

**ВИЗНАЧЕННЯ РОЛІ G1691A АЛЕЛІ ГЕНА ФАКТОРУ V
КОАГУЛЯЦІЇ ТА G20210A АЛЕЛІ ГЕНА ПРОТРОМБІНУ
В РОЗВИТКУ ТРОМБОЗІВ У ХВОРИХ НА СПРАВЖНЮ
ПОЛІЦИТЕМІЮ****О.Ю. Міщенко***Державна установа "Національний науковий центр
радіаційної медицини" НАМН України (Київ)***Вступ**

Клінічний перебіг Rh-негативних мієлопроліферативних новоутворень (МПН), зокрема справжньої поліцитемії (СП), відзначається високою частотою виникнення тромботичних ускладнень. Доведеними клінічними факторами виникнення тромбозів у пацієнтів зі СП є вік понад 60 років та наявність тромбозів в анамнезі [9, 10], а також, такі загальноприйняті тригери кардіоваскулярних подій, як ожиріння, артеріальна гіпертензія, цукровий діабет та паління. Хоча, останнім часом з'являються дані про наявність ролі в розвитку тромботичних ускладнень при Rh-негативних МПН спадкової тромбофілії, а саме нуклеотидного варіанту *G1691A* гена фактору коагуляції V (проакцелерину) – Лейденської мутації та *G20210A* алелі гена фактору коагуляції II (протромбіну) [4, 5]. Проте результати нечисельних досліджень, які присвячені аналізу внеску генетичних маркерів спадкової тромбофілії в розвиток кардіоваскулярних подій у хворих на Rh-негативні МПН досить суперечливі та неоднозначні [2, 11]. Результати аналізу, який демонструє наявність протромбогенної ролі Лейденської мутації при СП, опубліковані М. Ruggeri зі співавторами, згідно до якого, у когорті пацієнтів із венозними тромбозами, які маніфестували до верифікації Rh-негативного МПН, розповсюдженість алельного варіанту *G1691A* гена фактора V вища ніж у хворих, в яких відсутні венооклюзійні тромботичні епізоди [4]. Хоча ці дані не узгоджуються з результатами іншого дослідження, яке проведеного Н. Gisslenger та співавт., в якому не виявлено асоціації між алельним варіантом *G1691A* гена фактора V коагуляції та розвитком венозних тромбозів. Натомість серед хворих на СП із наявністю *G20210A* алелі гена протромбіну спостерігалась вища частота

та тромботичних подій у венозному судинному руслі, у порівнянні з пацієнтами з диким типом гена фактору II коагуляції [6].

На поточний час в Україні чітко не визначена роль маркерів спадкової тромбофілії в розвитку тромбозів при Rh-негативних МПН. Не проаналізовано особливості взаємодії нуклеотидного варіанту *G1691A* гена фактора V, *G20210A* алелі гена протромбіну з «класичними» факторами кардіоваскулярних ускладнень по відношенню до модифікації ризику тромбозів у хворих на СП.

Тому метою дослідження було визначення частоти виникнення тромбозів у хворих на СП із наявністю генетичних маркерів спадкової тромбофілії та без них. Виявлення взаємозв'язку між *G1691A* алелю гена фактора V коагуляції, *G20210A* алелю гена протромбіну та розвитком кардіоваскулярних ускладнень. Оцінка потужності внеску маркерів спадкової тромбофілії в модифікацію ризику виникнення тромботичних подій в різних групах хворих на СП.

Матеріали та методи дослідження

Матеріалом для аналізу слугували результати клінічних та молекулярно-генетичних досліджень 118 пацієнтів зі СП, яким проводилась діагностика Rh-негативних МПН у ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» з 2009 по 2013 рік. Хворим на СП діагноз встановлено на підставі критеріїв ВООЗ 2008 року [9]. Основну групу склали пацієнти зі СП з тромбозами в анамнезі (n=35), а контрольну – без них (n=83). Визначення нуклеотидного варіанту *G1691A* гена фактора V коагуляції та *G20210A* алелі гена протромбіну проводилось за допомогою ампліфікації послідовності ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з подальшою рестрикцією ампліфікату ендонуклеазою HindIII (Fermentas, Вільнюс, Литва), а візуалізація отриманого результату – гел-електрофорезу [1].

Розповсюдженість тромбозів, вік хворих, наявність кардіальних факторів ризику (КФР), а саме ожиріння, артеріальної гіпертензії, цукрового діабету, паління, визначали шляхом обробки медичної документації. В якості атипових венозних тромботичних епізодів розглядалися тромбози вісцеральних вен, а саме порталльної системи, тромбоз вен селезінки та печінкових вен. До типових артеріальних тромбозів відносились випадки інфаркту міокарду, інсульту та транзиторної ішемічної атаки, до типових венозних подій - тромбози вен нижніх кінцівок та тромбоемболія легеневої артерії (ТЕЛА), яка не є самостійним захворюванням органів грудної клітини, а являє собою ускладнення венозного тромбозу.

Різницю між частотою виникнення тромботичних ускладнень на 100 людино-рік у хворих із наявністю генетичних маркерів спадкової тромбофілії та пацієнтів без них оцінено за методом описаним Н. Sahai та А. Kurshid [8]. Для номінальних змінних наявність взаємозв'язку підтверджувалася за таблицями спряженості за допомогою критерію χ^2 - Пірсона та точного тесту Фішера, а рівень взаємозв'язку виражався у вигляді співвідношення оцінки (СО) з відповідними 95% довірчими інтервалами (ДІ). Твердження про наявність статистично значимих розбіжностей припускали за вірогідності помилки менше 0,05. Статистичні розрахунки проводились за допомогою програмного пакету Statistica 10,0 (StatSoft, США).

Отримані результати та їх обговорення

У хворих на СП алельний варіант *G1691A* гена фактору V коагуляції представлений 2,54% (у 3 із 118 осіб) випадків. У 33,3% (у 1 з 3 осіб) носіїв *G1691A* алелі гена фактору V коагуляції спостерігались тромботичні епізоди в анамнезі, а саме атипові венозні тромбози. Різниця в абсолютній кількості тромбозів будь-якої локалізації та атипових венозних подій у хворих на СП із наявністю протромботичної алелі та її відсутністю не виявлено в жодній з вікових підгруп, а також у пацієнтів, як із КФР, так і без них (таб. 1).

Натомість за умови розрахунку частоти виникнення тромботичних ускладнень на 100 людино-рік, виявлено вищий рівень виникнення кардіоваскулярних подій у хворих із наявністю Лейденської мутації, який становив 33,67 випадки на 100 людино-рік, у порівнянні з носіями алелі дикого типу гена фактору V коагуляції (8,24 на 100 людино-рік) ($p < 0,0001$). Визначено, що в загальній когорті хворих на СП носійство *G1691A* алелі збільшує ймовірність розвитку тромбозів у 4,08 рази на 100 людино-рік (95% ДІ=3,27-4,88, $p < 0,0001$).

Зважаючи на те, що тромбози, які асоційовані з наявністю нуклеотидного варіанту *G1691A* гена проакцелерину, спостерігались виключно в пацієнтів віком менше 60 років без КФР, порівняльний аналіз частоти розвитку кардіоваскулярних подій між хворими на СП з Лейденською мутацією та без неї додатково проведено також у зазначеній групі осіб. У пацієнтів зі СП віком менше 60 років без КФР та наявністю *G1691A* алелі гена фактору V коагуляції частота виникнення тромбозів дорівнювала 48,90 епізодам на 100 людино-рік, натомість в осіб із диким типом гена проакцелерину цей показник складав 6,87 випадків на 100 людино-рік ($p < 0,0001$). Співвідношення оцінки розвитку тромботичних ускладнень, яка асоційована з *G1691A* алелю гена

фактору V коагуляції, у пацієнтів молодшої вікової групи без КФР становила 7,11 випадків на 100 людино-рік (95% ДІ=5,59-8,52, $p<0,0001$).

Таблиця 1

Абсолютна кількість тромбозів у носіїв нуклеотидного варіанту G1691A та дикого типу алелі гена фактору V коагуляції

Групи пацієнтів	Хворі на справжню поліцитемію							
	Загальна кількість	Носії G1691A алелі фактору V	із тромбозами в анамнезі			з атипovими венозними тромбозами в анамнезі		
			G1691A позитивні n (%)	G1691A негативні n (%)	P	G1691A позитивні n (%)	G1691A негативні n (%)	P
Із КФР								
Загальна група	58	1 (1,72)	0	24 (41,37)	0,586	0	5 (8,62)	0,913
Старші 60 р.	33	1 (3,03)	0	17 (51,51)	0,484	0	2 (6,06)	0,939
Молодші 60 р.	25	0	0	7 (28,00)	НЗ	0	3 (12,00)	НЗ
Без КФР								
Загальна група	60	2 (3,33)	1 (1,66)	10 (16,6)	0,335	1 (1,75)	4 (6,66)	0,160
Старші 60 р.	12	0	0	1 (8,33)	НЗ	0	0	НЗ
Молодші 60 р.	48	2 (4,16)	1 (2,08)	9 (18,75)	0,376	1 (2,08)	4 (8,33)	0,199
Загальна кількість	118	3 (2,54)	1 (0,84)	34 (28,81)	0,655	1 (0,84)	9 (7,62)	0,301

Усі тромбози у хворих на СП із наявністю нуклеотидного варіанту G1691A гена фактору V коагуляції представлені атипovими венозними подіями. Тому, серед носіїв мутантної алелі гена проакцелерину рівень маніфестації тромботичних ускладнень у венозному судинному руслі відповідає частоті виникнення усіх випадків кардіоваскулярних епізодів, яку було розраховано раніше. У подальшому про-

ведено порівняльний аналіз частоти атипovих венозних тромбозів у носіїв G1691A алелі та в осіб з алелю дикого типу гена фактору V коагуляції. Виявлено, що, як у загальній когорті хворих на СП (33,67 на 100 людино-рік проти 2,18 на 100 людино-рік, $p<0,0001$), так і в молодшій віковій групі без КФР (48,90 на 100 людино-рік проти 3,05 на 100 людино-рік, $p<0,0001$), вищий рівень виникнення атипovих венозних тромбозів спостерігається в осіб із наявністю Лейденської мутації, ніж у пацієнтів без неї. У загальній когорті хворих на СП носійство G1691A алелі гена фактору V коагуляції збільшує вірогідність розвитку тромбозу портальної системи у 15,44 рази на 100 людино-рік (95% ДІ=12,27-18,61, $p<0,0001$), а в молодшій віковій групі без КФР – у 16,3 рази на 100 пацієнтів-рік (95% ДІ=12,73-19,87, $p<0,0001$).

Алель G20210A гена протромбіну ідентифікована в 1,69% (у 2 із 118 осіб) випадків, а у 50% (у 1 з 2 осіб) її носіїв спостерігались тромботичні події в анамнезі, які представлені типовими артеріальними тромбозами. Як у загальній когорті хворих на СП, так і в групах, які сформовано після стратифікації пацієнтів відповідно до їх віку та наявності, або відсутності КФР, абсолютна кількість тромботичних ускладнень, а також типових артеріальних кардіоваскулярних подій була однаковою в носіїв алелі G20210A гена протромбіну та в осіб із диким типом гена фактору II коагуляції (таб. 2).

Проте, у випадку розрахунку частоти виникнення тромбозів на 100 людино-рік, вищий її рівень спостерігався серед пацієнтів із G20210A алелю гена протромбіну, ніж у носіїв дикого типу гена фактора II коагуляції (14,64 на 100 людино-рік проти 8,31 на 100 людино-рік, $p<0,0001$). Співвідношення оцінки виникнення тромботичних ускладнень, яка асоційована з наявністю G20210A алелі гена протромбіну, дорівнювала 1,76 епізодам на 100 людино-рік (95% ДІ=1,41-2,12, $p<0,0001$).

Тромбози серед хворих на СП із наявністю G20210A алелі гена протромбіну спостерігались виключно в пацієнтів віком менше 60 років із КФР. Порівняльний аналіз частоти виникнення кардіоваскулярних ускладнень між хворими з нуклеотидним варіантом G20210A гена протромбіну та пацієнтами з алелю дикого типу фактору II коагуляції також проведено в наведеній групі осіб. Виявлено, що в групі, яка сформована з хворих віком менше 60 років із КФР, носії G20210A алелі гена протромбіну також мають більшу частоту виникнення тромбозів (14,92 на 100 людино-рік проти 5,41 на 100 людино-рік, $p<0,0001$), ніж особи з диким типом алелі гена протромбіну. А носійство нуклеотидного варіанту G20210A гена

фактору II коагуляції, у зазначеній групі хворих на СП, збільшує ймовірність розвитку кардіоваскулярних подій у 2,75 рази на 100 пацієнтів-рік (95% ДІ=1,29-3,71, $p<0,0001$).

Таблиця 2

Абсолютна кількість тромбозів у носіїв нуклеотидного варіанту G20210A та дикого типу алелі гена фактора II коагуляції

Групи пацієнтів	Хворі на справжню поліцитемію							
	Загальна кількість	Носії G20210A алелі n (%)	з тромбозами в анамнезі			пацієнти з типовими артеріальними тромбозами в анамнезі		
			G20210A позитивні n (%)	G20210A негативні n (%)	p	G20210A позитивні n (%)	G20210A негативні n (%)	p
Із КФР								
Загальна група	58	1 (1,72)	1 (1,72)	23 (39,65)	0,413	1 (1,72)	16 (27,58)	0,293
Старші 60 р.	33	0	0	17 (51,51)	НЗ	0	14 (42,42)	НЗ
Молодші 60 р.	25	1 (4,00)	1 (4,00)	6 (24,00)	0,280	1 (4,00)	2 (8,00)	0,120
Без КФР								
Загальна група	60	1 (1,66)	0	11 (18,33)	0,816	0	4 (6,66)	0,933
Старші 60 р.	12	1 (8,33)	0	1 (8,33)	0,916	0	0	НЗ
Молодші 60 р.	48	0	0	10 (20,83)	НЗ	0	4 (8,33)	НЗ
Загальна когорта	118	2 (1,69)	1 (0,84)	34 (28,81)	0,507	1 (0,84)	20 (16,94)	0,325

Усі тромбози у пацієнтів зі СП та наявністю G20210A алелі гена протромбіну представлені типовими артеріальними епізодами, тому їх частота в носіїв генетичного маркера спадкової тромбофілії відповідає такій, яка розрахована для усіх кардіоваскулярних подій. Визначено вищий рівень розвитку артеріальних тромбозів у носіїв мутантної алелі гена фактору II коагуляції, які належать, як до загальної когорти хворих на СП (14,64 на 100 людино-рік проти 4,89 на 100 людино-рік, $p<0,0001$), так і до молодшої за 60 років групи пацієнтів із КФР (14,92 на 100 людино-рік проти 1,80 на 100 людино-

рік, $p<0,0001$), ніж в осіб із диким типом алелі гена протромбіну. Співвідношення оцінки виникнення артеріальних тромботичних ускладнень, яка асоціюється з носійством G20210A алелі, у загальній когорті хворих на СП та в пацієнтів віком менше 60 років із КФР дорівнювала 2,99 епізодам на 100 людино-рік (95% ДІ=2,36-3,59) та 8,28 випадкам на 100 людино-рік (95% ДІ=6,3-10,26, $p<0,0001$), відповідно.

На підставі результатів проведеного дослідження можливо стверджувати, що наявність G1691A алелі гена фактору V коагуляції та G20210A алелі гена протромбіну є одним із предикторів розвитку, як артеріальних, так і венозних тромбозів у хворих на СП, що узгоджується з даними, які опубліковані V. De Stefano та співавт., а також аналізом, який проведено M. Ruggeri та співавторами [4, 5]. Виявлено, що рівень частоти та ризик розвитку кардіоваскулярних подій в носіїв G1691A алелі гена проакцелерину вищий, ніж в осіб із нуклеотидним варіантом G20210A гена протромбіну. Це свідчить на користь того, що тромбогенна потужність Лейденської мутації дещо більша, ніж G20210A алелі гена протромбіну. Отриманий результат співпадає з даними більшості масштабних досліджень, які визначали внесок різних маркерів спадкової тромбофілії в розвиток тромбозів у загальній популяції [3, 7]. З іншого боку, аналіз, який проведено H. Gisslenger та співавт., не підтверджує те, що носійство G1691A алелі гена проакцелерину є більш потужним предиктором виникнення тромбозів у хворих на Rh-негативні МПН, ніж наявність нуклеотидного варіанту G20210A гена протромбіну [6].

Вищий рівень СО виникнення тромбозів, який асоційований з наявністю G1691A алелі гена фактору V та G20210A алелі гена протромбіну, у пацієнтів віком менше 60 років, порівняно зі загальною когортою хворих на СП, підтримує гіпотезу того, що «класичні» тригери розвитку кардіоваскулярних ускладнень, зокрема похилий вік, дещо невілюють тромбогенний потенціал маркерів спадкової тромбофілії.

Висновки

1. Аналіз результатів молекулярно-генетичного дослідження дозволяє стверджувати, що наявність генетичних маркерів спадкової тромбофілії, зокрема G1691A алелі гена фактору V коагуляції та G20210A алелі гена протромбіну, є тригером розвитку кардіоваскулярних ускладнень у хворих на СП.

2. Більший внесок генетичних детермінант спадкової тромбофілії в розвиток тромбозів у хворих на СП спостерігається в осіб, які молодші за 60 років, ніж у пацієнтів старшої вікової групи.

3. Високий показник частоти тромбозів у носіїв G1691A алелі гена фактору V та G20210A алелі гена фактору II коагуляції є одним з аргументів на користь доцільності скринінгу хворих на СП на наявність генетичних маркерів спадкової тромбофілії.

Література

1. Молекулярно-генетичне дослідження мутації гена фактора V та II згортання крові у жінок з репродуктивними втратами в анамнезі / Л.Б. Чорна, Г.В. Макух, Д. В. Заставна [та інші.] // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики: зб. наук. праць. – Луґанськ: ЛДМУ, 2010. – Вип. 18. – С. 348 – 355.
2. Associated thrombophilic defects in essential thrombocythaemia: their relationship with clinical manifestations / L.I. Kornblihtt, P.G. Heller, G. Correa [et al.] // *Thromb. Res.* – 2003. Vol. 112. – P. 131–135.
3. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia / T. Baglin, E. Gray, M. Greaves [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2010. – Vol. 149. – P. 209–220.
4. 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.
5. Influence of the JAK2 V617F mutation and inherited thrombophilia on the thrombotic risk among patients with essential thrombocythemia / V. De Stefano, T. Za, E. Rossi [et al.] // *Haematologica.* – 2009. – Vol. 94. – P. 733–737.
6. Mutation of the prothrombin gene and thrombotic events in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia: a cohort study / H. Gisslinger, M. Müllner, I. Pabinger [et al.] // *Haematologica.* – 2005. – Vol. 90. – P. 408–410.
7. Predictive value of factor V Leiden and prothrombin G20210A in adults with venous thromboembolism and in family members of those with a mutation / J. Segal, D. Brotman, A. Necochea [et al.] // *JAMA.* – 2009. – Vol. 301, № 23. – P. 472–485.
8. Sahai H. Statistics in epidemiology: methods techniques and applications / H. Sahai, A. Kurshid // CRC Press, 1996. – P. 296–298.
9. Tefferi A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management / A. Tefferi // *Am. J. Hematol.* – 2012. – Vol. 87. – P. 285–293.
10. Thomas M. A clinical approach to polycythemia / M. Thomas, K. Pavithran // *A Medicine Update.* – 2010. – Vol. 20. – P. 577–582.
11. Thrombophilic genotypes, natural anticoagulants, and plasma homocysteine in myeloproliferative disorders relationship with splanchnic vein thrombosis and arterial disease / L. Amitrano, M.A. Guardascione, P.R. Ames [et al.] // *Am. J. Hematol.* – 2003. – Vol. 72. – P. 75–81.

Резюме

Мищенко О.Ю. Визначення ролі G1691A алелі гена фактору V коагуляції та G20210A алелі гена протромбіну в розвитку тромбозів у хворих на справжню поліцитемію.

Визначено особливості взаємозв'язку спадкової тромбофілії з розвитком кардіоваскулярних ускладнень у хворих на справжню поліцитемію (СП). Підтверджено, що наявність генетичних маркерів спадкової тромбофілії, зокрема G1691A алелі гена фактору V коагуляції та G20210A алелі гена протромбіну, є тригером виникнення кардіоваскулярних ускладнень у пацієнтів зі СП. Більший внесок генетичних детермінант спадкової тромбофілії в розвиток тромбозів у хворих на СП спостерігається в осіб, які молодші за 60 років, ніж у пацієнтів старшої вікової групи. Високий показник частоти тромбозів у носіїв G1691A алелі гена фактору V та G20210A алелі гена фактору II коагуляції є одним з аргументів на користь доцільності скринінгу хворих на СП на наявність генетичних маркерів спадкової тромбофілії.

Ключові слова: справжня поліцитемія, спадкова тромбофілія, G1691A алель гена фактору V коагуляції, G20210A алель гена фактору II коагуляції, тромботичні ускладнення.

Резюме

Мищенко О.Ю. Определение роли G1691A аллели гена фактора V коагуляции и G20210A аллели гена протромбина в развитии тромбозов у больных истинной полицитемией.

Определены особенности взаимосвязи наследственной тромбофилии с развитием кардиоваскулярных осложнений у больных истинной полицитемией (ИП). Подтверждено, что наличие генетических маркеров наследственной тромбофилии, а именно G1691A аллели гена фактора V коагуляции и G20210A аллели гена протромбина, является триггером возникновения кардиоваскулярных осложнений у пациентов с ИП. Более высокий вклад генетических детерминант наследственной тромбофилии в развитие тромбозов у больных ИП отмечается у лиц младше 60 лет, нежели у пациентов старшего возраста. Высокий показатель частоты тромбозов у носителей G1691A аллели гена фактора V и G20210A аллели гена фактора II коагуляции является одним из аргументов в пользу целесообразности скрининга больных ИП на наличие генетических маркеров наследственной тромбофилии.

Ключевые слова: истинная полицитемия, наследственная тромбофилия, G1691A аллель гена фактора V коагуляции, G20210A аллель гена фактора II коагуляции, тромботические осложнения.

Summary

Mishcheniuk O.Y. The role of the G1691A allele factor V gene and the G20210A allele prothrombin gene in the development of thrombosis in patients with polycythemia vera.

The presence of genetic markers of the inherited thrombophilia, including the G1691A allele of factor V gene and G20210A allele prothrombin gene, is a trigger of cardiovascular complications in PV patients. In PV patients the larger contribution of genetic determinants of the hereditary thrombophilia in the development of thrombosis was observed in individuals younger than 60 years. The high rate of frequency of thrombosis in carriers of the G1691A allele factor V gene and G20210A allele of the factor II gene is one of the arguments in favor of the feasibility of screening patients with PV for the hereditary thrombophilia.

Key words: polycythemia vera, the inherited thrombophilia, the G1691A allele of factor V gene, the G20210A allele of prothrombin gene, thrombotic complications.

Рецензент: д.мед.н., проф. М.А. Пілінська