на тромботични събития (Chievitz and Thiede 1962, Pearson, 1978), като резултатите дт тях са с противоречиви резултати. Последвалите проучвания го включват при първичния мултивариационен анализ за оценка на предиктивното му значение в развитието на тромбози. При таргентна стойност от 0,45 никое от тях не намира статистическа зависимост (Di Nisio, Barbui et al. 2007, Caramazza, Caracciolo et al. 2009). От друга страна Marchioli et al. сравняват честота на сърдечно-съдови събития при 365 пациенти с Полицитемия вера, разделени в 2 групи: група 1 – със строго поддържане на хематокрит $<0,45$ и група 2 - с поддържане на по-високи стойности $0,45 < X_{т} < 0,50$. Резултатите показват, че в групата с по-нисък хематокрит се установяват 4 пъти по-малко тромботични събития (4.4% срещу 10.9%, $P = 0.02$) и по-ниска сърдечно-съдова смъртност (1,1 спрямо 4,4 на 100/човека/годишно) в сравнение с другата група. Тези данни потвърждават терапевтичните цели, формулирани още от Групата за Изследване на Полицитемия Вера (PVSG) за строго поддържане на хематокрит $<0,45$, но без отговор остава въпросът защо повишения хематокрит не може да се докаже като рисков фактор? С цел обяснение на последното могат да бъдат взети в съображение някои от следните факти:

1. Физиологична динамика в стойностите на хематокрита

Хематокритът представлява пропорцията на обема на кръвните клетки (основно еритроцити) спрямо общия обем кръв, т.е представлява обема на Ер в единица обем кръвна проба. В ежедневната практика хематокритът се изчислява като съотношение между директно измерения еритроцитен брой и средния обем на еритроцитите ($X_{т} = E_{р} / MCV$), установени при анализ на периферната кръвна картина. Редица проучвания по хемореология (Baskurt and

Meiselman 2003) доказват, че хематокритът при даден индивид не е константна величина, а по-скоро е динамичен параметър, който се променя бързо и сигнификантно като част от физиологични, патофизиологични и дори психосоматични процеси. Физиологично в капиляри с диаметър по-малък от 500 μm се извява ефекта на Fåhræus – намаление концентрацията на еритроцитите при намаляване диаметъра на кръвоносните съдове т.е. хематокритът намалява с намаляване на капилярния диаметър (фиг.21).



Фигура 17 Аксиално разпределение на еритроцитите и формиране на маргинален безклетъчен слой. Ефектът на Fahraeus се получава, тъй като средната скорост на Ер е по-висока от средната плазмена скорост. Rudolf Hellmuth

При съдове с диаметър между 10 и 300 μm ефектът на Fåhræus–Lindqvist води до намаляване на вискозитета на кръвта при редукция в диаметъра на съдовете. Бързо намаление на хематокрита и следователно на вискозитета може да се осъществи чрез съдови авторегулаторни механизми при минимално разширяване на съдовете.

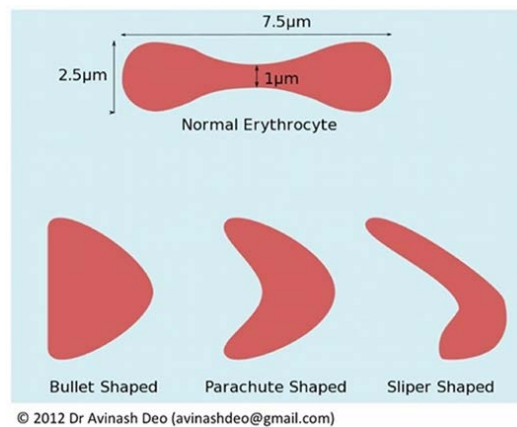
2. Автономна физиологична регулация на кръвотока

Отдавна е доказано, че мозъчният кръвоток при пациенти с Полицитемия вера и хематокрит между 0,47-0,53 е по-слаб от този при пациенти със стойности между 0,36-0,46. След флеботомии с корекция на вискозитета той се увеличава с 50% (Thomas, du Boulay et al. 1977). Всичко тези основни постановки на хемореологията показват, че определянето на единична статична стойност на хематокрита в периферната вена не отразява локалните динамични промени, които настъпват в съдовете.

3. Деформбилност и агрегацията на еритроцитите

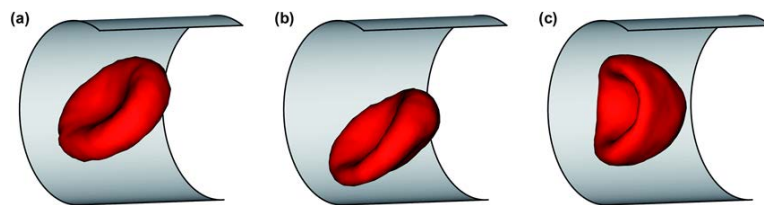
Това са другите два фактора освен броя на еритроцитите, които определят промените във вискозитета на кръвта. Обикновено еритроцитите имат двойно биконкавна форма и агрегират при ниска скорост на кръвта. При високо съдово съпротивление и скорост на кръвта, агрегатите се разпадат. По-нататъшното

увеличаване на вискозитета води до промяна във формата на еритроцитите от биконкавна до куршумообразна, парашутна или форма на чехъл. Тези форми оказват по-малко съпротивление (фиг.22).



Фигура 18 Промяната във формата и диаметъра на еритроцитити при движението им в капилярите

Деформабилността на еритроцитите играе ключова роля в обмяната на кислород между кръвта и тъканите в микроциркулацията, като им позволява да минават през капиляри с диаметър по-малък от техния собствен. При движението си в съдовете те претърпяват непрекъснат сложен процес на преход от двойно биконкавна към парашутна конфигурация и обратното, чрез сгъване на мембраната и реорганизация на цитоплазмата (Ye, Phan-Thien et al. 2016) (фиг.23).

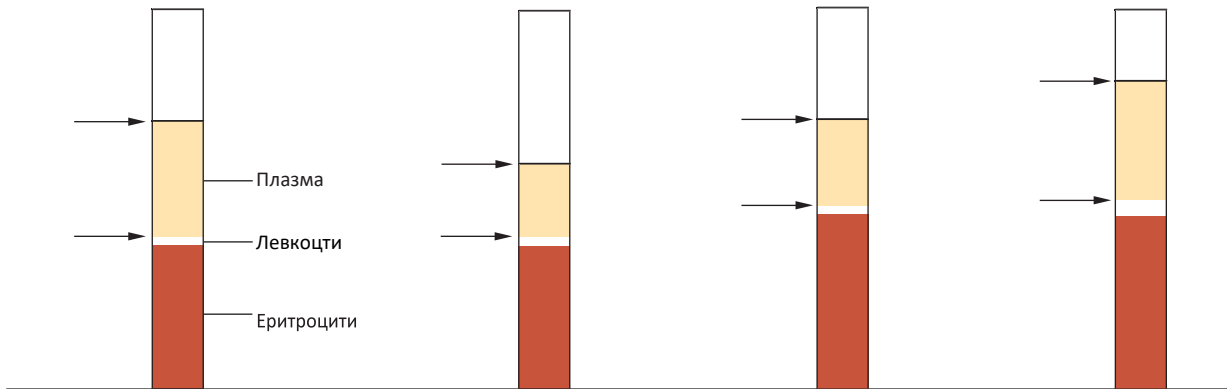


Фигура 19 Трансформацията във формата на еритроцитите, която протича в микроциркулацията. При ниска скорост на кръвта (a), еритроцитите имат двойно-биконкавна форма. С увеличение на скоростта (b), се наблюдава форма на панделка. При най-висока скорост (c), се получава парашутна форма, като еритроцита се движи в центъра на съда. (Ye, Phan-Thien et al. 2016)

Тези доказани физиологични промени поставят въпроса как се променят деформабилността и агрегацията на еритроцитите при пациенти с Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия?

4. Промени в еритроцитната клетъчна маса и плазменния обем

При Полицитемия вера, еритроцитозата обикновено води и до нарастване на плазменния обем, което маскира истинския хематокрита (Murray 1965, Campbell, 1970 #4897). Като илюстрация на нееднозначните отношения между плазменния обем и еритроцитната клетъчна маса е примера, който дава Spivak J (Spivak 2017)



Нормален хематокрит	„Висок хематокрит“			Висок хематокрит			Нормален хематокрит		
	Намален плазмен обем			Исторична еритроцитоза			Полицитемия вера		
	52 год. мъж със заместваща андрогенна терапия			50 год мъж с белодробна артерио-венозна фистула			18 год мъж с тромбоза на v. hepatica		
	Очакван	Намерен	Дефицит или Излишък	Очакван	Намерен	Дефицит или Излишък	Очакван	Намерен	Дефицит или Излишък
Ер клетъчна маса мл	2370	2661	+291	1924	3982	+2058	2058	3210	+1152
Плазма-обем мл	3393	1824	-1569	2919	2489	-430	3061	5674	+2613
Общ кръвен обем мл	5763	4455		4843	6481		5119	8884	
Хематокрит %	41.1	59.3		39.7	61.4		40.0	36.4	

Фигура 20 Промени в еритроцитната клетъчна маса, плазменния обем и хематокрита (Spivak 2017)

Редукцията на плазменния обем води до нарастване на хематокрита, независимо че еритроцитната клетъчна маса е без промяна, както е при първия пример на фигура 29. Тази клинична ситуация на практика е неразличима от

еритроцитозата при хипоксия само чрез изследване на хематокрита. Пациента има критерий за Полицитемия вера.

При втората клинична ситуация хипоксията стимулира еритропоезата с последваща еритроцитоза. Развитието на еритроцитоза води до намаляване на плазмения обем, тъй като по подразбиране организма се стреми да поддържа постоянен кръвен обем. Отново има критерий за Полицитемия вера.

При Полицитемия вера освен нарастването на еритроцитната клетъчна маса се увеличава и плазменият обем, което маскира еритроцитозата или нейната степен. Няма диагностичен критерий за Полицитемия вера.

В примерите не е възможна диференциация въз основа на хематокрита, без независимо определяне на клетъчната маса и плазмения обем.

5. Компенсаторни и регулаторни механизми

Един от най-фундаменталните принципи във функционирането на кръвообращението е способността на всяка тъкан да контролира собственото си локално кръвоснабдяване, което е в зависимост от метаболитните ѝ нужди. От друга страна логично е да предположим, че ако основна причина за тромботични усложнения при ПВ и ЕТ са общите промените в състава на самата кръв тогава най-чести ТС биха възниквали в най-кръвоснабдените органи-черен дроб и бъбреци. /общо 49% от кръвотока/ но в действителност най-честото тромботично усложнение е ОМИ, следвано от ИМИ.

Blood Flow to Different Organs and Tissues Under Basal Conditions

	Per cent	ml/min	ml/min/100 g
Brain	14	700	50
Heart	4	200	70
Bronchi	2	100	25
Kidneys	22	1100	360
Liver	27	1350	95
Portal	(21)	1050	
Arterial	(6)	300	
Muscle (inactive state)	15	750	4
Bone	5	250	3
Skin (cool weather)	6	300	3
Thyroid gland	1	50	160
Adrenal glands	0.5	25	300
Other tissues	3.5	175	1.3
Total	100.0	5000	

Based mainly on data compiled by Dr. L. A. Sapirostein.

Фигура 21 Стойности на кръвотока в различни органи

При Полицитемия вера увеличената еритроцитна клетъчна маса и плазмен обем водят до нарастване на обема на циркулираща кръв. В една затворена съдова система, вероятните компенсаторни механизми могат да включват увеличение обема на капацитивните съдове, депониране на кръв в далака и/или черния дроб, мускулите, или отваряне на някои шънтове. Така например при

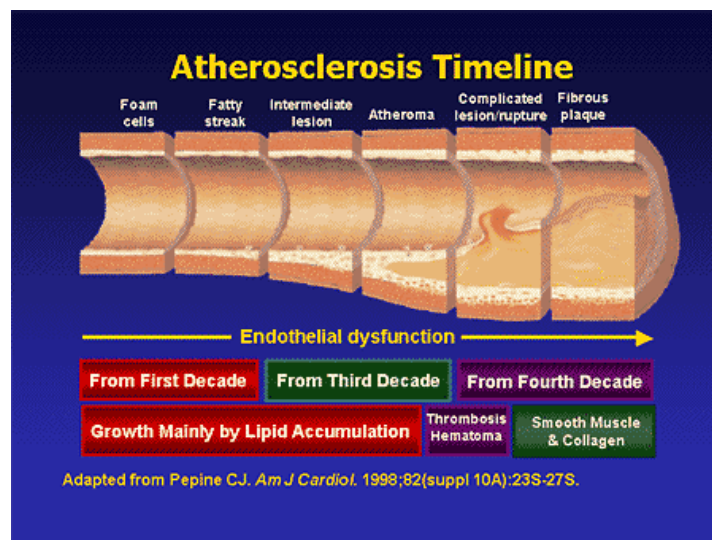
спокойно състояние кръвотока през мускулатурата, която представлява 40-50% от телесната маса е само 750 мл/мин което е 4 мл/мин/100 грама. При тежко натоварване, мускулния метаболизъм може да се увеличи повече от 60 пъти като кръвотока достига до 20 пъти, нараствайки до 16 000 ml / min в общите мускулни съдове (или 80 ml/мин/100 g мускул), което отговаря в голяма степен на въпроса как организма компенсира увеличената еритроцитна клетъчна маса при ПВ. На клетъчно ниво вероятно се променят агрегацията и деформабилността на циркулиращите еритроцити. Всъщност в литературата няма проучвания, систематизиращи компенсаторните механизми, които организмът развива за да поддържа хомеостазата на циркулиращата кръв. Според нас, именно изчерпването или нарушаването на тези механизми води до развитието на сърдечно-съдови инциденти.

Основна патофизиологична последица на Jak2^{V617F} мутацията при Полицитемия вера е независимата еритробластна пролиферация, което се доказва *in vitro* с образуването на спонтанни еритроидни клетъчни колонии. При някои патологични състояния, като например автоимунни хемолитични анемии, костно-мозъчната еритропоеза има потенциал да увеличи продукцията на еритроцити до десет пъти. При хроничната миелоидна левкемия левкоцитния брой нараства до 20-30 пъти. При Полицитемия вера максималния ръст на еритроцитите и хемоглобина е рамките на 50% - 60%. Това загатва, че *in vivo* на клетъчно или извънклетъчно ниво съществува друг комплексен регулаторен механизъм, които не е установен на този етап.

В заключение, промените на хематокрита дават моментна, статична, локална стойност в периферната вена, в която на практика не се развиват тромботични събития. Ако искаме да оценим истинското значение на променения хематокрит е удачно да го съпоставим с функционална оценка на кръвотока в критичните за организма съдове. Това означава, че нивото на натрупаните познания досега изисква смяна в подхода за оценка на тромботичните събития при ПВ и ЕТ. Изключително важно е този подход да бъде рационален, функционален и диференциран. Рационалността означава, че е необходимо не просто да търсим причини за тромбоза изобщо, а да проучим локалните причини за развитие на тромботични събития, най-вече тези с най-голям морбилитет и морталитет (исхемичен мозъчен инсулт, остър миокарден инфаркт, спланхникусова тромбоза). Същевременно с въвеждането на нови доплер-ехограски методики можем да оценим кръвотока и проследим промените му в тези жизненоважни органи. Тромбозата е мултифакторен процес. Никой фактор от триадата на Вирхоф самостоятелно не може да предизвика тромбоза, което значи, че съществуват множество механизми за нейното развитие. Патологичните фактори и условия са различни при

Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия. Нещо повече, има разлика във водещите причини за развитие на артериални (бели) и венозни (червени) тромби. Това означава, че са необходими диференцирани артериални и венозни тромботични модели за всяко от двете заболявания.

Възрастта отдавна е доказала своята роля като независим рисков фактор. Трудно е да се направи анализ на съвкупността от факторите, които тя изразява. Доказана е промяна в хемостазния баланс с увеличена тромбоцитната активност и повишени нива на факторите VII, VIII и фибриноген (Tracy, Bovill et al. 1992), при нормална фибринолиза. Вероятно с възрастта се развива отпадане или неефективност на компенсаторните механизми в локалния кръвоток и това води до развитието на съдови усложнения. Най-важната комплексна промяна, която настъпва в съдовете е развитието и прогресията на атеросклеротичния процес. На фигура 22 е показана еволюцията на атеросклеротичните промени, които настъпват с напредване на възрастта. Лумена на кръвоносните съдове прогресивно намалява с развитието на гладкомускулни и колагенови влакна. След като атеросклеротичния процес се променя и еволюира е логично пациентите да бъдат оценяване през интервал от време и да се провежда комплексно лечение.



Фигура 22 Еволюция на съдовите промени с възрастта. Виждат се необратимите качествени промени в съдовата стена, намалението на лумена, и прогресиращата ендотелна дисфункция.

(Stary HC et al. 1995)

Тромботичните събития при болните с Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия не са едномоментен процес на просто формиране на тромб водещ до нарушаване на нормалното кръвоснабдяване. Те са краен клиничен

резултат от нарушен баланс на продължително действащи тромбогенни и патогенни фактори на фона на изчерпани компенсаторни механизми. От тази гледна точка, вероятно съществуват множество различни патофизиологични сценария, които водят до формирането на съсирек. Както е показано на таблица 49 процесите на тромбообразуване са различни в различните отдели на съдовата система.

Таблица 40 Разлики между тромбообразуването в артерии и вени

Артериален или сърдечен тромб	Венозен тромб
<ul style="list-style-type: none"> Обикновено се развиват в участъци с ендотелна увреда или турбулентно движение (атеросклеротична плака или друга форма на увреждане като васкулит или травма) 	<ul style="list-style-type: none"> Типично се срещат в участъци със забавен кръвоток и стаза.
<ul style="list-style-type: none"> Нарастват в ретроградна посока от мястото на захващане 	<ul style="list-style-type: none"> Нарастват по посока на кръвотока към сърцето
<ul style="list-style-type: none"> Здраво свързани към увредения ендотел 	<ul style="list-style-type: none"> Пропагираща опашка-слабо свързана и склонна да отделя фрагменти, които образуват емболи (в белия дроб)
<ul style="list-style-type: none"> Състав: бледи на цвят, съставени от тромбоцити, фибрин, еритроцити и левкоцити 	<ul style="list-style-type: none"> Състав: смесен или червен тип, който съдържа повече еритроцити вследствие забавения кръвоток

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мутационния товар на $Jak2^{V617F}$, левкоцитозата, и променените стандартни хематологични показатели нямат значение за развитието на тромботични събития при Полицитемия вера. При Есенциална тромбоцитемия наличието на $Jak2^{V617F}$ увеличава риска от тромбози.

Факторите за вродена тромбофилия не толкова редки и значимо увеличават риска от тромботични събития, и е необходимо да се изследват при определени показания. Патологичните промени при двете заболявания включват множество компенсаторни механизми, които не са проучени добре.

Тромбозата е мултифакторен, многоетапен процес. Има множество сценарии, по които тя може да се развие, с участието на различни водещи механизми и патологични фактори. Необходим е по-комплексен изследователски и терапевтичен подход с оценка на атеросклеротичните промени, и включването на функционални методики за оценка на кръвотока в жизнено важни органи.

Патологичните фактори и условия за развитие на тромбози са различни при Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия. От друга страна има разлика във водещите механизми за развитие на артериални и венозни тромбози. Това означава, че са необходими диференцирани артериални и венозни тромботични индекси за всяко от двете заболявания.

ИЗВОДИ

1. Мутационният товар на $Jak2^{V617F}$, изследван чрез RT-PCR не влияе на честотата на тромботичните събития при Полицитемия вера, независимо от данните при експерименталните проучвания. При Есенциална тромбоцитемия наличието на мутация $Jak2^{V617F}$ води до несигнификантно нарастване на тромбозите.
2. Левкоцитният брой, установен при поставяне на диагнозата няма прогностично значение за развитието на тромботични събития.
3. Факторите за вродена тромбофилия значимо увеличават риска за тромботично събитие. Носителството на поне един генетичен дефект увеличава около 4 пъти тромбогенния риск в сравнение с лицата - носители. Двойното носителство е по-често при пациенти с тромботични събития, спрямо контролите и е свързано с нарастване на риска до 7 пъти.
4. Костно-мозъчната ангиогенеза корелира с мутационния товар и спленомегалията, но не корелира с честотата на тромботичните събития при пациенти с ПВ и ЕТ.
5. Липсата на корелация между мутационния товар на $Jak2^{V617F}$, левкоцитозата и честотата на тромботични събития при пациенти с Полицитемия вера не позволява включването им в разширен прогностичен индекс
6. Патологичните промени в стандартните хематологични изследвания са статичен показател, който не отразява динамиката в съдовата система и нямат сигнификантно влияние върху тромботичния процес.
7. Тромботичният процес при двете заболявания може да се развие по различни механизми. Необходимо е въвеждането на функционална оценка на кръвотока в рационално избрани критични области.
8. Удачно е съставянето на многокомпонентни прогностични модели, включващи представители на всеки елемент от триадата на Вирхов, включително функционална оценка на съдовата система, които да бъдат апробирани в клиничната практика.
9. Поради различните условия на тромбогенеза е необходимо създаването на тромбогенни индекси, различни не само за двете заболявания, но и за различните отдели на съдовата система (артериална и венозна).

ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален характер

1. Проведено е изследване на факторите за вродена тромбофилия и анализ на влиянието им върху троботичния процес при пациенти с ПВ и ЕТ.
2. Изследвана е връзката между костно-мозъчната ангиогенеза, спленомегалията и честотата на тромботични събития

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена е липсата на корелация между степента на мутационен товар на $Jak2^{V617F}$, изследван чрез qRT-PCR и честотата на ТС и са формулирани вероятните причини.
2. Потвърдена е липсата на корелация между промените в стандартните хематологични показатели, вкл. левкоцитозата при ПВ и ЕТ и честотата на ТС.
3. Потвърдена е корелационната зависимост между мутационния товар на $Jak2^{V617F}$, промените в стандартните хематологични показатели и степента на спленомегалия.

Приноси с приложен характер

1. Изработен е алгоритъм за изследване на факторите за вродена тромбофилия при пациенти с ПВ и ЕТ
2. Изработен е алгоритъм „какво? как? кога?“ за изследване на факторите за вродена тромбофилия.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1**ПОДХОД КОГА, КАКВО, КАК**

Подход Кога, Какво, Как за изследване на Вродено тромбофилия при болни с Полцитеимия вера и Есенциална тромбоцитемия.

Кога

1. След острия стадий на венозна тромбемболия, и приключване на активното консервативно лечение в случай, че от резултата зависи промяна в лечението.
2. Не трябва да се провежда на фона на антикоагулантна терапия:
 - a) антагонисти на vit K - 2 седмици,
 - b) директни антикоагуланти - 2 дни
 - c) нискомолекулен хепарин – 12 часа
3. Не трябва да се провежда при очевиден провокиращ фактор.

Какво

1. Фактор V Leiden
2. Мутация в гена на протромбина
3. Протеин С дефицит
4. Протеин S дефицит-
5. Антитромбин III
6. Антифосфолипиден синдром (анти-кардиолипинови антитела, анти- β_2 гликопротеин)

Как

Фактор за ВТ	Стъпка I	Стъпка II
Фактор V	aPC резистентност	PCR DNA анализ за FVL мутация
Мутация в гена на протромбина	PCR DNA анализ	
Протеин С дефицит	Функционален анализ	Определяне на PC антиген
Протеин S дефицит	Функционален анализ	Определяне на свободен или/общ PS антиген
Антитромбин III	активност	Определяне на ATIII ангитен
Пориморфизъм PLA1/A2	PCR DNA анализ	

ПРИЛОЖЕНИЕ 2 -АНКЕТНА КАРТА №

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

1. Име..... м: ж
2. Дата на Раждане: / / възраст: год.
3. Клинична диагноза : Полицитемия Вера: Есенциална Тромцититемия:
- дата на поставане на диагнозата/ ако е известна/: / / год.
 - повод за Dg/ анамнеза.....
 - клинични данни.....
 - първоначални отклонения
 - лабораторни.....
 - други.....
4. Минали и придружаващи заболявания и състояния:
- Инфаркт на Миокарда, ИБС, Хипертония, Сърдечна Недостатъчност, или др.ССЗ
 -
 - Диабет, Наднормено тегло, хиперлипидемия, неоплазия, други:.....
 -
 - предишни прояви на тромботични инциденти преди хематологичното заболяване
 - венозна тромбоза (ВТ) и възраст да не
 - венозен тромбоемболизъм (ВТ) възраст..... да не
 - информация касаеща само жени, относно изходи на бременности:
- ОТГОВОРА НЕ Е ЗАДЪЛЖИТЕЛЕН
- спонтанни аборта брой (.....); срок на бременността (.....)
5. Провокиращи фактори за тромботични събития да не
- ако “ да “ – кой от следните :
 - оперативна интервенция да не
 - травма да не
 - продължителна имобилизация да не
6. Допълнителни провокиращи фактори – тютюнопушене..... да не
7. Усложнение на заболяването прояви на тромбози или хеморагии локализация:
- тромбози да не
 - вени на долен крайник – дълбоки / повърхностни
 - други локализации:.....
 - хеморагии да не локализация.....
8. Лечение:
- провеждано в момента лечение на хематологичното заболяване.....
 - 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 фактори за тромбофилия в родственик от I степен. да не
12. Лекуващ лекар: д-р
13. Дата на вземане на материала: / /2017 год

I. ПУБЛИКАЦИИ В НАУЧНИ СПИСАНИЯ: :

1. **А. Антонов**, Л. Герчева, Н. Стефанова, М. Цанева, Т. Червенков. Оценка на корелацията между JAKV617F, левкоцитозата и тромбогенния риск при болни с Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия. Journal of IMAV 2018
2. К. Ковачева, **А. Антонов**. Наследствена тромбофилия – генетични дефекти и скрининг
Клинична и Трансфузионна хематология Януари 2007 год
3. **А. Антонов**, К. Ковачева, П. Иванов, Н. Цветков, Р. Комса-Пенкова, В.Славчева, Л. Богданов, И. Христов, А. Каменова, И. Иванов: Генетични дефекти за тромбофилия и риск за тромботични усложнения при пациенти с Есенциална тромбоцитемия и Полицитемия вера. II част – Принос на генетичните дефекти за тромбофилия върху риска за тромботични усложнения
Клинична и Трансфузионна хематология Януари 2007 год
4. К. Ковачева, **А. Антонов**, П. Иванов, Н. Цветков, Р. Комса-Пенкова, В.Славчева, Л. Богданов, И. Христов, А. Каменова, И. Иванов. Генетични дефекти за тромбофилия и риск за тромботични усложнения при пациенти с Есенциална тромбоцитемия и Полицитемия вера. I част – Честота на генетични дефекти за тромбофилия при пациенти с Есенциална тромбоцитемия и Полицитемия вера Януари 2007 год.
Клинична и Трансфузионна хематология Януари 2007 год
5. Вълкова А, Ковачева К, **Антонов А**, Иванов П.
Фактор V Leiden и C677T MTHFR генерични дефекти за тромбофилия, съчетани с хиперфибриногенемия, персистиращ висок CRP и левкоцитоза у новородено с перинатална инфекция – клиничен случай.
Akush Ginekol (Sofia). 2009;48(4):51-4
6. А. Желязкова, Л. Герчева, Л. Иванова, Н. Цветков, Антонио Антонов
Повишените плазмени нива на съдовия ендотелен растежен фактор и хепатоцитния растежен фактор при пациенти с хронични миелопролиферативни нарушения.
Клинична и трансфузионна хематология Януари 2003 г

II. СЪОБЩЕНИЯ НА НАУЧНИ ФОРУМИ

А. Антонов, Л. Герчева, К. Ковачев, Т. Червенков Ролята на Фактора Тромбофилия в прогностичния пълзел при болни с Полицитемия вера и Есенциална Тромбоцитемия

Национална конференция по хематология 05-07.10.2017 год.