

КЛІНІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 591.156:575.113:616-005.6:616.155.191

О. Ю. Міщенюк, О. М. Костюкевич,  
Т. Ф. Любарець, С. В. Клименко\*

Державна установа "Національний науковий центр радіаційної медицини  
Національної академії медичних наук України",  
бул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна  
ДНУ "Науково-практичний центр профілактичної  
та клінічної медицини" ДУС, м. Київ

**КЛІНІЧНІ ФАКТОРИ РИЗИКУ ТА ГЕНЕТИЧНІ  
ДЕТЕРМІНАНТИ РОЗВИТКУ ТРОМБОЗІВ  
У ХВОРИХ НА РН-НЕГАТИВНІ ХРОНІЧНІ  
МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНІ НОВОУТВОРЕННЯ**

Проведено дослідження щодо визначення ролі віку, лейкоцитозу, мутації *JAK2 V617F* та алельного варіанту *G1691A* гена фактора V коагуляції в розвитку тромботичних ускладнень у пацієнтів з Рн-негативними хронічними мієлопроліферативними новоутвореннями (ХМПН), а саме есенціальною тромбоцитемією, справжньою поліцитемією та ідіопатичним мієлофіброзом, які зазнали впливу іонізуючого випромінювання внаслідок аварії на ЧАЕС, у порівнянні з неопроміненими пацієнтами. Встановлено, що у хворих на спонтанні Рн-негативні ХМПН вік понад 65 років (ВР=2,6; 95% довірчий інтервал [ДІ] 1,15–5,85, р=0,012) та кількість лейкоцитів понад  $15 \times 10^9/\text{л}$  (ВР=2,5; 95%, ДІ=1,45–4,28, р=0,025) є предикторами розвитку тромбозів. Рівень лейкоцитозу понад  $19,5 \times 10^9/\text{л}$  у хворих на Рн-негативні ХМПН, які зазнали дії іонізуючого випромінювання внаслідок аварії на ЧАЕС, асоціюється зі зростанням відносного ризику тромбозів (ВР=3,75; 95%, ДІ=1,5–9,2, р=0,048). Частота тромботичних ускладнень у загальній популяції пацієнтів з Рн-негативними ХМПН та алельним варіантом *G1691A* гена фактора V коагуляції значно вища, ніж у носіїв дикого типу (odds ratio=10,1; 95%, ДІ=7,07–14,28, р=0,049).

**Ключові слова:** Рн-негативні хронічні мієлопроліферативні новоутворення, фактор ризику тромбозів, алельний варіант *G1691A* гена фактора V коагуляції.

Тромбози є найбільш частими ускладненнями таких Рн-негативних хронічних мієлопроліферативних новоутворень (ХМПН), як справжня поліцитемія (СП), есенціальна тромбоцитемія (ЕТ) та ідіопатичний

\* Клименко Сергій Вікторович, e-mail: klymenko\_sergiy@yahoo.co.uk

© Міщенюк О. Ю., Костюкевич О. М., Любарець Т. Ф., Клименко С. В., 2012

міелофіброз (ІМФ), і зустрічаються в 38% [13], 24% [11] та 9% [5] хворих, відповідно. Кумулятивний ризик розвитку тромботичних подій у пацієнтів зі СП та ЕТ становить 5 випадків на 100 хворих на рік [6, 13]. Натомість серед пацієнтів з ІМФ тромбози розвиваються з частотою 1,7 випадку на 100 хворих на рік [5]. Зважаючи на те, що тромботичні ускладнення домінують у структурі причин летальності хворих на СП і ЕТ, стратифікація останніх здійснюється на підставі оцінки ризику розвитку тромбозів, а наявність тромботичного епізоду в анамнезі та вік понад 60 років є двома провідними факторами несприятливого прогнозу щодо розвитку тромбозів у хворих на Ph-негативні ХМПН. Так, ризик тромботичних ускладнень у пацієнтів з ЕТ, СП та ІМФ в 1,5 [8], 8,5 [1] та 2,4 [5] раза відповідно вищий в когорті пацієнтів віком понад 60 років, ніж у молодшій групі хворих, а тромботичний епізод в анамнезі збільшує ризик венозних ретромбозів у 4,75 раза [15].

До потенційних предикторів тромбозів відносять лейкоцитоз та позитивний *JAK2 V617F* мутаційний статус [10]. Загальний ризик тромбозів у пацієнтів з ЕТ та мутацією *JAK2 V617F* у 2,04 раза вищий порівняно з когортю носіїв алелі дикого типу [8], а лейкоцитоз понад  $15 \times 10^9/\text{л}$  збільшує ризик розвитку тромботичних ускладнень у хворих на ЕТ та СП у 2,7 та 1,71 раза відповідно [4, 12]. Тромбоз у пацієнтів з ІМФ та лейкоцитозом понад  $15 \times 10^9/\text{л}$  асоціюється зі зростанням його ризику та зустрічається в 1,72 раза частіше, ніж у групі хворих з меншою кількістю лейкоцитів [5]. Рівень лейкоцитозу, кількість активованих тромбоцитів, лейкоцитарно-тромбоцитарних агрегатів, тромбомодуліну та лужної фосфатази лейкоцитів прямо пропорційно залежить від рівня алельного навантаження мутацією *JAK2 V617F*. У свою чергу, наявність лейкоцитарно-тромбоцитарних агрегатів та молекул активації лейкоцитів прямо пропорційно корелює з маркерами запуску коагуляційного каскаду та ураження ендотелію [2, 7].

Останнім часом активно вивчається роль спадкової тромбофілії в розвитку тромботичних ускладнень у хворих на Ph-негативні ХМПН. Зокрема, алельний варіант *G1691A* гена фактора V коагуляції зустрічається у 9,2% пацієнтів з СП та ЕТ і венозними тромбозами в анамнезі, натомість у хворих без тромбозів він представлений лише в 3,6% випадків [14]. Молекулярний механізм розвитку тромбозів, обумовлений заміною гуаніну на аденин у позиції 1691 гена фактора V, реалізується за рахунок функціональної втрати білковою молекулою сайту 506 — найбільш кінетично активного місця для взаємодії з активованим протеїном С (АПС) — основним інгібітором системи коагуляції, який

забезпечує інактивацію фактора Va та VIIIa та зменшує протромбіназну активність тромбоцитів [9].

**Мета дослідження.** Визначити взаємозв'язок між віком, рівнем лейкоцитозу та позитивним *JAK2 V617F* мутаційним статусом і розвитком тромбозів у хворих на Ph-негативні ХМПН, які зазнали впливу іонізуючого випромінювання (ІВ) внаслідок аварії на ЧАЕС, та в когорті пацієнтів, захворюванню яких не передував вплив канцерогенного фактору. Дослідити розподіл генотипів поліморфізму (*1691G/A*) гена V фактора коагуляції у хворих на Ph-негативні ХМПН з тромбозами та без тромботичних епізодів в анамнезі.

**Матеріали та методи.** Матеріалом для дослідження слугували результати клінічних та лабораторних досліджень 116 пацієнтів з Ph-негативними ХМПН, які проходили обстеження в Інституті клінічної радіології Державної установи “Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України” з 2009 по 2012 рік. Діагнози Ph-негативних ХМПН встановлені на підставі критеріїв ВООЗ 2008 р. Хворі, які зазнали впливу ІВ внаслідок аварії на ЧАЕС (n=35), склали основну групу. Контрольна група сформована з 81 хворого зі спонтанними Ph-негативними ХМПН, опроміненого в межах природного радіаційного фону. Розповсюдженість алельного варіанту *G1691A* гена фактора V визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) згідно [1]. Статистичні розрахунки проводились за допомогою програмного пакету Statistica 10 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Непараметричні дані оцінювали з використанням двобічного точного тесту Фішера.

**Результати та їх обговорення.** Середній вік в основній групі становив  $(63,61 \pm 9,66)$  року, наймолодшому пацієнту було 35 років, а найстарішому — 78 років. Вікова характеристика групи контролю представлена наступним чином: середній вік відповідав  $(54,77 \pm 13,85)$  року, наймолодшому та найстарішому хворому було 25 та 76 років, відповідно. Максимальна тривалість захворювання становила 21 рік у групі спостереження та 26 років — у контрольній групі. Тромбози у хворих з Ph-негативними ХМПН, які постраждали внаслідок аварії на ЧАЕС, мали місце у 25,7% випадків, у групі контролю — у 22,5% пацієнтів.

У хворих на Ph-негативні ХМПН, які зазнали впливу ІВ внаслідок аварії на ЧАЕС, з тромботичними ускладненнями та з відсутністю тромбозів в анамнезі середній вік статистично не відрізнявся, та склав  $(63,34 \pm 10,17)$  і  $(64,5 \pm 8,29)$  року, відповідно. Натомість у контрольній групі ризик тромбозів корелював з віком хворого. Середній вік пацієнтів

з тромботичними епізодами становив ( $62,85 \pm 9,39$ ) року, у хворих з відсутністю тромбозів показник дорівнював ( $51,94 \pm 14,10$ ) року ( $p < 0,05$ ), а вік понад 65 років збільшував відносний ризик (ВР) тромбозів у 2,6 раза (95% довірчий інтервал ( $\Delta I$ )= $1,15 - 5,85$ ;  $p = 0,012$ ). Відсутність доказаного впливу такого фактора ризику, як вік понад 60 років, у групі спостереження, на відміну від контрольної когорти хворих, може бути зумовлена нестандартизованістю груп щодо статі та віку.

Середня кількість лейкоцитів в основній групі спостереження дорівнювала  $11,46 \pm 1,2 \times 10^9/\text{л}$ . Рівень лейкоцитів у когорті опромінених внаслідок аварії на ЧАЕС без тромботичних ускладнень та з наявністю тромбозів в анамнезі істотно не відрізнявся, і становив  $10,94 \pm 2,2 \times 10^9/\text{л}$  та  $11,83 \pm 0,9 \times 10^9/\text{л}$  відповідно. Предиктором тромбозів визначено рівень лейкоцитів понад  $19,5 \times 10^9/\text{л}$  (ВР= $3,75$ ; 95%  $\Delta I$ = $1,5 - 9,2$ ;  $p = 0,048$ ). У хворих на Ph-негативні хронічні мієлопроліферативні захворювання (ХМПЗ) групи контролю з тромбозами середня кількість лейкоцитів відповідала рівню  $13,8 \pm 2,11 \times 10^9/\text{л}$ , а без тромботичних епізодів —  $13,27 \pm 1,93 \times 10^9/\text{л}$ . Статистично доведений асоціативний зв'язок між лейкоцитозом та “великими” тромботичними подіями було отримано для кількості лейкоцитів понад  $15 \times 10^9/\text{л}$ , яка збільшувала ризик виникнення тромбозів у 2,5 раза (95%  $\Delta I$ = $1,45 - 4,28$ ;  $p = 0,025$ ). Зазначимо, що відповідно до більшості досліджень, лейкоцитоз прямо пропорційно корелює з тромботичними подіями в популяції пацієнтів, молодших за 60 років, що, можливо, пояснює різницю між прогностично значущим рівнем лейкоцитів щодо розвитку тромбозів в основній та контрольній групі спостереження.

Враховуючи, що 97% хворих на СП мають мутацію *JAK2 V617F*, предиктивну цінність генетичного маркеру щодо розвитку тромбозів було оцінено виключно для пацієнтів з ЕТ та ІМФ. В основній групі хворих на ІМФ ( $n=13$ ) та ЕТ ( $n=1$ ), позитивний мутаційний статус визначено у 41,66% випадків. Серед пацієнтів контрольної групи з ЕТ ( $n=17$ ) та ІМФ ( $n=13$ ) зазначений генетичний патерн ідентифіковано у 57,5% випадків. Асоціація з наявністю алельного варіанту *JAK2 V617F* з підвищеним ризиком розвитку тромботичних ускладнень не була статистично доведеною ні в основній, ні в контрольній групах, що, найімовірніше, пов’язано з недостатністю вибірки.

Дослідження розповсюдженості алельного варіанту *G1691A* гена фактора V коагуляції проведено у 84 хворих на Ph-негативні ХМПН. Фактор V *G1691A* виявлено в 5,4% пацієнтів. Медіана віку у хворих на Ph-негативні ХМПН з тромбозами та наявністю алельного

варіанту *G1691A* гена фактора V дорівнювала 42 роки (віковий діапазон 39–72 роки), натомість у когорті пацієнтів з відсутністю тромбооклюзії в анамнезі та диким типом алелі 1691 гена фактора V середній вік становив ( $54,28 \pm 6,65$ ) року (медіана складала 55 років, віковий діапазон відповідав 45–64 років). Незважаючи на нечисленну групу, визначена тенденція щодо залежності між наявністю протромботичної алелі *G1691A* гена фактора V та ризиком розвитку тромбозів у молодому віці, яка підтверджується більшістю досліджень. У пацієнтів із тромботичними ускладненнями в анамнезі розповсюдженість алельного варіанта *G1691A* виявилась достовірно вищою, ніж у хворих без тромбозів (3 із 16 проти 1 із 54 пацієнтів,  $p < 0,05$ ), а носійство генетичного маркера збільшувало ризик тромбозів у 10 разів (odds ratio=10,1; 95% ДІ=7,07–14,28;  $p=0,049$ ).

#### Висновки.

1. У хворих на спонтанні Ph-негативні ХМПН вік понад 65 років збільшує ризик тромбооклюзій у 2,6 раза.
2. Лейкоцитоз понад  $15 \times 10^9/\text{л}$  у пацієнтів зі спонтанними Ph-негативними ХМПН та понад  $19,5 \times 10^9/\text{л}$  у хворих на Ph-негативні ХМПН, які зазнали дії IVB внаслідок аварії на ЧАЕС, асоціюється зі зростанням відносного ризику тромбозів, який дорівнює 2,5 та 3,75 відповідно.
3. Носійство алельного варіанта *G1691A* гена фактора V коагуляції в загальній когорті хворих на Ph-негативні ХМПН є предиктором тромботичних ускладнень, що збільшує ризик їх розвитку у 10 разів.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Молекулярно-генетичне дослідження мутацій гена фактора V та II згортання крові у жінок з репродуктивними втратами в анамнезі / Г. В. Макух, Л. Б. Чорна, Д. В. Заставна [та ін.] // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики : зб. наук. праць. — Луганськ : ЛДМУ, 2010. — Вип. 18. — С. 348 — 355.
2. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: Relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden / E. Arellano-Rodrigo, A. Alvarez-Larran, J. Reverter [et al.] // Am. J. Hematol. — 2009. — Vol. 84. — P. 102–108.
3. Barbui T. Indications for cytoreductive therapy in polycythemia vera and essential thrombocythemia. / T. Barbui, G. Finazzi // Hematology. — 2003. — Vol. 203. — P. 202–209.
4. Perspectives on thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: is leukocytosis a causative factor? / T. Barbui, A. Carobbio, A. Rambaldi [et al.] // Blood. — 2009. — Vol. 114. — P. 759–763.
5. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors / T. Barbui, A. Carobbio, F. Cervantes [et al.] // Blood. — 2010. — Vol. 115. — P. 778–782.
6. Briére J. Essential thrombocythemia / J. Briére // J. Rare Dis. — 2007. — Vol. 2, N 3. — P. 1–17.

7. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status / A. Carobbio, G. Finazzi, V. Guerini [et al.] // Blood. — 2007. — Vol. 109. — P. 2310–2313.
8. Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients / A. Carobbio, J Thiele, F. Passamonti [et al.] // Blood. — 2011. — Vol. 117, N 22. — P. 5857–5859.
9. Castoldi E. APC resistance: biological basis and acquired influences / E Castoldi, J. Rosing // J. Thromb. Haemost. — 2010. — Vol. 8. — P. 445–453.
10. Risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera according to JAK2 V617F mutation status / G. Finazzi, A. Rambaldi, V. Guerini [et al.] // Haematologica — 2007. — Vol. 92. — 135–136.
11. Hydroxyurea Compared with Anagrelide in High-Risk Essential Thrombocythemia / C. Harrison., P. Campbell, G. Buck [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2005. — Vol. 353. — P. 33–45.
12. Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera / R. Landolfi, L. Gennaro, T. Barbu [et al.] // Blood. — 2007. — Vol. 109. — P. 2446–2452.
13. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera / R. Marchioli, G. Finazzi, R. Landolfi [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2005. — Vol. 23, № 10. — P. 2224–2232.
14. Factor V Leiden mutation carriership and venous thromboembolism in polycythemia vera and essential thrombocythemia / M. Ruggeri., H. Gisslinger, A. Tosetto [et al.] // Am. J. Hematol. — 2002. — Vol. 71. — P. 1–6.
15. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments / V. Stefano, T. Za, E. Rossi [et al.] // Haematologica — 2008. — Vol. 93, N. 3. — P. 372–380.

Стаття надійшла до редакції 02.07.2012.

*O. Ю. Мищенюк, О. М. Костюкевич, Т. Ф. Любарец, С. В. Клименко*

*Государственное учреждение “Национальный научный центр радиационной*

*медицины Национальной академии медицинских наук Украины”,*

*ул. Мельникова, 53, г. Киев, 04050, Украина*

*ГНУ “Научно-практический центр профилактической*

*и клинической медицины” ГУД, г. Киев*

**КЛИНИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ  
ДЕТЕРМИНАНТЫ РАЗВИТИЯ ТРОМБОЗОВ У БОЛЬНЫХ  
С Ph-ОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ ХРОНИЧЕСКИМИ  
МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ**

Проведены исследования по определению роли возраста, лейкоцитоза, мутации *JAK2* V617F и аллельного варианта *G1691A* гена фактора V коагуляции в развитии тромботических осложнений у пациентов с Ph-отрицательными хроническими миелопролиферативными новообразованиями (ХМПН), а именно эссенциальной тромбоцитемией, настоящей полицитемией и идиопатическим миелофиброзом, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения вследствие аварии на ЧАЭС, в сравнении с необлученными пациентами. Установлено, что у больных со спонтанными Ph-отрицательными ХМПН возраст больше 65 лет ( $B\bar{P}=2,6$ ; 95% доверительный интервал (ДИ) 1,15–5,85,  $p=0,012$ ) и количество лейкоцитов выше

$15 \times 10^9/\text{л}$  ( $\text{ВР}=2,5$ ; 95%,  $\text{ДИ}=1,45-4,28$ ,  $p=0,025$ ) являются предикторами развития тромбозов. Уровень лейкоцитоза более  $19,5 \times 10^9/\text{л}$  у больных с Ph-отрицательными ХМПН, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения вследствие аварии на ЧАЭС, ассоциируется с возрастанием относительного риска тромбозов ( $\text{ВР}=3,75$ ; 95%,  $\text{Д}=1,5-9,2$ ,  $p=0,048$ ). Частота тромботических осложнений в общей популяции пациентов с Ph-отрицательными ХМПН и аллельным вариантом *G1691A* гена фактора V коагуляции значительно выше, чем у носителей дикого типа (odds ratio=10,1; 95%, ДИ=7,07–14,28,  $p=0,049$ ).

**Ключевые слова:** *Ph-отрицательные хронические миелопролиферативные новообразования, фактор риска тромбозов, аллельный вариант G1691A гена фактора V коагуляции.*

O. Y. Mishcheniuk, O. M. Kostukevich, T. F. Liubarets, S. V. Klymenko

State Institution "National Research Center for Radiation Medicine  
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine",  
Melnykov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine  
SSE "Scientific and Practical Center  
of Preventive and Clinical Medicine" PA, Kyiv

#### CLINICAL RISK FACTORS AND GENETIC DETERMINANTS OF THROMBOSIS IN PATIENTS WITH Ph-NEGATIVE MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

In the study the role of a factor of age over 60 years, leukocytosis, mutation of *JAK2* V617F allelic variant gene *G1691A* factor V coagulation was defined in the development of thrombotic complications in patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms (Ph-negative MPN), namely essential thrombocythemia (ET), polycythemia vera (PV) and idiopathic myelofibrosis (IMF), who had experienced radiation exposure due to the Chernobyl accident. The age older than 65 years ( $\text{RR}=2,6$ ; 95% confidence interval [CI] 1,15–5,85,  $p=0,012$ ) and the count of leukocyte higher than the  $15 \times 10^9/\text{L}$  ( $\text{RR}=2,5$ ; 95%, CI=1,45–4,28,  $p=0,025$ ) are predictors of thrombosis in patients with spontaneous Ph-negative MPN. The Leukocytosis more than  $19 \times 10^9/\text{L}$  in patients with Ph-negative MPN, who had experienced radiation exposure due to the Chernobyl accident, associates with an increase in the relative risk of thrombosis ( $\text{RR}=3,75$ ; 95%, CI=1,5–9,2,  $p=0,048$ ). The frequency of thrombotic complications in patients with Ph-negative MPN and allelic variant *G1691A* of factor V is significantly higher than in wild-type defined patient's (odds ratio=10,1; 95%, CI=7,07–14,28,  $p=0,049$ ).

**Key words:** *Ph-negative chronic myeloproliferative neoplasms, risk factor for thrombosis, allelic variants G1691A gene of factor V of coagulation.*