

UNIVERSITATEA „LUCIAN BLAGA” DIN SIBIU
FACULTATEA DE MEDICINĂ



Universitatea Lucian Blaga Sibiu

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Contribuții la explorarea statusului
protrombotic
în neoplasmale mieloproliferative cronice
Philadelphia negative**

Coordonator științific,
Prof. Univ. Dr. Manuela Mihalache

Doctorand,
Ariela Ligia Olteanu

SIBIU
2016

Cuprins

INTRODUCERE	7
A. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	10
1. Neoplasmelor mieloproliferative cronice (NMP)	11
1.1. Caracteristici generale	11
1.1.1. Definiție, incidență	11
1.1.2. Repere istorice	11
1.2. Clasificarea neoplasmelor mieloide	12
2. Neoplasmelor mieloproliferative cronice Philadelphia negative (NMP Ph-)	15
2.1. Policitemia vera (PV)	15
2.1.1. Generalități	15
2.1.2. Criterii de diagnostic în PV	16
2.2. Trombocitemia esențială (TE)	17
2.2.1. Generalități	17
2.2.2. Criterii de diagnostic în TE	17
2.3. Mielofibroza primară (MFP)	18
2.3.1. Generalități	18
2.3.2. Criterii de diagnostic în MFP	19
2.4. Mutații moleculare în NMP Ph-	20
2.4.1. Mutația JAK2V617F	21
2.4.2. Mutația CALR – Calreticulina	24
2.4.3. Mutația MPL	25
2.4.4. Alte mutații genetice în NMP Ph-	25
2.5. Patogeneza trombozei în neoplasmelor mieloproliferative cronice Ph-	27
2.5.1. Factorii de risc trombotic în NMP Ph-	28
2.6. Tratamentul NMP Ph- și rolul în reducerea riscului de tromboză	38
2.7. Punct de vedere personal și perspective	40
3. Trombocitele, implicare în hemostază și în neoplazii	42
3.1. Introducere	42
3.2. Structura internă	42
3.3. Receptorii	43
3.4. Conținutul în ARN mesager (mARN)	44

3.5. Formarea trombusului plachetar	45
3.6. Interacțiunea trombocite-sistem de coagulare, teoria coagulării controlate de trombocite (“platelet-based coagulation”)	47
3.7. Categoriile de trombocite	48
3.8. Interacțiunea trombocite-celule maligne	49
3.9. Punct de vedere personal și perspective	51
B. CERCETAREA PERSONALĂ	53
1. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	54
2. Material de studiu și metodologia de lucru	55
2.1. Loturile de studiu	55
2.2. Metodologia de lucru	56
2.2.1. Determinarea indicilor trombocitari de volum	56
2.2.2. Testul de generare a trombinei (TGT)	56
2.2.3. Evaluarea expresiei de P-selectină prin citometrie în flux	57
2.2.4. Alte determinări ale testelor de laborator	58
2.3. Analiza statistică a datelor	58
2.4. Considerații etice	60
3. Studiu pilot. Influența unor variabilele preanalitice în măsurarea volumului trombocitar mediu: tipul anticoagulantului și timpul scurs între recoltarea sângelui și testare	61
3.1. Introducere	61
3.2. Obiective	61
3.3. Materiale și metode	61
3.3.1. Lotul de studiu	61
3.3.2. Metode de laborator	62
3.3.3. Analiza statistică	62
3.4. Rezultate	63
3.5. Discuții	64
3.6. Concluzii	65
4. Studiul nr. 1. Indicii trombocitari de volum în neoplazmele mieloproliferative cronice Philadelphia negative (NMP Ph-)	66
4.1. Introducere	66
4.2. Ipoteza de lucru și obiective	66

4.3. Materiale și metode	67
4.3.1. Lotul de studiu	67
4.3.2. Metode de laborator	67
4.3.3. Analiza statistică	68
4.4. Rezultate	68
4.5. Discuții	76
4.6. Concluzii	78
5. Studiul nr. 2. Evaluarea generării de trombină în neoplasmelor mieloproliferative cronice Philadelphia negative (NMP Ph-)	79
5.1. Introducere	79
5.2. Ipoteza de lucru și obiective	80
5.3. Materiale și metode	80
5.3.1. Lotul de studiu	80
5.3.2. Metode de laborator	80
5.3.3. Analiza statistică	83
5.4. Rezultate	84
5.5. Discuții	99
5.6. Concluzii ..	102
6. Studiul nr. 3. Evaluarea potențialului procoagulant al trombocitelor la pacienții cu neoplasmelor mieloproliferative cronice Philadelphia negative (NMP Ph-) prin Testul de Generare a Trombinei (TGT)	103
6.1. Introducere	103
6.2. Ipoteza de lucru și obiective	103
6.3. Materiale și metode	104
6.3.1. Lotul de studiu	104
6.3.2. Metode de laborator	104
6.3.3. Analiza statistică	108
6.4. Rezultate	108
6.5. Discuții	124
6.6. Concluzii	128
7. Studiul nr. 4. Evaluarea expresiei de P-selectină în neoplasmelor mieloproliferative cronice Philadelphia negative (NMP Ph-)	130
7.1. Introducere	130

7.2. Ipoteza de lucru și obiective	130
7.3. Materiale și metode	131
7.3.1. Lotul de studiu	131
7.3.2. Metode de laborator	131
7.3.3. Analiza statistică	135
7.4. Rezultate	135
7.5. Discuții	149
7.6. Concluzii	152
8. CONCLUZII GENERALE	153
9. Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei	156
Bibliografie.....	157
ANEXE	175
Lista abrevierilor	176
Lista tabelor	179
Lista figurilor	180
Lista de publicații	183

***Cuvinte-cheie:* neoplasme mieloproliferative, policitemia vera, trombocitemia esențială, mielofibroza primară, tromboze, generarea de trombină, P-selectina, indici trombocitari de volum**

Introducere

Neoplasmele mieloproliferative fără rearanjamentul *BCR-ABL*, denumite și Philadelphia negative (NMP Ph-) includ policitemia vera (PV), trombocitemia esențială (TE) și mielofibroza primară (MFP). Sunt afecțiuni clonale ale celulei stem hematopoietice a căror evoluție este marcată de complicații vasculare, în special trombotice. Markerii moleculari prezenți împreună cu histologia măduvei osoase și citogenetica au un rol important în diagnostic dar valoarea lor prognostică este încă în evaluare. Tratamentul citoreductiv și antiagregant este aplicat pentru prevenirea complicațiilor trombotice iar singurul mijloc potențial curativ este transplantul alogenic de celule stem hematopoietice.

Studiile desfășurate până în prezent au demonstrat că patogeneza trombozei este complexă și implică două componente de bază: prezența anomaliilor celulelor sanguine datorate proliferării clonale cu exprimarea unui fenotip protrombotic și răspunsul inflamator al peretelui vascular la acțiunea citokinelor și a altor molecule eliberate de celulele maligne.

Multe studii au avut ca scop evidențierea gradului de activare a trombocitelor din NMP Ph- și stabilirea de biomarkeri care să îl cuantifice. Au fost raportate creșteri ale markerilor de activare celulară ca: expresia de P-selectină și de factor tisular, a nivelului de agregate leuco-trombocitare și de microparticule circulante.

Activarea trombocitelor urmată de expunerea suprafeței fosfolipidice duce la creșterea generării de trombină evidențiată *in vivo* prin creșterea nivelului de complexe trombină-antitrombină (TAT), de D-Dimeri și a fragmentelor F1+2 ale protrombinei iar *in vitro* prin creșteri ale parametrilor de generare a trombinei (TGT). Studiile au furnizat dovezi ale implicării eritrocitelor, leucocitelor și a celulelor endoteliale în creșterea hipercoagulabilității sângelui în NMP Ph-.

Odată cu descoperirea mutației *JAK2V617F* s-a deschis o nouă eră pentru cercetarea patogenezei în complicațiile trombotice din NMP. În ultima decadă și alte mutații genetice, generatoare de fenotipuri diferite, ca *MPL* și *CALR* au fost incluse în criteriile de diagnostic în PV, TE și MFP. Unele studii au raportat asocierea mutațiilor (în special a mutației *JAK2V617F*) cu creșterea markerilor de activare celulară și plasmatică și au studiat influența nivelului de încărcătura cu alelă mutantă în patogeneza și incidența trombozelor din NMP Ph-.

Tratamentul citoreductiv aplicat în NMP Ph- nu este curativ, are ca scop reducerea evenimentelor trombotice la pacienți prin modularea stării de hipercoagulabilitate.

Actualele cercetări ținesc dezvoltarea de markeri prognostici și dezvoltarea de molecule care să modifice cursul actual al evoluției bolii în NMP Ph-. În acest context am considerat interesant și oportun să abordez tema de cercetare personală prin teste de hemostază noi sau mai puțin utilizate în țară.

Teza este alcătuită din partea generală (Stadiul actual al cunoașterii), care realizează o sinteză a datelor din literatură referitoare la NMP Ph- și din partea specială, destinată cercetării personale.

Stadiul actual al cunoașterii

Stadiul actual al cunoașterii este structurat în trei capitole: ”Neoplasmelor mieloproliferative cronice”, ”Neoplasmelor mieloproliferative cronice Philadelphia negative” și ultimul capitol ”Trombocitele, implicare în hemostază și în neoplazii”.

Primul capitol definește noțiunea de neoplasm mieloproliferativ și prezintă cea mai recentă clasificare, din 2016, a neoplasmelor mieloide.

Al doilea capitol, structurat în 7 subcapitole, este un preambul al contribuției personale în care sunt prezentate neoplasmelor mieloproliferative Ph-, policitemia vera (PV), trombocitemia esențială (TE) și mielofibroza primară (MFP). Sunt abordate criteriile de diagnostic, mutațiile somatice prezente, patogeniza trombozei și rolul tratamentului în reducerea evenimentelor vasculare.

Al treilea capitol al tezei, dedicat trombocitelor, este structurat în 9 subcapitole scurte în care am prezentat structura trombocitelor, implicarea lor în hemostaza primară și în cascada coagulării, prezența și rolul ARN mesager în trombotite, o nouă teorie a coagulării controlate de trombocite precum și tipurile diferite de trombocite care participă la formarea trombusului plachetar. În subcapitolul ”Interacțiunea trombocite-celule maligne” am subliniat participarea trombocitelor la dezvoltarea neoplasmelor, la formarea metastazelor și în apariția complicațiilor vasculare din neoplazii.

Cercetarea personală

Cercetarea personală este piesa cheia a tezei și cuprinde 4 studii de bază și un studiu pilot. Partea experimentală a fost efectuată în Laboratorul de analize medicale al Spitalului

Clinic Județean de Urgență Sibiu care cuprinde un laborator de cercetare al Universității "Lucian Blaga" din Sibiu.

Obiectivul general al acestei cercetări a fost evidențierea stării de hipercoagulabilitate la pacienții NMP Ph-, prin evaluarea nivelului de trombină generată *in vitro* în plasma bogată și săracă în trombocite, prin cuantificarea expresiei de P-selectină exprimată pe membrana trombocitelor activate și prin determinarea indicilor trombocitari de volum.

În lotul general al pacienților (NMP Ph-) și în subploturile de pacienți cu diagnosticul de policitemia vera (PV), trombocitemie esențială (TE) și mielofibroză (MF) am intenționat să stabilesc o corelație între variabilele cuantificabile ale fiecărui test utilizat cu prezența mutației *JAK2V617F*, a antecedentelor de tromboză, a factorilor de risc cardiovascular precum și cu influența tratamentului citoreductiv și/sau antiagregant.

Pentru atingerea obiectivelor propuse am selectat pacienți cu diagnosticul de neoplasm mieloproliferativ cronic cromozom Philadelphia negativ (NMP Ph-), de ambele sexe. Lotul de pacienți a fost heterogen deoarece a cuprins pacienți cu diagnosticul de policitemia vera (PV), trombocitemie esențială (TE) și mielofibroză (MF). Diagnosticul de NMP Ph- a fost stabilit pe baza criteriilor stabilite de World Health Organization (WHO) din 2001 și 2008. Pacienții diagnosticați cu mielofibroză (MF) post-PV sau post-TE, conform criteriilor Grupului internațional de lucru pentru cercetarea mielofibrozei, au fost incluși în grupul MF împreună cu pacienții MFP.

Toți pacienții incluși în studii se aflau în evidența Clinicii de Hematologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Sibiu. Studiile pe care le-am efectuat au fost studii prospective, caz-control și au cuprins pentru fiecare studiu câte un lot martor format din subiecți sănătoși, de ambele sexe. Deoarece studiile s-au desfășurat consecutiv, loturile de pacienți și loturile martor au fost diferite pentru fiecare studiu. Pentru compararea rezultatelor obținute pacienții cu diagnosticul de MNP Ph- au fost grupați în subploturi de diagnostic (PV, TE și MF) și în funcție de prezența/absența mutației *JAK2V617F*, a evenimentelor trombotice, a prezenței factorilor de risc cardiovascular și în funcție de tratamentul primit.

În lotul martor am inclus subiecți fără istoric de evenimente trombotice sau hemoragice, simptome de infecție acută sau de boli inflamatorii cronice, fără tratament anticoagulant oral sau antiagregant.

Metodologia de lucru

Determinarea indicilor trombocitari de volum

Indicii trombocitari de volum (ITV), volumul trombocitar mediu (VTM), lărgimea distribuției trombocitelor (PDW) și raportul de trombocite mari (P-LCR), au fost furnizați în

hemoleucograma completă de analizorul de hematologie. VTM este exprimat în femtolitri (fl) și a fost calculat de analizorul de hematologie după următoarea ecuație: $VTM(fl) = [(plateletcrit \% / Num\text{ar trombocite} \times 10^3/\mu L) \times 10000]$. Ceilalți indici trombocitari, PDW și P-LCR au fost calculați din curba de distribuție a mărimii trombocitelor. Pentru PDW, analizorul utilizează 3 discriminatori, 2 mobili între 2-6 fl și 12-30 fl și unul fix la 12 fl. P-LCR reprezintă procentul de trombocite cu $VTM > 12$ fl.

Testul de generare a trombinei (TGT)

TGT este un test funcțional care măsoară cantitatea de trombină generată, după activarea coagulării, *in vitro*, cu factor tisular sau alt *trigger*.

Testul de generare a trombinei a fost efectuat în plasmă săracă în trombocite (PPP) și în plasmă bogată în trombocite (PRP) folosind Technothrombin® TGA reagents kit (Technoclone, Vienna, Austria) pentru analizorul automat Ceveron® alpha. Testul se bazează pe monitorizarea fluorescenței produse prin clivarea unui substrat fluorogenic de către trombina generată, după activarea cascadei coagulării cu diferite concentrații de factor tisular (FT) și de fosfolipide încărcate negativ, în plasma pacienților. Concentrația de trombină generată în plasmă (nM), în timp, a fost calculată folosind o curbă de calibrare specifică fiecărui lot de reactivi. Rezultatele au fost calculate automat de către *software*-ul analizorului Ceveron® alpha care a furnizat următorii parametri:

- *Lag time (phase) (min)*, se măsoară din momentul adăugării reactivilor TGT până la prima generare de trombină (*first burst*);
- *Peak Thrombin (nM)*, este concentrația maximă de trombină generată;
- *Time to peak (min)*, timpul necesar atingerii concentrației maxime de trombină produsă;
- *Velocity index sau slope (nM/min)* = peak thrombin/peak time - lag time;
- *Area under the curve (AUC) (nM)*, concentrația totală de trombină formată în intervalul de timp; parametru cunoscut și ca potențial trombinic endogen (ETP);

Această curbă integrează toate reacțiile procoagulante și anticoagulante, formarea și inhibarea trombinei, cuprinzând faza de inițiere, propagare și faza terminală a cascadei coagulării. Este obținută din semnalul fluorescent care se dezvoltă când plasma coagulează în prezența substratului fluorogenic pentru trombină.

Analizorul automat Ceveron® alpha dispune de patru canale de măsurare cu modul fluorometric pentru TGT format din UV LED (365nm) pentru excitație și o fotodiodă pentru măsurarea semnalului emis, plasat în rotorul cuvetelor (termostatat).

Evaluarea expresiei de P-selectină prin citometrie în flux

Citometria în flux este o tehnică care măsoară rapid și specific caracteristicile unui număr mare de celule individuale și este tot mai mult folosită pentru evidențierea și evaluarea activării celulare precum și pentru măsurarea *in vitro* a răspunsului trombocitelor la anumiți stimuli.

Principiul de măsurare se bazează pe analiza cantitativă a mai multor parametri marcați fluorescent concomitent cu analiza caracteristicilor celulare. Pentru identificarea trombocitelor și a expresiei anumitor antigene sunt folosiți anticorpi monoclonali sau policlonali conjugați cu fluorocromi care sunt direcționați către glicoproteinele (GP) membranare și către liganzii lor. Astfel marcate, trombocitele trec prin fața unei raze de laser care activează fluorosferele. Pe baza fluorescenței emise și a caracteristicilor luminii dispersate se pot identifica celulele de interes.

Evaluarea expresiei de P-selectină (CD62P) am realizat-o cu ajutorul flow-citometrului Cytomics FC 500 Beckman Coulter (laser cu argon/excitație la 488 nm).

Testarea a fost efectuată din sânge integral, în maxim 20 minute de la recoltarea sângelui cu și fără adăugare *in vitro* de TRAP-6 (agonist). Pentru analiza trombocitelor a fost necesară setarea flow-citometrului pentru achiziția acestora.

Alte determinări ale testelor de laborator

Hemoleucograma completă a fost efectuată cu analizorul Sysmex XT 2000i și XS 1000i iar testele de coagulare cu coagulometrul automat Sysmex CA 1500. Testele de biochimie au fost efectuate cu analizorul Architect c 8000.

Determinarea mutației moleculare *JAK2V617F* a fost efectuată în laboratoare de genetică moleculară. Tehnicile folosite pentru detecție au fost: tehnica de amplificare ARMS-PCR descrisă de Jones et al. și metoda real time PCR descrisă de Larsen, modificată.

Analiza statistică

Pentru analiza datelor am folosit programul IBM SPSS versiunea 20 și 21 și EPI INFO versiunea 6. Datele au fost considerate nominale și cantitative. Variabilele nominale au fost caracterizate ca frecvență și procente iar variabilele cantitative prin medie și deviația standard pentru variabilele cu distribuție normală și prin mediană și percentile pentru variabilele fără distribuție normală. Am folosit testul Kolmogorov-Smirnov pentru a verifica distribuția normală a variabilelor cantitative. Compararea între două grupuri cu distribuție normală a variabilelor cantitative a fost efectuată folosind testul Student (T-Test), iar pentru cele fără distribuție normală testul Mann-Whitney (MW) și testul Median (Med-T). Corelația între două variabile continue s-a făcut cu testul Pearson sau Spearman's rho. Pentru analiza de

varianță s-a utilizat testul ANOVA (A) pentru variabilele cu distribuție normală și Kruskal-Wallis (K-W) pentru variabilele fără distribuție normală. Pentru compararea frecvențelor valorilor la variabile nominale s-a utilizat testul Hi-pătrat (H_i^2). Analiza de regresie multiplă a fost folosită pentru a studia influența anumitor variabile cantitative ca vârsta, IMC, lungimea tratamentului, asupra parametrilor cuantificați în fiecare studiu. Am considerat diferențele semnificative statistic dacă $p < 0.05$.

Studiu pilot. Influența unor variabile preanalitice în măsurarea volumului trombocitar mediu: tipul anticoagulantului și timpul scurs între recoltarea sângelui și testare”

Obiective: În acest studiu am evaluat influența tipului de anticoagulant și a timpului scurs între recoltarea sângelui și testare asupra valorilor volumului trombocitar mediu (VTM) în condițiile specifice laboratorului nostru. Studiul s-a desfășurat în cadrul studiului „Indicii trombocitari de volum în neoplazmele mieloproliferative cronice Philadelphia-negative (NMP Ph-)”.

Materiale și metode: Studiul a inclus un lot de pacienți cu diagnosticul de NMP Ph- ($n= 102$) și un lot de control ($n=57$) format din subiecți sănătoși pentru care am respectat criteriile de includere enunțate anterior.

Hemoleucograma a cuprins și valorile indicilor trombocitari și a fost efectuată cu analizorul de hematologie Sysmex XS 1000i prin metoda de impedanță cu focusare hidrodinamică. Am testat probele de sânge la 30 minute și la 2 ore de la recoltare, atât din tuburile vidate cu conținut de K2EDTA cât și din cele cu citrat de sodiu 3.2%.

Rezultate: Studiul a relevat o diferență semnificativă între VTM măsurat din tuburile vidate cu conținut de K2EDTA în comparație cu cel măsurat din tuburile cu citrat de sodiu 3.2% atât la 30 minute cât și la 2 ore după recoltarea sângelui. Diferențele au fost înregistrate atât în grupul de pacienți cât și în cel de control. Valorile VTM măsurate din tuburile vidate cu conținut de citrat de sodiu au fost semnificativ mai mici în comparație cu valorile măsurate din tuburile vidate cu conținut de K2EDTA ($p<0.001$). Valorile VTM din tuburile cu conținut de K2EDTA, măsurate la 30 minute și la 2 ore, au relevat o diferență semnificativă pe care nu am observat-o din tubul cu citrat de sodiu ($p<0.001$).

Concluzii: Studiul pilot a demonstrat influența tipului de anticoagulant și a timpului scurs între recoltarea sângelui și procesare asupra valorilor VTM, măsurate prin metoda impedanței. Rezultatele au arătat că stocarea sângelui în tuburi ce conțin K2EDTA duce la o creștere progresivă a valorilor VTM posibil datorită activării trombocitelor. Probele de sânge

recoltate pentru determinarea hemoleucogramei sunt procesate în momente diferite în laboratoarele de analize medicale iar pentru ca VTM să fie util pentru interpretare clinică trebuie determinat în condiții preanalitice standardizate.

Studiul nr. 1. Indicii trombocitari de volum în neoplasmelor mieloproliferative cronice Philadelphia negative (NMP Ph-)

Ipoteza de lucru și obiective: Indicii trombocitari de volum (ITV) alături de numărul de trombocite caracterizează populația de trombocite și sunt furnizați în hemoleucograma completă. Deoarece s-a raportat că trombocitele din NMP Ph- circulă în stare activată în sânge, am considerat că starea de activare se poate corela cu valorile ITV la pacienții cu policitemia vera (PV), trombocitemia esențială (TE) și mielofibroză (MF).

Obiectivul studiului a fost determinarea valorilor ITV (VTM, PDW, P-LCR), la pacienții cu diagnosticul de NMP Ph- în comparație cu valorile unui grup de control format din subiecți sănătoși și corelarea lor cu prezența mutației *JAK2V617F*, cu istoricul de tromboze, cu tratamentul precum și cu factorii de risc cardiovascular prezenți.

Materiale și metode: În acest studiu am testat 102 pacienți cu diagnosticul de NMP Ph-, (36 cu PV, 54 cu TE, 12 cu MF) și 102 subiecți sănătoși înrolați voluntar, cu respectarea criteriilor de includere enunțate anterior, ca lot martor.

Hemoleucograma a cuprins și valorile indicilor trombocitari și a fost efectuată cu analizorul de hematologie Sysmex XS 1000i prin metoda de impedanță cu focusare hidrodinamică în prima oră de la recoltarea sângelui.

Rezultatele studiului nu au evidențiat o diferență semnificativă statistic între valorile VTM, PDW și P-LCR ale lotului total de pacienți cu NMP Ph- în comparație cu cele ale lotului martor. S-a remarcat o distribuție mai largă a valorilor pentru P-LCR la pacienții diagnosticați cu TE. Pacienții cu MF au avut valori pentru P-LCR semnificativ mai mici ($p=0.02$) în comparație cu lotul de control.

Valorile ITV nu au fost semnificativ diferite între grupul pacienților cu tromboze venoase sau arteriale în antecedente în comparație cu cele ale pacienților care nu au prezentat evenimente trombotice. Am observat diferențe între valorile indicilor trombocitari la pacienții purtători ai mutației *JAK2V617F* în comparație cu cei wilde type (WT, fără mutație) dar diferențele nu au fost semnificative statistic.

Pacienții tratați cu anagrelide au relevat valori ale ITV semnificativ mai mari în comparație cu pacienții care nu au primit acest tratament ($p<0.002$). Nu am remarcat

influențe ale tratamentului cu aspirină și hidroxiureea (HU) asupra valorilor VTM și P-LCR doar valorile PDW au fost semnificativ mai mici la acești pacienți ($p < 0.05$). În grupul pacienților cu tratament hipolipemiant (statine) valorile ITV (VTM, PDW și P-LCR) au fost semnificativ mai mici în comparație cu ale pacienților fără tratament cu statine ($p=0.022$, $p=0.009$, $p=0.008$).

Valorile indicilor trombocitari nu s-au corelat cu vârsta sau prezența factorilor de risc cardiovascular.

Concluzii: Valorile ITV măsurate prin metoda impedanței nu au relevat valori semnificativ mai mari la pacienții NMP Ph- în comparație cu grupul de control. Valorile VTM, PDW și P-LCR au fost semnificativ mai crescute la pacienții tratați cu anagrelide în comparație cu cei fără acest tratament. Am observat o corelație între ITV și prezența mutației *JAK2V617F*. La pacienții cu tratament hipolipemiant (statine) s-au obținut valori semnificativ mai scăzute pentru VTM, PDW și P-LCR în comparație cu restul lotului de pacienți NMP Ph- fără tratament cu statine. Datorită numărului mic de pacienți din grupul studiat sunt necesare alte studii pentru a demonstra corelația între ITV și mutația *JAK2V617F*, precum și influența tratamentului cu anagrelide și statine asupra acestor indici.

Studiul nr. 2. Evaluarea generării de trombină în neoplasmele mieloproliferative cronice Philadelphia negative (NMP Ph-)

Ipoteza de lucru și obiective: NMP Ph- sunt caracterizate de modificări profunde ale numărului și funcției celulelor sanguine care împreună cu modificările din plasmă pot fi responsabile de statusul protrombotic demonstrat în PV, TE și MFP. Testele screening de coagulare nu reflectă aceste modificări în timp ce testul de generare a trombinei, ca test global de coagulare, este potrivit pentru detectarea statusului procoagulant în NMP Ph-.

Obiectivul studiului a fost determinarea nivelului de trombină generată în plasma pacienților cu diagnostic de NMP Ph- în comparație cu un lot de control și corelarea rezultatelor cu prezența mutației *JAK2V617F*, a evenimentelor trombotice, a tratamentului și a factorilor de risc cardiovascular (hipertensiune arterială, diabet zaharat, dislipidemie, fumat, obezitate).

Acesta este primul raport care descrie măsurarea trombinei generate în plasma pacienților cu NMP Ph- cu ajutorul analizorului automat Ceveron® Alpha.

Materiale și metode: În studiu am evaluat 89 de pacienți cu diagnosticul de NMP Ph- (26 cu PV, 51 cu TE și 12 cu MF) în acord cu criteriile WHO din 2001 și 2008. Pacienții cu

tratament anticoagulant nu au fost incluși în studiu. Lotul martor a cuprins 78 de subiecți sănătoși incluși voluntar cu respectarea criteriile de includere.

Testul de generare a trombinei a fost efectuat în plasma săracă în trombocite (PPP) folosind Technothrombin® TGA reagents kit (Technoclone, Vienna, Austria) pentru analizorul automat Ceveron® alpha cu respectarea protocolului indicat de către producător. Toate testele de generare a trombinei au fost efectuate de către autorul acestui studiu.

Rezultate: Doi parametri ai curbei de generare a trombinei au fost semnificativ crescuți la pacienți în comparație cu lotul de control: peak thrombin ($p=0.049$ -A) și velocity index ($p=0.012$ -A). Restul parametrilor TGT nu au evidențiat diferențe semnificative statistic între valorile pacienților și cele ale martorilor.

În lotul de pacienți s-a observat o corelație pozitivă (Pearson) între hemoglobină (Hb) și lag time ($R=0.230$, $p=0.03$), între Hb și peak thrombin ($R=0.257$, $p=0.015$) și între numărul de leucocite și peak thrombin ($R_s=0.213$, $p=0.046$). Nu am observat corelații între numărul de trombocite și parametrii TGT în grupul de pacienți sau în subgrupele NMP Ph- (PV, TE sau MF).

La analiza parametrilor TGT pentru toate subgrupele de diagnostic (PV, TE și MF) în comparație cu lotul de control am constatat: un lag time mai lung la pacienții cu PV ($p=0.03$ -T) și o creștere semnificativă statistic a valorilor pentru VI ($p=0.002$ -MW) și peak thrombin ($p=0.004$ -T) la pacienții din subgrupul TE.

Comparând rezultatele între subgrupele de diagnostic s-a observat că pacienții cu TE au valori ale peak thrombin și AUC semnificativ mai mari în comparație cu pacienții cu MF ($p=0.046$ -T, și $p=0.015$ -T) și un VI mai crescut ($p=0.022$ -MW) în comparație cu pacienții cu diagnosticul de PV.

Influența tratamentului citoreductiv asupra generării de trombină s-a relevat prin valori semnificativ mai crescute ale peak thrombin ($p=0.043$ -MW) și VI ($p=0.042$ -MW) obținute în grupul de pacienți tratați numai cu anagrelide în comparație cu cel tratat cu HU. În grupul de pacienți ($n=10$) cu tratament combinat (anagrelide și HU) s-au observat valori semnificativ mai mici pentru peak thrombin și VI în comparație cu grupul pacienților tratați doar cu anagrelide ($p=0.02$ -MW și $p=0.024$ -MW). Între durata tratamentului citoreductiv și parametrii TGT, peak thrombin, VI și AUC, s-a observat o corelație inversă negativă ($R= -0.25$, $p=0.018$; $R= -0.257$, $p=0.015$ și $R= -0.21$, $p=0.048$).

Pacienții purtători ai mutației *JAK2V617F* au prezentat valori mai scăzute pentru peak thrombin, VI și AUC în comparație cu pacienții WT, dar rezultatele nu au atins o diferență semnificativă statistic.

Nu au fost observate diferențe semnificative între valorile TGT ale pacienților cu antecedente trombotice în comparație cu cei fără evenimente trombotice ($p > 0.05$ -T).

Prezența factorilor de risc cardiovascular (HTA, DZ, dislipidemie, fumat și obezitate) nu a determinat valori mai crescute ale parametrilor TGT ($p < 0.05$).

Nivelul de trombină generată nu a variat semnificativ în funcție de gen (barbați și femei) și nu a fost influențat de vârstă. Astfel, am concluzionat că diferența în distribuția loturilor în funcție de vârstă și gen nu a avut influență semnificativă asupra valorilor parametrilor TGT.

Concluzii: În studiul actual am demonstrat o diferență semnificativă statistic între nivelul de trombină generată de plasma pacienților cu NMP Ph- și cea a subiecților sănătoși. În subgrupele de diagnostic NMP Ph-, pacienții cu TE au generat cel mai înalt nivel de trombină.

Valorile parametrilor TGT, peak thrombin și VI, au fost semnificativ mai scăzute la pacienții tratați cu HU în comparație cu cei tratați cu anagrelide, rezultat ce demonstrează superioritatea tratamentului cu HU în reducerea nivelului de trombină generată la pacienții NMP Ph-. Am observat o corelație inversă între parametrii TGT și durata tratamentului citoreductiv și o corelație slabă pozitivă între hemoglobină și lag time, între Hb și peak thrombin și între numărul de leucocite și peak thrombin.

Rezultatele studiului conduc la concluzia că TGT este un test util pentru explorarea statusului protrombotic individual și pentru monitorizarea răspunsului la tratamentul citoreductiv în NMP Ph-.

Studiul nr. 3. Evaluarea potențialului procoagulant al trombocitelor la pacienții cu neoplasme mieloproliferative cronice Philadelphia negative (NMP Ph-) prin Testul de Generare a Trombinei (TGT)

Ipoteza de lucru și obiective: Rezultatele semnificative statistic obținute în studiul anterior, generarea de trombină în PPP, au condus la proiectul actualului studiu în care am intenționează să evaluez gradul de implicare al trombocitelor în generarea trombinei la pacienții cu NMP Ph-. Am considerat că plasma bogată în trombocite (PRP) este un mediu asemănător celui în care se desfășoară procesul de coagulare *in vivo* iar trombocitele preactivate ale pacienților NMP Ph- pot crește nivelul de trombină generată.

În studiul am evaluat prin TGT potențialul trombocitelor din MPN Ph- de generare a trombinei cu ajutorul analizorului automat Ceveron® alpha. Parametrii TGT, lag time, peak

thrombin, VI și AUC, au fost evaluați în relație cu: statusul mutației *JAK2V617F* și tratamentul citoreductiv, prezența antecedentelor trombotice sau a factorilor de risc cardiovascular (hipertensiune arterială, diabet zaharat, dislipidemie, fumat, obezitate).

Este primul studiu care raportează evaluarea nivelului de generare a trombinei în PRP la pacienții cu neoplasme mieloproliferative cronice Ph negative folosind analizorul complet automat Ceveron® alpha.

Materiale și metode: Acest studiu prospectiv a cuprins 76 de pacienți cu diagnosticul de NMP Ph-, 23 pacienți cu PV, 44 cu TE și 9 cu MF și un lot martor format din 60 de subiecți sănătoși incluși voluntar în studiu cu respectarea criteriilor de includere.

În ambele grupuri de studiu condițiile preanalitice precum și tehnica de măsurare a generării trombinei au fost respectate identic.

Testul de generare a trombinei a fost efectuat în PRP folosind Technothrombin® TGA reagents kit (Technoclone, Vienna, Austria) pentru analizorul automat Ceveron® alpha, cu respectarea protocolului indicat de către producător. Toate testele TGT au fost efectuate de către autorul studiului.

Rezultate: Rezultatele studiului au arătat diferențe semnificative statistic între lotul de pacienți și cel de control pentru următoarele variabile TGT: peak thrombin ($p=0.0001$ -MW), velocity index ($p=0.0001$ -MW) și pentru potențialul trombinic endogen/AUC ($p=0.008$ -MW).

În lotul de pacienți am observat corelații neparametrice Spearman pozitive între: peak thrombin și numărul de leucocite ($R_s=0.321$, $p=0.006$) și de trombocite ($R_s=0.242$, $p=0.038$), între VI și numărul de leucocite ($R_s=0.299$, $p=0.01$) și de trombocite ($R_s=0.252$, $p=0.03$). O corelație pozitivă s-a evidențiat între Ht și peak thrombin ($R_s=0.271$, $p=0.019$).

Din analiza parametrilor TGT pentru toate subloturi de pacienți (PV, TE, și MF) în comparație cu lotul martor s-au constatat diferențe semnificative statistic între lotul martor și PV pentru peak thrombin ($p=0.045$ -T) și VI ($p=0.023$ -MW) și diferențe înalt semnificative statistic între lotul martor și TE pentru peak thrombin ($p=0.0001$ -MW), VI ($p=0.0001$ -MW) și AUC ($p=0.0001$ -T).

Comparând prin testul Kruskal-Wallis valorile parametrilor TGT între aceste subgrupe de diagnostic am constatat diferențe semnificative doar pentru potențialul trombinic endogen (AUC) ($p=0.003$ -KW).

Pacienții tratați cu anagrelide au relevant valori crescute semnificativ statistic pentru AUC în comparație cu cei tratați cu HU ($p=0.011$ -T). S-a constatat o corelație semnificativă statistic, inversă, negativă (Pearson) între durata tratamentului citoreductiv și parametrii TGT

peak thrombin ($R = -0.336$, $p = 0.003$) VI ($R = -0.310$, $p = 0.006$) și AUC ($R = -0.233$, $p = 0.043$).

Pacienții purtători ai mutației *JAK2V617F* au avut valori semnificativ statistic mai mici pentru potențialul trombinic endogen (AUC) în comparație cu cei fără mutație ($p = 0.016$ -MW).

Nu s-a constatat o diferență semnificativă între valorile parametrilor TGT la pacienții cu tromboze în antecedente în comparație cu cei fără evenimente trombotice ($p > 0.05$ -T).

Parametrii TGT nu au fost semnificativ modificați la pacienții ce au prezentat factori de risc cardiovascular: hipertensiune arterială, dislipidemie, diabet zaharat sau la fumători în comparație cu cei fără acești factori de risc. Totuși, s-a observat o corelație pozitivă (Spearman) între peak thrombin ($R_s = 0.232$, $p = 0.044$), VI ($R_s = 0.227$, $p = 0.048$) și AUC ($R_s = 0.237$, $p = 0.039$) și indicele de masă corporală (IMC) ceea ce arată că acești parametri au o tendință de creștere cu creșterea IMC.

În cele două grupe de studiu, martor și pacienți, vârsta a fost semnificativ diferită. A existat o corelație semnificativă statistic între vârstă și parametrii TGT: peak thrombin, VI și AUC, slabă ($R < 0.25$) cu o influență foarte mică (de cel mult 5%) asupra variației parametrilor TGT. Nu am obținut diferențe semnificative statistic ale variabilelor TGT, în lotul de pacienți, în funcție de gen (barbați și femei).

Concluzii: Plasma bogată în trombocite a pacienților cu NMP Ph- a generat un nivel semnificativ mai mare de trombină în comparație cu cel al subiecților sănătoși. Aceste rezultate demonstrează un potențial procoagulant crescut al trombocitelor din NMP Ph-, ce poate crește riscul trombotic chiar sub tratament citoreductiv.

Am observat corelații pozitive între peak thrombin și Ht, numărul de leucocite și numărul de trombocite și între VI și numărul de leucocite și de trombocite. Aceste corelații susțin implicarea eritrocitelor, leucocitelor și a trombocitelor, prin modificările cantitative și calitative, în patogeneza trombozei la pacienții NMP Ph-.

Corelația inversă între parametrii TGT și durata tratamentului citoreductiv observată poate fi utilă pentru monitorizarea răspunsului la tratamentul citoreductiv și pentru evaluarea gradului de risc trombotic.

Plasma pacienților tratați cu HU a generat un nivel mai scăzut de trombină în comparație cu cea a pacienților tratați cu anagrelide ceea ce sugerează un efect modulator al HU asupra nivelului de trombină produs în NMP Ph-.

Variabilitatea parametrilor TGT în raport cu loturile de purtători ai mutației *JAK2V617F* (heterozigoți și homozigoți) și cei WT, a fost semnificativă statistic doar pentru

potențialul trombinic endogen (AUC). S-a observat o corelație pozitivă între parametrii TGT (peak thrombin, VI și AUC) și IMC.

Studiul nr. 4. Evaluarea expresiei de P-selectină în neoplazmele mieloproliferative cronice Philadelphia negative (NMP Ph-)

Ipoteza de lucru și obiective: Gradul de activarea a trombocitelor în NMP Ph- și răspunsul la stimulare cu agoniști se poate evalua prin cuantificarea expresiei de P-selectină.

Rezultatele studiilor anterioare și ale cercetării personale, au evidențiat un nivel crescut de trombină generată la pacienții NMP Ph- în comparație cu subiecții sănătoși.

Aceste rezultate precum și corelația inversă între nivelul de trombină generată și gradul de răspuns a trombocitelor la stimulare *in vitro*, raportat în unele studii, a condus la conceperea și la efectuarea studiului actual, în care am avut ca obiectiv determinarea gradului de activare și de răspuns la agoniști a trombocitelor pacienților cu diagnosticul de NMP Ph-.

Cuantificarea expresiei de P-selectină (CD62P) s-a efectuat prin tehnica de citometrie în flux. Gradul de răspuns al trombocitelor la agoniști l-am analizat folosind TRAP-6 (*thrombin-receptor activating peptide-6*) în concentrație submaximală și maximală de stimulare a trombocitelor.

Am analizat expresia P-selectinei (CD62P) în comparație cu un grup de control și în relație cu prezența mutației *JAK2V617F*, a tratamentului urmat de către pacienți, a prezenței istoricului de tromboze precum și în relație cu prezența sau absența factorilor de risc cardiovascular.

Materiale și metode: În studiu actual am testat 68 de pacienți cu diagnosticul de NMP Ph-, 18 pacienți cu PV, 43 cu TE și 7 cu MF. Lotul de control a inclus 47 de subiecți sănătoși care au fost înrolați voluntar în studiu. În ambele grupuri de studiu condițiile preanalitice precum și tehnica de măsurare a expresiei de P-selectină au fost respectate identic.

Evaluarea expresiei de P-selectină (CD62P) a fost efectuată cu flow-citometrul Cytomics FC 500 Beckman Coulter. Testarea a fost efectuată din sânge integral, în maxim 20 minute de la recoltarea sângelui cu și fără adăugare, *in vitro*, de TRAP-6 (agonist). Pentru analiza trombocitelor a fost necesară setarea flow-citometrului pentru achiziția acestora.

Ca marker de identificare a populației de trombocite am folosit anticorpul monoclonal CD41-PC5 (phycoerytrin-Cy5), clona P2, (Beckman Coulter, New Jersey, USA), anticorp ce reacționează cu GPIIb exprimată pe suprafața trombocitelor și identifică această populație de

celule. Expresia P-selectinei a fost cuantificată cu ajutorul anticorpului monoclonal CD 62P-PE (phycoerythrin conjugated); clona CLB-Thromb/6 (Beckman Coulter, New Jersey). Am folosit control izotip (*Isotype control*) de la același producător. Toți anticorpii au fost folosiți în concentrație optimă, determinată prin titrare.

Pentru activarea trombocitelor, *in vitro*, am folosit TRAP-6 (TRAP-6 H-Ser-Phe-Leu-leu-Arg-Asn-OH trifluoroacetate salt; H-8365) (Bachem, Switzerland).

Pentru evaluarea expresiei de P-selectină am urmat un protocol de lucru descris anterior. Concentrația de agonist (TRAP-6) necesară pentru stimularea trombocitelor a fost stabilită într-un experiment preliminar tip concentrație-răspuns efectuat pentru un lot de subiecți sănătoși. Trombocitele au fost stimulate submaximal (expresie de P-selectină 40-60%) și maximal (expresie de P-selectină 80-90%). Rezultatele au fost exprimate în procentul (%) de trombocite CD62P pozitive din populația celulară marcată CD41 (marker plachetar independent de activare).

Rezultate: Am obținut rezultate semnificativ diferite statistic între lotul de pacienți și cel de control pentru expresia P-selectinei atât în cazul trombocitelor nestimulate cu TRAP-6 ($p=0.02$ -MW), cât și stimulate submaximal ($p=0.0001$ -T) și maximal ($p=0.0001$ -MW).

În grupul de pacienți am evidențiat o corelație (Spearman) negativă ($R_s = -0.269$, $p=0.032$) între durata tratamentului citoreductiv și gradul de răspuns al trombocitelor la TRAP-6 în concentrație maximală și o corelație Spearman pozitivă între rezultatele obținute cu stimulare submaximală și maximală ($R_s=0.851$, $p=0.0001$).

Din analiza statistică realizată cu testele Kruskal-Wallis și ANOVA a rezultat o variabilitate semnificativă statistic între grupurile de diagnostic MF, PV, TE și grupul martor pentru următoarele variabile: expresia de P-selectină în condiții bazale ($p=0.012$ -KW), cu stimulare submaximală ($p=0.0001$ -KW) și maximală ($p=0.0001$ -KW).

La analiza subploturilor de pacienți (PV, TE, și MF) în comparație cu lotul de control am constatat diferențe semnificative statistic între lotul martor și PV pentru expresia P-selectinei nestimulată ($p=0.004$ -MW), stimulată submaximal ($p=0.006$ -T) și maximal ($p=0.001$ -T). Diferențe înalt semnificative statistic s-au înregistrat între martori și TE pentru expresia P-selectinei cu stimulare submaximală ($p=0.0001$ -T) și maximală (0.0001 -T). Între MF și martori s-au înregistrat diferențe pentru expresia P-selectinei în condiții bazale ($p=0.017$ -MW) și de stimulare.

Pacienții tratați cu HU nu au relevat valori crescute semnificativ statistic pentru expresia P-selectinei în comparație cu cei tratați cu anagrelide ($p>0.05$ -T). Durata

tratamentului citoreductiv a influențat expresia P-selectinei. Pacienții cu tratament mai îndelungat au avut o expresie mai scăzută a P-selectinei, în condiții bazale, dar nu a fost semnificativă statistic. Trombocitele pacienților cu tratament mai redus (diagnostic ≤ 1 an) au fost mai responsive la stimulare maximală cu TRAP-6, în comparație cu cele ale pacienților cu tratament mai îndelungat (>1 an), cu valori ce au atins diferențe semnificative statistic ($p=0.002$ -T).

Prezența mutației *JAK2V617F* nu a influențat semnificativ expresia de P-selectină. Nu s-au observat diferențe semnificative între valorile pacienților purtători ai mutației (tip heterozigot sau homozigot) în comparație cu wild type ($p>0.05$ -T).

Valorile medii ale expresiei de P-selectină la pacienții cu istoric de tromboză nu au fost semnificativ crescute în comparație cu mediile celor fără tromboze ($p>0.05$ -T).

Cu excepția dislipidemie, prezența factorilor de risc cardiovascular (hipertensiune arterială, diabet zaharat sau fumători, obezitate) nu a influențat expresia de P-selectină la pacienții NMP Ph-. Pacienții cu dislipidemie au avut o expresie mai crescută a P-selectinei în condiții bazale ($p=0.049$ -MW) și au fost semnificativ mai hiporesponsivi ($p=0.001$ -T; $p=0.01$ -T) în comparație cu pacienții fără dislipidemie. Rezultatele nu au fost influențate de vârstă și gen.

Concluzii: În studiul actual am demonstrat o scădere semnificativă a răspunsului trombocitelor din NMP Ph- în comparație cu cel al trombocitelor subiecților sănătoși la ambele concentrații de TRAP-6. Un răspuns semnificativ mai scăzut s-a obținut și între subgrupele de diagnostic PV, TE, MF și cel al lotului martor. Am interpretat acest răspuns scăzut datorat preactivării trombocitelor *in vivo*.

Am obținut o scădere semnificativă a expresiei de P-selectină, în condiții bazale, la pacienți în comparație cu lotul de control. Aceste rezultate neașteptate nu dovedesc automat că trombocitele pacienților din studiu nu sunt activate. Este posibil ca expresia membranaară a P-selectinei să fie scăzută datorită unei clivări premature care duce la apariția ei în plasmă, în forma sa solubilă.

S-a evidențiat o corelație negativă între expresia de P-selectină după stimulare maximală cu TRAP-6 și durata tratamentului citoreductiv. Trombocitele pacienților cu tratament mai îndelungat au evidențiat un răspuns mai scăzut la stimulare cu TRAP-6, dovedind că durata tratamentului poate să influențeze gradul de răspuns al trombocitelor la agoniști.

Pacienții cu dislipidemie au prezentat o expresie mai crescută a P-selectinei în comparație cu cei fără dislipidemie și au fost mai puțin responsivi la stimulare cu TRAP-6. Rezultatele susțin influența dislipidemiei în activarea trombocitelor.

În acest studiu am observat existența unei corelații inverse între nivelul de generare al trombinei (rezultatele studiului 3) și răspunsul trombocitelor la stimulare cu agoniști, în cazul pacienților cu NMP Ph-.

Deoarece am evidențiat o expresie scăzută a P-selectinei membranare la pacienții cu NMP Ph- sunt necesare studii ulterioare pentru a evalua și corela nivelul de P-selectină solubilă cu rezultatele obținute în acest studiu.

Concluzii generale

1. Pacienții cu diagnosticul de NMP Ph- au generat un nivel plasmatic mai crescut de trombină (în PPP și PRP) în comparație cu cel al subiecților sănătoși din lotul martor.
2. Rolul trombocitelor în generarea unui nivel crescut de trombină în NMP Ph- a fost demonstrat prin valorile semnificativ crescute ale parametrilor TGT în PRP ale pacienților în comparație cu cele ale lotului martor.
3. Pacienții cu diagnosticul TE au generat un nivel mai înalt de trombină în comparație cu subgrupele de diagnostic PV și MF.
4. Gradul de răspuns al trombocitelor la stimulare cu agoniști (TRAP-6), cuantificat prin expresia de P-selectină, a fost semnificativ mai scăzut la pacienții NMP Ph- în comparație cu lotul martor.
5. Între nivelul crescut de trombină generată (peak thrombin, VI, AUC) și gradul de răspuns al trombocitelor la stimulare cu agoniști a existat o corelație inversă negativă, care indică o stare de activare in vivo a trombocitelor din NMP Ph-.
6. Tratamentul citoreductiv a influențat generarea de trombină în ambele studii efectuate cu TGT. Pacienții tratați cu hidroxiuree (HU) au produs un nivel semnificativ mai scăzut de trombină în comparație cu pacienții tratați cu anagrelide, demonstrând un efect modulator al HU asupra generării de trombină la pacienții NMP Ph-.
7. Valorile indicilor trombocitari de volum (ITV) au fost semnificativ mai mari la pacienții tratați cu anagrelide, iar aceste valori se pot corela pozitiv cu nivelul mai crescut de trombină generată de plasma acestor pacienți.

8. Durata tratamentului citoreductiv a relevat o corelație negativă cu nivelul de trombină (peak thrombin, VI și AUC) în ambele studii pentru evaluarea generării de trombină.
9. Gradul de răspuns al trombocitelor pacienților la stimulare maximală cu agoniști (TRAP-6), evaluat prin expresia de P-selectină, a fost mai scăzut la pacienții cu tratament mai îndelungat în comparație cu pacienții cu tratament recent aplicat.
10. Tratamentul antiagregant cu aspirină nu a avut influență semnificativă asupra variabilelor cuantificate în studiile efectuate.
11. Am obținut valori semnificativ mai mici ale ITV la pacienții tratați cu statine în comparație cu cei fără acest tratament.
12. Asocierea dislipidemieii la pacienții NMP Ph- a condus la o expresie de P-selectină mai crescută, iar trombocitele acestor pacienți au fost semnificativ mai hiporesponsive la stimulare cu agonist.
13. Indicele de masă corporală (IMC) s-a corelat pozitiv cu parametrii TGT în PRP, fapt care arată o creștere a generării de trombină odată cu creșterea IMC.
14. Au fost observate corelații pozitive slabe, între numărul de leucocite și de trombocite (numai în PRP), nivelul hematocritului și al hemoglobinei cu parametrii TGT (peak thrombin și velocity index). Aceste corelații indică implicarea celulelor sanguine în generarea de trombină.
15. Pacienții purtători ai mutației *JAK2V617F* au generat cantități mai scăzute de trombină în comparație cu cei fără această mutație (WT).
16. Valorile indicilor trombocitari (ITV) au prezentat o corelație cu mutația *JAK2V617F* dar nu a fost atins pragul semnificativ statistic.
17. Prezența antecedentelor trombotice la pacienți nu a influențat semnificativ generarea de trombină, expresia de P-selectină sau valorile ITV.
18. O expresie semnificativ scăzută de P-selectină, în condiții bazale, la pacienți în comparație cu lotul de control, a constituit un rezultat în contradicție cu cele raportate anterior. Este posibil ca expresia membranară a P-selectinei să fie scăzută datorită unei clivări premature care duce la apariția ei în plasmă, sub formă solubilă.
19. Valorile ITV măsurate prin metoda impedanței nu au fost semnificativ crescute la pacienții NMP Ph- în comparație cu grupul de control. Am considerat aceste rezultate o limită a metodei folosite pentru determinarea hemoleucogramei.
20. Nivelul de trombină generată, a expresiei de P-selectină și valorile ITV nu fost semnificativ influențate de vârstă.

21. Nu s-au observat valori semnificativ diferite ale variabilelor cuantificate în studii în funcție de gen.
22. Recoltarea sângelui în tuburi ce conțin K2EDTA, ca anticoagulant, a dus la o creștere progresivă a valorilor volumului trombocitar mediu (VTM), posibil datorită activării trombocitelor și demonstrează influența timpului scurs între recoltarea sângelui și procesare și a tipului de anticoagulant asupra valorilor VTM.
23. Toate rezultatele obținute în cercetarea actuală au demonstrat la pacienții NMP Ph- o stare de activare a sistemului hemostatic celular evidențiată prin testul de generare a trombinei (TGT) și prin citometrie în flux, precum și un efect modulator al tratamentului citoreductiv asupra acestei activări.
24. Consider că TGT își poate aduce aportul la investigarea statusului protrombotic individual și la evaluarea eficienței tratamentului citoreductiv în reducerea complicațiilor trombotice în NMP Ph-. Evaluarea markerilor de activare celulară și a gradului de răspuns la stimulare a trombocitelor prin citometrie în flux aduce informații utile asupra comportamentului trombocitelor în aceste patologii.

Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei

Teza este originală prin următoarele realizări:

1. S-a determinat pentru prima dată în România generarea de trombină printr-un test funcțional, de hemostază globală, în neoplazmele mieloproliferative cronice Philadelphia negative (NMP Ph-).
2. Am raportat pentru prima dată rezultate ale nivelului de trombină generată de plasma pacienților cu diagnostic NMP Ph- folosind analizorului automat Ceveron® alpha.
3. Este primul raport care comunică corelația între durata tratamentului citoreductiv și generarea de trombină în NMP Ph-.
4. Am comparat pentru prima dată nivelul de trombină generată cu gradul de răspuns al trombocitelor la agoniști pentru pacienții cu NMP Ph-.
5. Am efectuat prima evaluare din România a indicilor trombocitari (ITV) la pacienții cu NMP Ph-.

Contribuții inovatoare

1. Implementarea tehnicii de măsurare automată a generării de trombină în România.

2. Propunerea parametrilor testului de generare a trombinei (TGT) pentru monitorizarea răspunsului la tratamentul citoreductiv și urmărirea riscului trombotic individual la pacienții cu diagnostic de NMP Ph-.
3. Implementare protocolului de cuantificare a expresiei de P-selectină în laboratorul de hemostază al Spitalului Clinic Județean de Urgență Sibiu.