

УДК: 575.1:616-005.6:616.155.191-021.3:616.155.291

О. Ю. Міщенко<sup>1</sup>✉, В. М. Шкарупа<sup>3</sup>, О. М. Костюкевич<sup>2</sup>, Л. В. Неумержицька<sup>1</sup>,  
С. М. Кравченко<sup>1</sup>, С. В. Клименко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна

<sup>2</sup>Державна наукова установа "Науково-практичний центр профілактичної та клінічної медицини", Державного управління справами, Київ, 01014, Україна

<sup>3</sup>Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21000, Україна

## ВНЕСОК СПАДКОВОЇ ТРОМБОФІЛІЇ В ЗБІЛЬШЕННЯ ЧАСТОТИ ТРОМБОЗІВ У ХВОРИХ НА Rh-НЕГАТИВНІ МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНІ НОВОУТВОРЕННЯ, ВКЛЮЧАЮЧИ ПОСТРАЖДАЛИХ ВНАСЛІДОК АВАРІЇ НА ЧОРНОБИЛЬСЬКІЙ АТОМНІЙ ЕЛЕКТРОСТАНЦІЇ

**Мета.** Визначення внеску носійства *G1691A* алеля гена фактора V коагуляції та *G20210A* алеля гена фактора II коагуляції у виникненні тромбозів у хворих на Rh-негативні мієлопроліферативні новоутворення (МПН), опромінених в діапазоні доз 0,001–0,99 Гр та без опромінення.

**Матеріали та методи.** Проаналізовано клінічні та молекулярно-генетичні характеристики хворих на радіаційно-асоційовану та спонтанну справжню поліцитемію (СП), есенціальну тромбоцитемію (ЕТ) і первинний мієлофіброз (ПМФ). Група радіаційно-асоційованої СП, ЕТ та ПМФ представлена 35, 10 та 22 хворими відповідно, а когорта спонтанної СП, ЕТ та ПМФ – 149, 111 і 78 пацієнтами відповідно.

**Результати та висновки.** При спонтанному ПМФ носійство будь-якого з двох молекулярно-генетичних маркерів спадкової тромбофілії збільшує частоту (3 із 6 проти 8 із 72;  $p = 0,033$ ) та ризик виникнення ( $BP = 6,09$ ; 95 % ДІ = 1,40–26,43) тромбозів. Наявність *G1691A* алеля гена проакцелерину у хворих на ПМФ, які не зазнали впливу іонізуючої радіації, зумовлює зростання ймовірності розвитку тромбозів у венозному судинному руслі в 10,14 раза (95 % ДІ = 1,67–61,33). При спонтанних і радіаційно-асоційованих Rh-негативних МПН (в осіб, опромінених у діапазоні доз 0,001–0,99 Гр) більший коефіцієнт виникнення венозних, артеріальних та будь-яких тромбозів спостерігається у носіїв *G1691A* алеля гена фактору V коагуляції, ніж в осіб з алелем дикого типу. Зокрема, у носіїв *G1691A* алеля гена проакцелерину, які належали до групи хворих на СП із радіаційним анамнезом, на 33,33 людино-років визначено більший коефіцієнт виникнення будь-яких тромбозів (95 % ДІ = 0,22–100,00;  $p = 0,048$ ) та судинних подій у венозному руслі (95% ДІ=12,50–50,00;  $p = 0,003$ ). У хворих на ПМФ із радіаційним анамнезом також виявлено різницю (20,00 людино-років; 95 % ДІ = 1,51–50,00;  $p = 0,035$ ) між коефіцієнтом виникнення будь-яких тромбозів і артеріальних васкулярних подій, розрахованим для носіїв *G1691A* алеля гена проакцелерину та для осіб з алелем дикого типу. У носіїв нуклеотидного варіанта *G20210A* гена II фактора коагуляції зі спонтанною ЕТ та ПМФ, порівняно з пацієнтами з алелем дикого типу, спостерігався більший коефіцієнт з його розрахунку на 100 людино-років розвитку венозних тромбозів.

**Ключові слова:** Rh-негативні мієлопроліферативні новоутворення, тромбози, спадкова тромбофілія.

*Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2016. Вип. 21. С. 291–311.*

O.Y. Mishcheniuk<sup>1</sup>✉, V.M. Shkarupa<sup>3</sup>, O.M. Kostukevich<sup>2</sup>, L. V. Neumerzhitcka<sup>1</sup>,  
S. M. Kravchenko<sup>1</sup>, S.V. Klymenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 53 Melnykova Street, Kyiv, 04050, Ukraine

<sup>2</sup>Scientific and Practical Center of Preventive and Clinical Medicine, Verhnya street, 5, Kiev, 01014, Ukraine

<sup>3</sup>National Pirogov Memorial Medical University, Pirogov street, 56, Vinnytsia, 21000, Ukraine

## The contribution of hereditary thrombophilia to increasing the frequency of thrombosis in patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms, including the victims from the Chernobyl accident

**Objective.** The definition of a contribution of the carriage of the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene and the *G20210A* allele of the coagulation factor II gene in the development of thrombosis in Ph-negative myeloproliferative neoplasms (MPN) patients, who were irradiated in the dose range 0,001-0,99 Gy and who were not.

**Materials and methods.** The clinical and molecular-genetic characteristics of patients with radiation-associated and spontaneous polycythemia vera (PV), essential thrombocytemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) were analyzed. The group of radiation-associated PV, ET and PMF represented by 35, 10 and 22 patients respectively, and the cohort of spontaneous PV, ET and PMF – 149, 111 and 78 patients respectively.

**Results and conclusions.** The carriage of any of the two molecular-genetic markers of hereditary thrombophilia at spontaneous PMF increases the frequency (3 of 6 vs 8 of 72;  $p = 0.033$ ) and risk ( $RR = 6.09$ ; 95 % CI = 1.40–26.43) of thrombosis. The presence of the *G1691A* allele of the proaccelerin gene in patients with PMF, who were not exposed to ionizing radiation, causes increase the likelihood of venous thrombosis at 10.14 times (95 % CI = 1.67–61.33). At spontaneous and radiation-associated Ph-negative MPN (in individuals exposed to doses in the range 0,001–0,99 Gy), the higher rate of the occurrence of venous, arterial and any thrombosis was observed in carriers of the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene, than in those, who have the wild-type allele. In particular, the *G1691A* allele of the proaccelerin gene carriers, that are belonged to the group of patients with radiation-associated PV, have at 33.33 person-years bigger rate of any thrombosis (95 % CI = 0.22–100.00,  $p = 0.048$ ) and venous vascular events (95 % CI = 12.50–50.00;  $p = 0.003$ ). In PMF patients with a radiation anamnesis were found the difference (20.00 person-years; 95 % CI = 1.51–50.00,  $p = 0.035$ ) between the ratio of any thrombosis and arterial vascular events, which was calculated for the *G1691A* allele of the proaccelerin gene and for those, who have the wild-type allele. The carriers of the *G20210A* nucleotide variant of the coagulation factor II gene with spontaneous ET and PMF, compared with patients with the wild-type allele, have a higher rate of venous thrombosis per 100 patient-years.

**Key words:** Ph-negative myeloproliferative neoplasm, thrombosis, inherited thrombophilia.

*Problems of radiation medicine and radiobiology. 2016;21:291–311.*

### ВСТУП

Існують переконливі дані, що іонізуюча радіація (ІР) сприяє підвищенню ймовірності виникнення тромботичних подій в осіб, які зазнали її впливу. Зокрема, підтверджено, що в осіб, які вижили після атомного бомбардування Японії, збільшується ризик тромбозів і зростає рівень летальності від інфаркту міокарда (ІМ) [1, 2]. Аналіз даних хворих, які підлягали лікуванню онкологічної патології з включенням радіотерапії, дозволив визначити більший у 8,2 раза ризик виникнення кардіоваскулярної патології в осіб після 40 років, порівняно з пацієнтами того ж віку, яким не проводилась радіотерапія [3].

### INTRODUCTION

There is convincing evidence that ionizing radiation (IR) improves the probability of thrombotic events in patients who have experienced its effects. In particular, there were confirmed, that the people, who survived the atomic bombing in Japan, have the increased risk of thrombosis and mortality from myocardial infarction (MI) [1, 2]. The analysis of patients data, who underwent the treatment of cancer pathology with inclusion radiotherapy, allowed to identify, that people over 40 years, compared with patients of the same age, whom was not performed radiotherapy, have more than 8.2 times greater risk of cardiovascular disease [3].

Отже, можна припустити, що частота і вірогідність виникнення тромботичних подій, зумовлених наявністю нерадіаційних набутих або спадково-детермінованих факторів, в осіб, які додатково зазнали впливу ІР, буде відрізнятися від такої, що спостерігається в загальній популяції.

Одним зі спадкових предикторів виникнення тромбозів, що визначається у 20 % їх випадків, є наявність у осіб *G1691A* алеля гена проакцелерину – Лейденської мутації [4]. Підтвердження вагомого внеску мутаційного алеля в розвиток венозних тромботичних подій отримано в масштабному мета-аналізі, в який включено 46 досліджень. Відповідно до його результатів, гетерозиготне носійство *G1691A* алеля гена фактора V коагуляції збільшує ризик венооклюзій в 3,5 раза, а гомозиготне – у 7,8 раза [5]. Заміна гуаніну на аденін в кодоні 20210 гена протромбіну – фактору коагуляції II є другим за частотою генетичним дефектом, після Лейденської мутації, у структурі поліморфізмів спадкових тромбофілій [6]. Частота *G20210A* алеля гена протромбіну серед європейців варіює від 0,7 до 4 %, а в групі пацієнтів з кардіоваскулярними епізодами, що виникли вперше, її частота складає 6 % випадків [7].

Незважаючи на зацікавленість до вивчення алельних поліморфізмів генів факторів коагуляції, залишаються рідкісними публікації, присвячені аналізу маркерів спадкової тромбофілії у хворих на онкогематологічні захворювання, які здатні викликати протромботичний зсув гемостазу. Зокрема, до гематологічних новоутворень з високою ймовірністю виникнення тромбозів належать Ph-негативні мієлопроліферативні новоутворення (МПН) [8, 9]. Дані нечисленних досліджень, присвячених визначенню ролі молекулярно-генетичних маркерів спадкової тромбофілії у формуванні підвищеного ризику тромбозів при Ph-негативних МПН, є вкрай неоднозначними [10–13].

Таким чином, визначення внеску молекулярно-генетичних детермінант тромбозів в осіб з іншими їх предикторами, зокрема новоутвореннями радіаційним анамнезом, дозволить проаналізувати особливості взаємодії між спадковими та набутими чинниками виникнення васкулярних епізодів.

## МЕТА

Метою дослідження було визначення внеску носійства *G1691A* алеля гена фактора V коагуляції та *G20210A* алеля гена фактора II коагуляції у виникнення тромбозів у хворих на Ph-негативні мієлоп-

This is allowed to suggest, that the frequency and likelihood of thrombotic events, that were caused by the presence of non-radiation acquired or genetically-determined factors, will be different in individuals, who were exposed to additional IR, compared of the general population.

One of the genetic predictors of thrombosis, which is determined in 20% of the cases, is the presence of the *G1691A* allele of proaccelerin gene – Leiden mutation [4]. Confirmation of significant role of the mutation allele in development of venous thrombotic events was obtained in a large-scale meta-analysis of the 46 studies. Accordance with the results of meta-analysis, the heterozygous carriage of the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene increases the risk of venoocclusion to 3.5 times, and the homozygous carriage – to 7.8 times [5]. The replacement of guanine to adenine in the codon 20210 of prothrombin gene – the coagulation factor II is second in frequency of the genetic defect, after Leiden mutation, in the structure of genetics polymorphisms of the hereditary thrombophilia [6]. The frequency of *G20210A* allele of prothrombin gene among Caucasians ranges from 0.7 % to 4 %, and in patients with cardiovascular episodes that emerged in the first time, its frequency is 6 % [7].

Despite the interest in the study of allelic polymorphisms of genes of the coagulation factors, publications with the analysis of genetic markers of the thrombophilia in patients with oncohematological pathologies, which could cause the prothrombotic shift of the hemostasis, remain rare. In particular, at Ph-negative myeloproliferative neoplasms (MPN), that relate to the hematological tumors with a high probability of thrombosis [8, 9]. Date few studies with the definition of the role of molecular genetic markers of the hereditary thrombophilia in the formation of an increased risk of thrombosis in Ph-negative MPN are extremely controversial [10–13].

Thus, the appreciation of the contribution of molecular-genetic determinants of thrombosis in patients with other their predecessors, particular with tumors and radiation history, will allow to analyze the features of the interaction between the hereditary and acquired factors of vascular episodes.

## OBJECTIVE

Definition of a contribution of the carriage of the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene and the *G20210A* allele of the coagulation factor II gene in the development of thrombosis in Ph-neg-

роліферативні новоутворення, опромінені в діапазоні доз 0,001–0,99 Гр, та без опромінення.

**МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ**

Клінічні дані та результати лабораторного дослідження хворих на Ph-негативні МПН, які обстежувались або лікувались у Державній установі «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», були отримані під час збору анамнезу пацієнтів і обробки їх медичної документації, а саме історій хвороб, виписних епікризів із них та амбулаторних карт. Хворі на справжню поліцитемію (СП), есенціальну тромбоцитемію (ЕТ) і первинний мієлофіброз (ПМФ) були рандомізовані на когорті пацієнтів із тромбозами в анамнезі та осіб без них. Наявність тромбозів у пацієнтів підтверджувалась відповідним записом у медичній документації. Під час аналізу клінічних даних враховували, в якому саме руслі-артеріальному чи венозному – і коливникали судинні епізоди. Також визначали період часу між первинним оглядом пацієнта гематологом з верифікацією діагнозу Ph-негативної МПН та останнім його обстеженням, фіксуючи загальну тривалість клінічного спостереження.

Носійство нуклеотидного варіанта *G1691A* гена фактора V коагуляції та *G20210A* алеля гена фактора II коагуляції визначено за допомогою аналізу довжин рестрикційних фрагментів продуктів алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції (АС-ПЛР) у хворих на Ph-негативні МПН із радіаційним анамнезом, які зазнали опромінення в діапазоні доз 0,001–0,99 Гр (основна група), та без нього (контрольна група) (табл. 1).

Виділення ДНК з мононуклеарних клітин ПК здійснювали стандартним методом із використанням комерційного набору QIAampDNAminikit (Qiagen,

active MPN patients, who were irradiated in the dose range 0.001–0.99 Gy and who were not.

**MATERIALS AND METHODS**

The results of clinical and laboratorial examination of Ph-negative MPN patients, who were treated or consulted in State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», obtained during the patient history taking and processing of their medical records, such as their epicrisis and outpatients records. Patients with polycythemia vera (PV), essential thrombocytemiу (ET) and primary myelofibrosis (PMF) were randomized to a cohort of patients with a history of thrombosis and those without. The presence of thrombosis in patients was confirmed the notation for previous medical records. During analyzing the clinical data, we taken into account type of vascular episodes (arterial or venous) and when thrombosis emerged. Also, we determined the period of time between the initial clinical examination of patients with verification of the Ph-negative MPN and their last inspection, with the fixing of a total time of the clinical observation.

The carriage of the *G1691A* nucleotide variant of the coagulation factor V gene and the *G20210A* allele of the coagulation factor II gene were determined by the restriction enzyme analysis of allele-specific PCR (AS-PCR) products in Ph-negative MPN patients, who were irradiated in the dose range 0.001–0.99 Gy (the main group) and who were not (the control group) (Table 1).

The DNA isolation of mononuclear cells of PB performed the standard method using a commercial set QIAampDNAminikit (Qiagen, Germany)

**Таблиця 1**

Узагальнені дані щодо осіб, в яких проводилось визначення наявності *G1691A* алеля гена фактора V коагуляції та *G20210A* алеля гена фактора II коагуляції

**Table 1**

Summary data on individuals, whom was conducted determine the presence of the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene and the *G20210A* allele of the coagulation factor II gene

Нозологія / disease	Ph-негативні МПН / Ph-negative MPN (n = 401)	
	радіаційно-асоційовані / radiation-associated (n = 63)	спонтанні / spontaneous (n = 338)
СП / PV	31	149
ЕТ / ET	10	111
ПМФ / PMF	22	78
Всього / All	63	338

Німеччина) або NucleospinDNAMini-Kit (Duren, Німеччина) згідно з протоколом, наданим виробником. Специфічні олігонуклеотидні праймери розроблено на підставі раніше опублікованих нуклеотидних послідовностей [7, 14, 15]. Послідовності праймерів, молекулярна маса продуктів АС-ПЛР і рестрикції фрагменту *G1691A* алеля гена фактора V коагуляції та *G20210A* алеля гена фактора II коагуляції наведені в табл. 2.

or NucleospinDNAMini-Kit (Duren, Germany) according to the protocol provided by the manufacturer. The specific oligonucleotide primers were designed based on the previously published the nucleotide sequences [7, 14, 15]. The sequences of primers, the molecular weight product of PCR, and the restriction fragment of the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene and the *G20210A* allele of the coagulation factor II gene shown in Table 2.

## Таблиця 2

Послідовності праймерів, молекулярна маса продукту ПЛР, рестрикційного фрагменту *G1691A* алеля гена фактора V і *G20210A* алеля гена фактора II коагуляції

**Table 2**

The sequences of primers, the molecular weight product of PCR, the restriction fragment of the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene and the *G20210A* allele of the coagulation factor II gene

Тип праймера Primers	Послідовності праймерів Sequences of primers	Молекулярна маса / molecular weight	
		продукт ПЛР product of PCR	рестрикційний фрагмент мутантного алеля restriction fragment of the mutant allele
<b><i>G1691A</i> алель гена фактора V коагуляції</b>			
Прямий / straight	5'-tcaggcaggaacaacacccat	241 п. н.	209 п. н.
Зворотній / reverse	5'-ggttacttcaaggacaaaatacctgtaaagct		
<b><i>G20210A</i> алель гена фактора II коагуляції</b>			
Прямий / straight	5'-tctagaacagttgcctggc	345 п. н.	322 п. н.
Зворотній / reverse	5'-atagcactgggagcattgaagc		

Під час дослідження кодону *1691* гена проакцелерину та кодону *20210* гена протромбіну для ампліфікації ДНК, ПЛР здійснювали в мікропробірках (Eppendorf, Germany) у безолійній системі. Кінцеві об'єми реакційних сумішей становили по 24 мкл та містили приблизно 20 нг ДНК, 5,0 пмоль кожного з праймерів, 12 мкл суміші 2 × Мастер Мікс для ПЛР (2 × PCR Master Mix Fermentas, Литва) і води, вільної від нуклеотидів. Ампліфікацію проводили на термоциклері Gene-AmpPCR 2400, Applied Biosystem.

Для визначення частоти *G1691A* алеля гена фактора V коагуляції суміш ампліфікували протягом 36 циклів. Алель-специфічна полімеразна ланцюгова реакція складалась з етапу денатурації – 1 хв при 94 °C, анілінгу – 1 хв при 55 °C, елонгації – 1 хв при 72 °C, фінального синтезу – 10 хв при 72 °C, азупинку реакції проводили охолодженням реакційної суміші до 4 °C.

Для визначення *G20210A* алеля гена протромбіну суміш для АС-ПЛР ампліфікували протягом 35 циклів. Алель-специфічна полімеразна ланцюгова реакція складалась з етапу денатурації – 1 хв при 94 °C, анілінгу – 30 с при 59 °C, елонгації – 1 хв при 72 °C, фінального синтезу – 10 хв при 72 °C. Полімеразну

The PCR was performed in a microtube (Eppendorf, Germany) in a system without oil. It was made for the amplification of DNA during the investigation of the *1691* codon of the proaccelerin gene and the *20210* codon of the prothrombin gene. The final volume of the reaction mixtures was 24 ml and contained 20 ng of DNA, 5.0 pmol of each primer, 12 ml mixture of 2 × Master Mix for PCR (2 × PCR Master Mix Fermentas, Lithuania) and water free of nucleotides. The amplification was performed in the Thermocycler Gene-AmpPCR 2400, Applied Biosystem.

The mixture was amplified for 36 cycles to determine the frequency of *G1691A* allele of the coagulation factor V gene. The Allele-specific polymerase chain reaction consisted of the denaturation stage – 1 min at 94 °C, annealing – 1 min at 55 °C, elongation – 1 min at 72 °C, final synthesis – 10 min at 72 °C, and the stopping of the reaction, which was carried out by the cooling to 4 °C of the mixture.

The mixture was amplified for 35 cycles for to determine the frequency of the *G20210A* allele of the prothrombin gene. The Allele-specific polymerase chain reaction consisted of the stage: the denaturation – 1 min at 94 °C, the annealing – 30 sec at 59 °C, the elongation – 1 min at 72 °C, the

ланцюгову реакцію зупиняли охолодженням реакційної суміші до 4 °С.

Склад сумішей для АС-ПЛР та температурні режими реакцій відповідали наведеним у роботах [7, 14, 15].

Для рестрикції ампліфікату використовували ендонуклеазу – *Hind III* (Fermentas, Литва). Фрагменти ДНК аналізували за допомогою гель-електрофорезу в 3 % агарозному гелі та візуалізували в прохідному ультрафіолетовому світлі після фарбування гелю розчином бромистого етидію.

Нуклеотидний варіант *G1691A* гена фактора V коагуляції встановлювали при появі смуги на електрофореграмі, яка відповідає молекулярній масі 209 п. н. Алель дикого типу гена проакцелерину визначали за присутності продукту молекулярною вагою 241 п. н., наявність якого й слугувала контролем реакції. Алель *G20210A* та алель дикого типу гена фактору II коагуляції візуалізувалась на електрофореграмі як смуга, що відповідає молекулярній масі 322 п. н. і 345 п. н., відповідно. Наявність алеля дикого типу гена протромбіну також слугувала контролем проведеної реакції.

Під час статистичного аналізу непараметричні показники порівнювали за допомогою точного тесту Фішера в двобічному варіанті. Ступінь взаємозв'язку між категоріальними показниками вимірювали у вигляді відносного ризику (ВР) із відповідним 95 % довірчим інтервалом (ДІ).

Загальна частота виникнення тромботичних ускладнень за період клінічного спостереження виражалася у вигляді коефіцієнта судинних епізодів. Коефіцієнт визначався як відношення абсолютної кількості осіб із наявністю тромботичних ускладнень, що спостерігалися в загальній групі хворих, до суми тривалостей ризику кожної особи в усій когорті пацієнтів, яких обстежували. Для кожної особи тривалість ризику тромбозу складалась із часу, протягом якого вона належала до групи, яку досліджували, проте не мала судинного ускладнення, але мала ризик його отримати. Ці періоди ризику кожного члена групи підсумовувались. Сума тривалостей ризику, яка знаходиться в знаменнику, вимірюється в людино-роках [16, 17]. Різницю між частотою виникнення судинних епізодів у носіїв молекулярно-генетичних маркерів спадкової тромбофілії та осіб без них оцінювали за методом, описаним Н. Sahai та А. Kurshid. Для визначення того, наскільки цімолекулярно-генетичні маркери збільшують частоту виникнення тромботичних подій протягом періоду клінічного спостереження, використано показник

final synthesis – 10 min at 72 °С. The PCR was stopped by cooling the reaction mixture to 4°С

The mixtures of the AS-PCR reactions correspond to the temperatures, that were given in [7, 14, 15].

For restriction of the amplification used the *Hind III* (Fermentas, Lithuania) endonuclease. The DNA fragments were analyzed by the electrophoresis in 3 % agarose gel and visualized in the transmitted UV light after the staining of the gel by the ethidium bromide solution.

The *G1691A* nucleotide variant of coagulation factor V gene was confirmed by the appearance on the electropherogram of a stripe which corresponds to the molecular weight 209 b. p. The wild-type allele of proaccelerin gene was determined by the presence of molecular weight 241 b. p., which also served as a control reactions. The *G20210A* allele and the wild-type allele of coagulation factor II gene visualized on the electropherogram as a strip, which corresponded to the molecular weight 322 b. p. and 345 b. p. respectively. Presence of the wild-type allele of prothrombin gene also served as a control of the reaction.

During the statistical analysis, non-parametric data were compared using Fisher exact test in the bidirectional version. The degree of the relationship between categorical indicators is expressed as relative risk (RR) with a corresponding 95 % confidence interval (CI).

The total frequency of thrombotic complications during the period of clinical observation was expressed in the form of the rate of vascular episodes. The rate is defined as the ratio of the absolute number of people with the presence of thrombotic complications, which were observed in the overall group of patients, to the amount of the risk durations of each person in the entire cohort of patients. The duration of an each individual risk of thrombosis was the time during which a patient belonged to the study group and did not have any vascular complications, but still has the risk to get it. These periods of risks of each team member were summarized. The total duration of the risk, which is the denominator, measured in person-years [16, 17]. The difference between the rate incidence of vascular episodes in the carriers of the molecular-genetic marker and the persons without it is estimated by the method described by H. Sahai and A. Kurshid. For the determination, as far the molecular genetic markers were increased the incidence of thrombotic events, during the period of clinical observation, we applied the

різниці між коефіцієнтами судинних епізодів з відповідним 95 % ДІ. Використання даного статистичного інструменту дозволяє порівняти групи з різними періодами спостереження [18].

Наявність істотних розбіжностей припускали за вірогідності помилки менше 0,05.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали на персональному комп'ютері. Цифрові дані аналізували за допомогою програмного забезпечення пакету Statistica 10,0 (StatSoft, США) та MedCalc 12.5.0.0 (MedCalc Software bvba, Бельгія).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Молекулярно-генетичне дослідження носійства *G1691A* алеля гена фактора V коагуляції та *G20210A* алеля гена фактора II коагуляції проведено в 180 хворих на СП, із них 31 пацієнт належав до основної, а 149 осіб – до контрольної групи. Успішна ампліфікація спостерігалась у 100 % випадків.

Наявність одного з двох молекулярно-генетичних маркерів спадкової тромбофілії, а саме *G1691A* алеля гена фактора V коагуляції або *G20210A* алеля гена фактора II коагуляції, виявлена у 10 із 149 (6,71 % випадків) хворих на спонтанну та в 1 із 31 (3,22 % випадків) пацієнта, хворого на радіаційно-асоційовану СП. Різниця в частоті носійства будь-якого з двох молекулярно-генетичних маркерів спадкової тромбофілії в основній та контрольній групах не виявлено ( $p = 0,692$ ). У 3 із 10 носіїв протромботичних мутацій факторів коагуляції контрольної групи та в 1 із 1 носія основної групи було судинне ускладнення в анамнезі. Зауважимо, що частота клінічної реалізації протромбогенного потенціалу носійства *G1691A* алеля гена проакцелерину або *G20210A* алеля гена протромбіну за спонтанної та радіаційно-асоційованої СП не відрізнялась ( $p=0,363$ ).

Нуклеотидний варіант *G1691A* гена фактора V коагуляції представлений у 6 зі 149 (4,02 % осіб) випадків спонтанної та в 1 з 31 (3,22 % осіб) епізодів радіаційно-асоційованої СП. Різниця в частоті носійства алеля *G1691A* гена проакцелерину в основній та контрольній групах СП не виявлено ( $p = 1,000$ ). У 2 із 6 носіїв *G1691A* алеля гена фактора V коагуляції зі спонтанною СП присутні тромботичні епізоди в анамнезі, а саме атипівні венозні тромбози. Частота реалізації протромбогенного потенціалу наявності нуклеотидного варіанта *G1691A* гена проакцелерину у хворих на радіаційно-асоційовану СП не відрізнялась від такої, розрахованої для спонтанної мієлопроліфера-

index of the difference between the rates of vascular episodes with a corresponding 95% CI. Using this statistical tool allows you to compare different periods of observation [18].

The presence of significant differences is assumed by the error probability less than 0.05.

Statistical analysis of the results was performed on a PC. Numerical data was analyzed using the Statistica 10.0 (StatSoft, USA) and MedCalc 12.5.0.0 (MedCalc Software bvba, Belgium).

## RESULTS AND DISCUSSION

The molecular-genetic studies of the *G1691A* allele of coagulation factor V gene and the *G20210A* allele of coagulation factor II gene carriers were conducted in 180 PV patients (31 persons in the main group and 149 people – in the control group). Successful amplification was observed in 100 % of cases.

The presence of any of the two molecular genetic markers of the hereditary thrombophilia, such as the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene and the *G20210A* allele of the coagulation factor II gene, was detected in 10 of 149 (6.71 % of cases) patients with spontaneous PV and in 1 of 31 (3.22 % of cases) patients with radiation-associated PV. In the main and control group was not found a difference between the frequency of the carriers of any of the two molecular genetic markers of the hereditary thrombophilia ( $p = 0.692$ ). In 3 out of 10 carriers prothrombotic mutations of coagulation factors in the control group and in 1 of 1 carrier in the main group had vascular complications in a history. Notably that the frequency of clinical manifestation of prothrombogenic potential of proactseleryn gene *G1691A* allele or prothrombin gene *G20210A* allele carriage in spontaneous and radiation-associated PV did not differ ( $p = 0.363$ ).

The *G1691A* nucleotide variant of the coagulation factor V gene was represented in 6 of 149 (4.02 % of cases) spontaneous cases and in 1 of 31 (3.22 % of cases) episodes of radiation-associated PV. In the main and control groups PV was not found the difference between the frequency of the carriers of the *G1691A* allele of the proaccelerin gene ( $p = 1.000$ ). Two of 6 the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene carriers with spontaneous PV had thrombotic episodes in an anamnesis, namely, – atypical venous thrombosis. The frequency of implementation of prothrombogenic potential the fact of the presence of the *G1691A* nucleotide variant of the gene in patients with radiation-associated PV did not differ from that

тивної патології, і визначалась в 1 із 1 випадку ( $p = 0,428$ ).

Алець *G20210A* гена протромбіну ідентифіковано в 4 із 149 (2,68 %) хворих на радіаційно-асоційовану СП, а в 1 з її 4 носіїв присутня в анамнезі васкулярна подія, представлена типовим артеріальним тромбозом. Нуклеотидний варіант *G20210A* гена фактора II коагуляції не визначено в жодного з 31 пацієнта з СП, який постраждав унаслідок аварії на ЧАЕС. Проте, різниці в частоті носійства алеля *G20210A* гена протромбіну в основній і контрольній групах хворих на СП не виявлено ( $p = 1,000$ ).

Частота носійства маркерів спадкової тромбофілії у хворих на спонтанну СП з тромбозами і пацієнтів без них, що складала 5,76 % (у 3 осіб) та 7,21 % (у 7 осіб) випадків відповідно, однакова (3 із 52 проти 7 із 97;  $p = 1,000$ ). У хворих на радіаційно-асоційовану СП з васкулярними епізодами в анамнезі частота носійства *G1691A* алеля гена проакцелерину або *G20210A* алеля гена протромбіну дорівнювала 9,09 % (у 1 особи) та не відрізнялась (1 із 11 проти 0 із 20;  $p = 0,354$ ) від частоти, визначеної для пацієнтів без тромботичних ускладнень.

При СП різниці в частоті судинних подій у хворих з наявністю будь-якого з двох генетичних маркерів спадкової тромбофілії та пацієнтів без них не виявлено в контрольній (3 з 10 осіб проти 49 з 139 осіб;  $p = 1,000$ ) і основній (1 з 1 особи проти 10 з 30 осіб;  $p = 0,354$ ) групах.

Не спостерігалось також збільшення частоти будь-яких тромбозів та венозних судинних ускладнень серед носіїв *G1691A* алеля гена фактору V коагуляції зі спонтанною (2 із 6 проти 50 з 143;  $p = 1,000$  та 2 із 6 проти 26 із 143;  $p = 0,314$  відповідно) і радіаційно-асоційованою (1 із 1 проти 10 із 30;  $p = 0,354$  та 1 із 1 проти 7 із 30;  $p = 0,233$  відповідно) СП, порівняно з особами з алелями дикого типу. Не визначено переважання частоти будь-яких тромбозів та артеріальних васкулярних подій у контрольній групі хворих на СП з нуклеотидним варіантом *G20210A* гена фактора II коагуляції (1 із 4 проти 51 із 145;  $p = 1,000$  та 1 із 4 проти 23 проти 145;  $p = 0,508$ ) порівняно з пацієнтами без нього.

З метою визначення внеску *G1691A* алеля гена проакцелерину і *G20210A* алеля гена протромбіну в зміну частоти виникнення тромбозів з урахуванням фактору часу, обраховано загальну частоту розвитку судинних подій протягом періоду клінічного спостереження (коефіцієнт розвитку тромбозів) пацієнтів із наявністю та відсутністю генетичних маркерів спадкової тромбофілії. Порівняно частоти розвитку

calculated for spontaneous myeloproliferative diseases, and determined to 1 of 1 case ( $p = 0.428$ ).

The *G20210A* allele of prothrombin gene was identified in 4 of 149 (2.68 %) patients with radiation-associated PV. One of 4 carriers had in a history of a vascular event – a typical arterial thrombosis. The *G0210A2* nucleotide variant of coagulation factor II gene is not defined in any of the 31 PV patients, which has suffered as a result of the accident. However, differences in the *G20210A* allele frequency carriers of the prothrombin gene in the main and the control groups of PV patients were not found ( $p = 1.000$ ).

Frequency of the carriers of the hereditary thrombophilia markers in the spontaneous PV patients with thrombosis and without them, amounting to 5.76 % ( $n=3$ ) and 7.21 % ( $n=7$ ) cases respectively, is the same (3 of 52 vs 7 of 97,  $p = 1.000$ ). Frequency of carriers of the *G1691A* allele of the proaccelerin gene or the *G20210A* allele of prothrombin gene in radiation-associated PV patients with vascular episodes in the anamnesis was 9.09% ( $n=1$ ) and did not differ (1 of 11 vs 0 of 20;  $p = 0.354$ ) from the frequency, determined for patients without thrombotic complications.

No difference in the incidence of vascular events in PV patients with any of the two genetic markers of the hereditary thrombophilia and patients without them is found in the control (3 of 10 people vs 49 of the 139 persons;  $p = 1.000$ ) and the main (1 of 1 people vs 10 of 30 people;  $p = 0.354$ ) group.

Also, there was no the increasing of the frequency of any thrombosis and venous vascular complications among the carriers of the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene with spontaneous (2 of 6 vs 50 of 143,  $p = 1.000$  and 2 of 6 vs 26 of 143,  $p = 0.314$  respectively) and radiation-associated (1 of 1 vs 10 of 30,  $p = 0.354$  and 1 of 1 vs 7 of 30,  $p = 0.233$  respectively) PV, in comparison with the carriers of the wild-type alleles. The prevalence of the rate of any thrombosis and arterial vascular events in the control group patients with the *G20210A* nucleotide variant of the coagulation factor II gene (1 of 4 vs 51 of 145,  $p = 1.000$  and 1 of 4 vs 23 of 145,  $p = 0.508$ ), in comparison of the patients without its, was not found.

For the determination the contribution of the *G1691A* allele of proaccelerin gene and the *G20210A* allele of prothrombin gene to the change of the incidence of thrombosis considering the time factor and calculated the overall incidence of cardiovascular events over a period of clinical observation (rate of thrombosis) in patients with presence and absence of genetic markers of hereditary thrombophilia. We



тромбозів протягом періоду клінічного спостереження (коефіцієнти розвитку судинних епізодів) між хворими на СП з наявністю Лейденської мутації або *G20210A* алеля гена протромбіну і пацієнтами без неї. Рівень зростання частоти виникнення тромбозів у хворих на СП, який обумовлений наявністю спадкової тромбофілії, виражався у вигляді різниці між частотами виникнення тромботичних епізодів із відповідними 95 % ДІ.

У носіїв *G1691A* алеля гена фактору V коагуляції, у порівнянні з особами з алелем дикого типу, визначено вище значення частоти розвитку будь-яких тромботичних подій та венозних васкулярних ускладнень протягом періоду клінічного спостереження при спонтанній та радіаційно-асоційованій СП (табл. 3). Визначено, що в носіїв *G1691A* алеля гена проакцелерину, які належали до контрольної групи хворих на СП, спостерігається на 25,00 людино-років достовірно більший коефіцієнт виникнення будь-яких тромбозів (95 % ДІ = 0,62–50,00;  $p = 0,044$ ) і судинних подій у венозному руслі (95 % ДІ = 10,00–50,00;  $p = 0,039$ ), а в основній групі – на 33,33 людино-років (95 % ДІ = 0,22–100,00;  $p = 0,048$  та 95 % ДІ = 12,50–50,00;  $p = 0,003$ , відповідно). Натомість не виявлено різниці між значенням коефіцієнта виникнення як будь-яких тромбозів, так і артеріальних васкулярних подій, розрахованим для хворих на спонтанну СП з нуклеотидним варіантом *G20210A* гена II фактора коагуляції, і коефіцієнтом, визначеним для когорти пацієнтів без нього.

Молекулярно-генетичні маркери спадкової тромбофілії виявлені у 5 із 111 (4,50 %) хворих на спонтанну ЕТ, проте їх носійство не визначено за даного радіаційно-асоційованого мієлопроліферативного неопластичного процесу. Різниця між частотою *G1691A* алеля гена фактора V коагуляції або *G20210A* алеля гена протромбіну у хворих на ЕТ основної групи та в пацієнтів контрольної групи була відсутня (5 із 111 проти 0 із 10;  $p = 1,000$ ).

Наявність алеля *G1691A* гена проакцелерину визначено у 3 із 111 (2,70 %) випадків спонтанної та в жодному з епізодів радіаційно-асоційованої ЕТ. Різниця у частоті носійства нуклеотидного варіанту *G1691A* гена фактора V коагуляції між основною та контрольною групами пацієнтів з ЕТ (3 із 111 проти 0 із 10;  $p = 1,000$ ) не виявлено. В 1 із 3 носіїв *G1691A* алеля гена проакцелерину зі спонтанною ЕТ присутній тромбоз в анамнезі – типовий венозний судинний епізод.

Нуклеотидний варіант *G20210A* гена фактора II коагуляції зустрічався у 2 із 111 (1,80 %) хворих на ЕТ

compared the incidence of thrombosis during a period of clinical observation (rate of vascular episodes) between PV patients with Leiden mutation or the *G20210A* allele of the prothrombin gene and those without it. The level of the increasing of the incidence of thrombosis in PV patients, which is due to the presence of the hereditary thrombophilia, was expressed as the difference between the incidences of thrombotic episodes with respective 95% CI.

At spontaneous and radiation-associated PV the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene carriers, compared with those, who had the wild-type allele, were identified above the incidence rate of any thrombotic events and venous vascular complications during the period of clinical observation (Table 3). It was determined, that in the *G1691A* allele of the proaccelerin gene carriers, that belonged to the control group of patients with PV, were observed at 25.00 person-years greater rate of any thrombosis (95 % CI = 0.62–50.00,  $p = 0.044$ ) and venous vascular events (95 % CI = 10.00–50.00;  $p = 0.039$ ) and in the main group – at 33.33 person-years (95% CI = 0.22–100.00,  $p = 0.048$  and 95 % CI = 12.50–50.00,  $p = 0.003$  respectively). Instead, the differences were not found between the rate of the occurrence of any thrombosis and arterial vascular events, which was calculated for spontaneous PV patients with the *G20210A* nucleotide variant of the coagulation factor II gene, and which was defined in the cohort of patients with wild allele.

The molecular genetic markers of the hereditary thrombophilia were detected in 5 of 111 (4.50 %) patients with spontaneous ET, but their carriers have not defined in the group of patients with the radiation-associated myeloproliferative neoplastic process. The difference in the frequency of the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene or the *G20210A* allele of the prothrombin gene in the main and of the group of ET patients was not observed (5 of 111 vs 0 of 10,  $p = 1.000$ ).

The allele *G1691A* of proaccelerin gene was identified in 3 of 111 (2.70%) cases of spontaneous in none of radiation-associated ET episodes. No difference in frequency of factor V gene nucleotide variant *G1691A* carrier was found between coagulation and control group patients with ET (3 of 111 to 0 of 10;  $p = 1.000$ ). 1 of the 3 allele carriers *G1691A* gene proaccelerin with spontaneous thrombosis present ET in history i.e. a typical venous vascular episode.

The *G20210A* nucleotide variant of the coagulation factor II gene met in 2 of 111 (1.80 %) ET

**Таблиця 3**

Частота розвитку тромбозів у хворих на СП з алелем *G1691A* гена фактору V, *G20210A* гена фактора II коагуляції та з алелем дикого типу

**Table 3**

The frequency of thrombosis in PV patients with the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene, the *G20210A* allele of the coagulation factor II and patients with wild-type allele

Локалізація тромбозів	Хворі з наявністю тромбозів та алеля дикого типу гена фактору V коагуляції		Хворі з наявністю тромбозів та <i>G1691A</i> алеля гена фактору V коагуляції		<i>p</i> *
	кількість людино-років на 100 людино-років, (95 % ДІ)	частота епізодів на 100 людино-років, (95 % ДІ)	кількість людино-років на 100 людино-років, (95 % ДІ)	частота епізодів на 100 людино-років, (95 % ДІ)	
Усі тромбози / all thrombosis (n = 11)	153,00	6,66 (3,12–12,50)	2,50	33,33 (1,01–99,00)	0,048
Венозні тромбози / all thrombosis (n = 7)	153,00	3,22 (1,06–7,69)	2,50	33,33 (1,01–99,00)	0,003
Усі тромбози / all thrombosis (n = 52)	610,00	8,33 (6,25–11,11)	6,34	33,33 (3,84–100,00)	0,044
Венозні тромбози / all thrombosis (n = 28)	610,00	4,34 (5,26–6,25)	6,34	33,33 (3,84–100,00)	0,001
<i>Основна група хворих на СП / the main group of PV patients (n = 31)</i>					
<i>Контрольна група хворих на СП / the control group of PV patients (n = 149)</i>					
Усі тромбози / all thrombosis (n = 11)	153,00	6,66 (3,12–12,50)	2,50	33,33 (1,01–99,00)	0,048
Венозні тромбози / all thrombosis (n = 7)	153,00	3,22 (1,06–7,69)	2,50	33,33 (1,01–99,00)	0,003
Усі тромбози / all thrombosis (n = 52)	610,00	8,33 (6,25–11,11)	6,34	33,33 (3,84–100,00)	0,044
Венозні тромбози / all thrombosis (n = 28)	610,00	4,34 (5,26–6,25)	6,34	33,33 (3,84–100,00)	0,001
<i>Хворі з наявністю тромбозів та алеля дикого типу гена фактору II коагуляції</i>					
<i>Хворі з наявністю тромбозів та <i>G20210A</i> алеля гена фактору II коагуляції</i>					
Локалізація тромбозів	Хворі з наявністю тромбозів та алеля дикого типу гена фактору II коагуляції		Хворі з наявністю тромбозів та <i>G20210A</i> алеля гена фактору II коагуляції		<i>p</i> *
Локалізація тромбозів	кількість людино-років на 100 людино-років, (95 % ДІ)	частота епізодів на 100 людино-років, (95 % ДІ)	кількість людино-років на 100 людино-років, (95 % ДІ)	частота епізодів на 100 людино-років, (95 % ДІ)	
Усі тромбози / all thrombosis (n = 52)	611,29	8,33 (6,25–11,11)	5,05	20,00 (0,50–100,00)	0,388
Артеріальні тромбози / arterial thrombosis (n = 24)	611,29	4,16 (2,63–5,88)	5,05	20,00 (0,50–100,00)	0,086
<i>Контрольна група хворих на СП / the control group of PV patients (n = 149)</i>					

Примітка. *p*\* – різниця між значеннями частоти виникнення тромбозів у хворих на СП з алелем *G1691A* гена фактору V, *G20210A* гена фактору II коагуляції та з алелем дикого типу (розрахунок на 100 людино-років).

Note. *p*\* – the difference between the incidence of thrombosis in PV patients with the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene, the *G20210A* allele of the coagulation factor II and patients with wild-type allele (calculated per 100 person-years).

контрольної групи, а в 1 із 2 його носіїв була васкулярна подія в анамнезі, представлена типовим венотромбозом. У пацієнтів з ЕТ основної групи носійство *G20210A* алеля гена протромбіну не виявлено. Різниця в частоті носійства нуклеотидного варіанта *G20210A* гена фактора II коагуляції між хворими на ЕТ, які постраждали внаслідок аварії на ЧАЕС, і пацієнтами з мієлопроліферативним неопластичним процесом без впливу аварійного іонізуючого опромінення, не визначено (0 із 10 проти 2 із 111;  $p = 1,000$ ).

Частота носійства *G1691A* алеля гена фактору V коагуляції або *G20210A* алеля гена протромбіну у хворих на спонтанну ЕТ із тромбозами в анамнезі та без них, що складала 10,00 % (у 2 осіб) і 3,29 % (у 3 осіб) випадків відповідно, була однаковою (2 із 20 проти 3 із 91;  $p = 0,220$ ).

Підтверджено, що наявність будь-якого з двох молекулярно-генетичних маркерів спадкової тромбофілії у хворих контрольної групи не збільшує частоту тромботичних ускладнень при спонтанній ЕТ (2 із 5 проти 18 із 106;  $p = 0,220$ ).

Також не виявлено збільшення частоти будь-яких тромбозів та венотромбозів ускладнень у носіїв *G1691A* алеля гена фактору V коагуляції зі спонтанною ЕТ (1 із 3 осіб проти 19 із 108 осіб;  $p = 0,452$  та 1 із 3 проти 10 із 108;  $p = 0,271$  відповідно), порівняно з особами з алелем дикого типу. Не спостерігалось превалювання частоти тромботичних подій і венотромбозів судинних епізодів у хворих на спонтанну ЕТ із нуклеотидним варіантом *G20210A* гена фактора II коагуляції (1 із 2 проти 19 із 109 осіб;  $p = 0,329$  та 1 із 2 проти 1 із 2 проти 10 із 109;  $p = 0,189$  відповідно) у порівнянні з хворими без нього.

Проведено аналіз внеску спадкової тромбофілії у розвиток тромбозів при ЕТ з урахуванням фактору часу. Для цього порівнювали частоту розвитку тромбозів за період клінічного спостереження між хворими на ЕТ із наявністю Лейденської мутації або *G20210A* алеля гена протромбіну і пацієнтами без неї.

Визначено, що при спонтанній ЕТ носії *G1691A* алеля гена фактору V коагуляції, у порівнянні з особами з алелем дикого типу, мають більшу частоту розвитку тромбозів та венотромбозів судинних епізодів протягом періоду клінічного спостереження за ними (табл. 4). При спонтанній ЕТ різниця в загальній частоті виникнення будь-яких тромбозів і судинних подій у венотромбозі між особами із *G1691A* алелем гена проакцелерину та пацієнтами без нього становить 33,33 людино-

patients from the control group, the one of 2 carriers had a vascular event in the anamnesis, represented as a typical venous thrombosis. It was not found the carriers of the *G20210A* allele of the prothrombin gene in the main group of ET patients. The differences of the frequency of the *G20210A* nucleotide variant of the coagulation factor II gene carriers was not defined between the ET patients survived the Chernobyl accident, and patients with MNP, who were not affected by the emergency ionizing radiation (0 of 10 vs 2 of 111,  $p = 1.000$ ).

The frequency of the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene carriers or the *G20210A* allele of the prothrombin gene in spontaneous ET patients with thrombosis and without them was similar (2 of 20 vs 3 of 91,  $p = 0.220$ ) and was corresponded to 10.00 % (2 people) and 3.29 % (3 persons) cases respectively.

It was confirmed, that the presence of any of the two of the molecular-genetic markers of the hereditary thrombophilia in the control group patients did not increase the incidence of thrombotic complications in spontaneous ET (2 of 5 vs 18 of 106,  $p = 0.220$ ).

Also not revealed an increase in the frequency of any thrombosis and venous vascular complications in carriers *G1691A* allele gene factor V coagulation with spontaneous ET (1 of 3 people to 19 of 108 persons;  $p = 0.452$  and 1 of 3 vs. 10 of 108;  $p = 0.271$  respectively), compared with those of wild-type allele. There was no prevalence rate of thrombotic events and venous vascular episodes in patients with spontaneous ET with nucleotide variant *G20210A* gene factor II, coagulation (1 of 2 to 19 with 109 people;  $p = 0.329$  and 1 of 2 against 1 of 2 to 10 from 109,  $p = 0.189$ , respectively) compared with patients without it.

To evaluate the contribution of hereditary thrombophilia in the development of thrombosis with ET in considering the time factor we compared the incidence of thrombosis during a period of the clinical observation between ET patients with the presence of Leiden mutation or the *G20210A* allele of the prothrombin gene and those without it.

At spontaneous ET the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene carriers vs. those, who had the wild-type allele, have above the incidence rate of any thrombotic events and venous vascular episodes during the period of clinical observation (Table 4). At a spontaneous ET the difference of overall incidence of any thrombosis and venous vascular events between patients with the *G1691A* allele of the proaccelerin gene and those without was 33.33 person-years (95 % CI = 0.08–50.0,  $p = 0.049$  and

**Таблиця 4**

Частота розвитку тромбозів у хворих на ET контрольної групи з алелем G1691A гена фактору V, G20210A гена фактора II коагуляції та з алелем дикого типу

**Table 4**

The frequency of thrombosis in ET patients with the G1691A allele of the coagulation factor V gene, the G20210A allele of the coagulation factor II and patients with wild-type allele

Локалізація тромбозів	Хворі з наявністю тромбозів та алеля дикого типу гена фактору V коагуляції		Хворі з наявністю тромбозів та G1691A алеля гена фактору V коагуляції		p*
	кількість людино-років amount of person-years	частота епізодів на 100 людино-років, (95 % ДІ) incidence of episodes on 100 person-years, (95 % CI)	кількість людино-років amount of person-years	частота епізодів на 100 людино-років, (95 % ДІ) the incidence of episodes on 100 person-years, (95 % CI)	
Усі тромбози / all thrombosis (n = 20)	280,00	6,66 (4,16–11,11)	2,50	33,33 (1,01–100,00)	0,049
Венозні тромбози / venous thrombosis (n = 11)	280,00	3,57 (1,72–6,66)	2,50	33,33 (1,01–100,00)	0,003
<i>Контрольна група хворих на ET / the control group of ET patients (n = 111)</i>					
Локалізація тромбозів	Хворі з наявністю тромбозів та алеля дикого типу гена фактору II коагуляції		Хворі з наявністю тромбозів та G20210A алеля гена фактору II коагуляції		p*
Локалізація тромбозів	кількість людино-років amount of person-years	частота епізодів на 100 людино-років, (95 % ДІ) incidence of episodes on 100 person-years, (95 % CI)	кількість людино-років amount of person-years	частота епізодів на 100 людино-років, (95 % ДІ) the incidence of episodes on 100 person-years, (95 % CI)	
Усі тромбози / all thrombosis (n = 20)	278,30	6,66 (4,16–11,11)	4,20	25,00 (0,60–100,00)	0,194
Венозні тромбози / all thrombosis (n = 11)	278,30	4,00 (1,96–7,14)	4,20	25,00 (0,50–100,00)	0,050

Примітка. p\* – різниця між значеннями частоти виникнення тромбозів у хворих на спотанну ET із алелем G1691A гена фактору V, G20210A гена фактору II коагуляції та з алелем дикого типу (розрахунок на 100 людино-років).  
Note. p\* – the difference between the incidence of thrombosis in PV patients with the G1691A allele of the coagulation factor V gene, the G20210A allele of the coagulation factor II and patients with wild-type allele (calculated per 100 person-years).

років (95 % ДІ = 0,08–50,0;  $p = 0,049$  та 95 % ДІ = 12,5–50,0;  $p = 0,003$  відповідно). Крім того, у хворих на спонтанну ЕТ, на межі статистичної значущості ( $p = 0,050$ ), виявлено різницю між значеннями коефіцієнта виникнення венозних тромбозів для носіїв нуклеотидного варіанту *G20210A* гена II фактора коагуляції та для осіб з алелем дикого типу, що складала 20,00 людино-років (95 % ДІ = 0,002–33,33;  $p = 0,050$ ).

У групі хворих на спонтанний та радіаційно-асоційований ПМФ 6 із 78 (7,69 %) осіб та 2 із 22 (9,09 %) пацієнтів відповідно, були носіями одного з двох молекулярно-генетичних маркерів спадкової тромбофілії. Різниця у частоті носійства маркерів спадкової тромбофілії в основній та контрольній групах ПМФ не виявлено (6 із 78 проти 2 із 22;  $p = 1,000$ ). За наявності *G1691A* алеля гена фактора V або *G20210A* алеля гена фактора II коагуляції у хворих на ПМФ, які не зазнали впливу аварійного іонізуючого опромінення, тромбози зустрічались у 3 із 6 носіїв та були представлені як венозними васкулярними подіями – у 2 випадках, так і артеріальним васкулярним епізодом – в 1 епізоді. У хворих на ПМФ із радіаційним анамнезом судинні події були в 1 із 2 носіїв молекулярно-генетичних маркерів спадкової тромбофілії. Різниця в частоті клінічної реалізації протромбогенного потенціалу носійства *G1691A* алеля гена фактора V або *G20210A* алеля гена фактора II коагуляції в основній та контрольній групі ПМФ не спостерігалось (1 із 2 проти 3 із 6;  $p = 1,000$ ).

Виявлено більшу частоту носійства *G1691A* алеля гена фактора V коагуляції або *G20210A* алеля гена протромбіну {27,27 % (у 3 осіб) і 4,47 % (у 3 осіб) випадків, відповідно} у хворих на спонтанний ПМФ із тромбозами в анамнезі, ніж у пацієнтів без них (3 із 11 проти 3 із 67;  $p = 0,033$ ). У хворих на радіаційно-асоційований ПМФ із тромботичними ускладненнями та без них частота носійства маркерів спадкової тромбофілії не відрізнялась (1 із 4 проти 1 із 18;  $p = 0,337$ ) і становила 25,00 % (у 1 особи) та 5,55 % (у 1 особи) епізодів відповідно.

Наявність *G1691A* алеля гена проакцелерину або *G20210A* алеля гена протромбіну у хворих на спонтанний ПМФ збільшувала частоту тромбозів (3 із 6 проти 8 із 72;  $p = 0,033$ ) та в 6,09 раза (ВР = 6,09; 95 % ДІ = 1,40–26,43) підвищувала ймовірність їх виникнення. Проте при радіаційно-асоційованому ПМФ носійство маркерів спадкової тромбофілії не впливало на частоту тромботичних судинних подій (1 із 2 проти 2 із 20;  $p = 0,337$ ).

95 % CI = 12.5–50.0,  $p = 0.003$  respectively). In addition, in the cohort patients with spontaneous ET, on the borderline of statistical significance ( $p = 0.050$ ), were found the differences between the rates of the occurrence of venous thrombosis, which were calculated for the *G20210A* variant nucleotide of the coagulation factor II gene carriers and for those with wild-type allele. It amounted to 20.00 person-years (95 % CI = 0.002–33.33,  $p = 0.050$ ).

In the group of patients with a spontaneous and radiation-associated PMF 6 of 78 (7.69 %) and 2 of 22 (9.09 %) subjects, respectively, were carriers of one of the two molecular-genetic markers of hereditary thrombophilia. No differences in the frequency of carriers of genetic-markers of thrombophilia in the main and control groups of PMF were found (6 of 78 vs 2 of 22,  $p = 1.000$ ). Thromboses in patients with PMF, who were not affected by the emergency ionizing radiation, were encountered in 3 of the 6 of the carriers of the *G1691A* allele of coagulation factor V or the *G20210A* allele of coagulation factor II gene. Thromboses were presented as venous vascular events ( $n=2$ ) and as arterial vascular episodes ( $n=1$ ). In PMF patients with radiation in a history, vascular events were in 1 of 2 carriers of the molecular genetic markers of hereditary thrombophilia. No difference in the frequency of clinical implementation of the prothrombogenic potential of the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene or *G20210A* allele of the factor II gene carriers of the main and control group of PMF was observed (1 of 2 vs 3 of 6,  $p = 1.000$ ).

The bigger frequency of the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene or the *G20210A* allele of the prothrombin gene {27.27 % ( $n=3$ ) and 4.47 % ( $n=3$ ), respectively} was revealed in PMF patients with spontaneous thrombosis, than in patients without these (3 of 11 vs 3 of 67,  $p = 0.033$ ). In radiation-associated PMF patients with thrombotic complications of and without there, the frequency of carriers of genetic markers of thrombophilia did not differ (1 of 4 vs 1 of 18,  $p = 0.337$ ) and amounted to 25.00% (1 person) and 5.55% (1 person) episodes respectively.

Presence of the *G1691A* allele of proaccelerin gene or the *G20210A* allele of prothrombin gene has increased the frequency of thrombosis (3 of 8 vs 6 of 72,  $p = 0.033$ ) and the probability of their occurrence in 6.09 times (RR = 6.09; 95 % CI = 1.40–26.43) in patients with spontaneous PMF. However, the genetic markers of thrombophilia did no effect on the incidence of thrombotic vascular events (1 of 2 vs 2 of 20,  $p = 0.337$ ) in radiation-associated PMF.

Таблиця 5

Частота розвитку тромбозів у хворих на ПМФ з алелем G1691A гена фактору V, G20210A гена фактора II коагуляції та з алелем дикого типу

Table 5

The frequency of thrombosis in PMF patients with the G1691A allele of the coagulation factor V gene, the G20210A allele of the coagulation factor II and patients with wild-type allele

Локалізація тромбозів	Хворі з наявністю тромбозів та алеля дикого типу гена фактору V коагуляції		Хворі з наявністю тромбозів та G1691A алеля гена фактору V коагуляції		p*
	кількість людино-років на 100 людино-років, (95 % ДІ)	частота епізодів на 100 людино-років, (95 % ДІ)	кількість людино-років на 100 людино-років, (95 % ДІ)	частота епізодів на 100 людино-років, (95 % ДІ)	
Localization of thrombosis	amount of person-years	incidence of episodes on 100 person-years, (95 % CI)	amount of person-years	the incidence of episodes on 100 person-years, (95 % CI)	
<b>Основна група хворих на ПМФ / main group of PMF patients (n = 22)</b>					
Усі тромбози / all thrombosis (n = 4)	93,50	3,22 (0,66–9,09)	4,00	25,00 (0,63–100,00)	0,035
Артеріальні тромбози / arterial thrombosis (n = 4)	93,50	3,22 (0,66–9,09)	4,00	25,00 (0,63–100,00)	0,035
<b>Контрольна група хворих на ПМФ / control group of PMF patients (n = 78)</b>					
Усі тромбози / all thrombosis (n = 11)	176,28	5,00 (4,16–10,00)	5,75	33,33 (3,84–100,00)	0,004
Венозні тромбози / venous thrombosis (n = 7)	176,28	2,85 (0,19–6,66)	5,75	33,33 (3,84–100,00)	0,0001
<b>Хворі з наявністю тромбозів та алеля дикого типу гена фактору II коагуляції</b>					
<b>Хворі з наявністю тромбозів та G20210A алеля гена фактору II коагуляції</b>					
Локалізація тромбозів	Хворі з наявністю тромбозів та алеля дикого типу гена фактору II коагуляції		Хворі з наявністю тромбозів та G20210A алеля гена фактору II коагуляції		p*
Localization of thrombosis	кількість людино-років на 100 людино-років, (95 % ДІ)	частота епізодів на 100 людино-років, (95 % ДІ)	кількість людино-років на 100 людино-років, (95 % ДІ)	частота епізодів на 100 людино-років, (95 % ДІ)	
amount of person-years	incidence of episodes on 100 person-years, (95 % CI)	the incidence of episodes on 100 person-years, (95 % CI)	amount of person-years	the incidence of episodes on 100 person-years, (95 % CI)	
<b>Контрольна група хворих на ПМФ / control group of PMF patients (n = 78)</b>					
Усі тромбози / all thrombosis (n = 11)	611,29	5,55 (2,70–10,00)	5,05	20,00 (0,72–100,00)	0,083
Артеріальні тромбози / arterial thrombosis (n = 4)	611,29	1,66 (0,34–5,00)	5,05	20,00 (0,72–100,00)	0,0008

Примітка. p\* – різниця між значеннями частоти виникнення тромбозів у хворих на ПМФ з алелем G1691A гена фактору V, G20210A гена фактору II коагуляції та з алелем дикого типу (розрахунок на 100 людино-років).

Note. p\* – the difference between the incidence of thrombosis in PMF patients with the G1691A allele of the coagulation factor V gene, the G20210A allele of the coagulation factor II and patients with wild-type allele (calculated per 100 person-years).

У контрольній та основній групі пацієнтів із ПМФ *G1691A* алель гена фактора V коагуляції представлена 4 із 78 (5,12 %) та 2 із 22 (9,09 %) випадків відповідно, а *G20210A* алель гена протромбіну – 2 із 78 (2,56 %) та 0 із 22 епізодів відповідно. У 2 із 4 носіїв *G1691A* алеля гена проакцелерину, які належали до контрольної групи хворих на ПМФ, в анамнезі був судинний епізод, а саме: атиповий венозний – в одного хворого, типовий венозний – в іншого. В основній групі пацієнтів із ПМФ 1 із 2 носіїв *G1691A* алеля гена фактора V коагуляції мав типову васкулярну артеріальну подію. У 1 із 2 носіїв *G20210A* алеля гена фактора II коагуляції зі спонтанним ПМФ також був один судинний епізод, що представлений атипичним венозним тромбозом.

При спонтанному та радіаційно-асоційованому ПМФ не спостерігалось збільшення зустрічальності тромбозів серед носіїв *G1691A* алеля гена фактору V коагуляції (2 із 4 проти 9 з 74;  $p = 0,093$  та 1 із 2 проти 3 із 17;  $p = 0,337$  відповідно). У хворих на спонтанний ПМФ різниці в частоту тромбозів між пацієнтами з нуклеотидним варіантом *G20210A* гена фактора II коагуляції та особами без нього не виявлено (1 із 2 проти 10 із 76;  $p = 0,263$ ). Проте визначено, що венозні тромбози зустрічаються частіше за носійства *G1691A* алеля гена фактору V коагуляції хворими на спонтанну ПМФ, ніж за наявності дикого алеля в даній групі пацієнтів (2 із 4 проти 5 із 74;  $p = 0,038$ ), а їх ризик зростає в 10,14 раза (95 % ДІ = 1,67–61,33). Натомість, в основній групі пацієнтів із ПМФ наявність *G1691A* алеля гена фактору V коагуляції не сприяла зростанню рівня частоти артеріальних васкулярних подій (1 із 2 проти 3 із 17;  $p = 0,337$ ). Не виявлено різниці в частоті артеріальних тромбозів між хворими на спонтанний ПМФ із нуклеотидним варіантом *G20210A* гена фактора II коагуляції та без нього (1 із 2 осіб проти 3 із 76;  $p = 0,100$ ).

У носіїв *G1691A* алеля гена фактору V коагуляції, які хворі на спонтанний і радіаційно-асоційований ПМФ, порівняно з особами з алелем дикого типу, визначено вищий рівень частоти розвитку протягом періоду клінічного спостереження будь-яких тромбозів, венозних та артеріальних васкулярних ускладнень (табл. 5).

В основній групі хворих на ПМФ різниця між коефіцієнтом виникнення будь-яких тромбозів і артеріальних васкулярних подій, розрахованим для носіїв *G1691A* алеля гена фактору V коагуляції та для осіб з алелем дикого типу, дорівнювала 20,00 люди-

In the control and study group of PMF patients the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene was presented in 4 of 78 (5.12 %) and in 2 of 22 (9.09 %) cases respectively and the *G20210A* allele of the prothrombin gene – in 2 of 78 (2.56 %) and in 0 of 22 episodes respectively. The 2 of 4 carriers of the *G1691A* allele of the proaccelerin gene, that were belonged to the control group of PMF patients, had a history of vascular episodes, – namely an atypical venous case – in one patient, a typical vein – in the other. In the study group of patients with PMF 1 of 2 allele carriers *G1691A* factor V gene coagulation had typical arterial vascular event. In 1 of 2 allele carriers of *G20210A* gene coagulation factor II with spontaneous PMF there was also a vascular episode presented as atypical venous thrombosis.

At spontaneous and radiation-associated PMF no increasing of occurrence of thromboses was observed among carriers of *G1691A* allele of coagulation factor V gene (2 of 4 vs 9 of 74,  $p = 0.093$  and 1 of 2 vs 17 of 3,  $p = 0.337$  respectively). No difference of the incidence of thromboses among spontaneous PMF patients with the *G20210A* nucleotide variant of the coagulation factor II gene and persons without it was found (1 of 2 vs 10 of 76,  $p = 0.263$ ). However, the venous thrombosis is more often presented in the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene carriers with spontaneous PMF, than in the group of patients with a wild allele (2 of 4 vs 5 of 74,  $p = 0.038$ ), and their risk was increases to 10.14 times (95 % CI = 1.67–61.33). Instead, the availability of the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene was not conducive to the growing of the rate of arterial vascular events (1 of 2 vs 3 of 17,  $p = 0.337$ ) in the main group of PMF patients. There was no difference in the incidence of arterial thrombosis among spontaneous PMF patients with the *G20210A* nucleotide variant of the coagulation factor II gene and persons without there (1 of 2 vs 3 of 76,  $p = 0.100$ ).

At spontaneous and radiation-associated PMF the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene carriers, compared with those, who had the wild-type allele, were identified above the incidence rate of any thrombotic events, venous and arterial vascular complications during the period of clinical observation (Table 5).

In the main group of PMF patients the difference of the rate incidence of any thrombosis and arterial vascular events between patients with the *G1691A* allele of the proaccelerin gene and those without it was equals to 20.00 person-years (95 % CI =

но-років (95 % ДІ = 1,51–50,00;  $p = 0,035$ ). У контрольній групі ПМФ різниця в частоті виникнення будь-яких тромбозів і судинних подій у венозному руслі, між пацієнтами з *G1691A* алелем гена проакцелерину та хворими без нього становила 33,33 людино-року (95 % ДІ = 9,09–50,00;  $p = 0,004$  та 95 % ДІ = 16,66–50,00;  $p = 0,0001$  відповідно).

Між хворими на спонтанний ПМФ із *G20210A* алелем гена протромбіну та особами з алелем дикого типу виявлено достовірну різницю коефіцієнтів виникнення венозних тромботичних подій, яка дорівнювала 25,00 людино-років (95 % ДІ = 11,11–50,00;  $p = 0,0008$ ). Також при спонтанному ПМФ, на межі статистичної значущості, виявлено різницю між коефіцієнтами виникнення будь-яких тромбозів, які обчислено для носіїв нуклеотидного варіанта *G20210A* гена II фактору коагуляції та для осіб з алелем дикого типу (25,00 людино-років; 95 % ДІ = 3,03–50,00;  $p = 0,083$ ).

Підсумовуючи результати дослідження, можна констатувати, що наявність нуклеотидного варіанта *G1691A* гена V фактору коагуляції та *G20210A* алеля гена протромбіну значуще не впливає на частоту тромбозів у хворих як на радіаційно-асоційовану, так і на спонтанну СП та ЕТ. Також не підтверджено, що між носіями маркерів спадкової тромбофілії, хворими на СП / ЕТ, із радіаційним анамнезом та без нього існує різниця в частоті тромбозів. Натомість виявлено, що при спонтанному ПМФ носійство будь-якого з двох молекулярно-генетичних маркерів спадкової тромбофілії збільшує частоту та ризик виникнення будь-яких тромботичних подій. Також доведено, що наявність нуклеотидного варіанта *G1691A* гена проакцелерину у хворих на ПМФ, які не зазнали впливу радіаційного іонізуючого опромінення, зумовлює зростання ймовірності розвитку тромбозів у венозному судинному руслі.

Різниця у внеску маркерів спадкової тромбофілії в частоту тромбозів у хворих на різні Ph-негативні МПН, найімовірніше пояснюється тим, що при СП та ЕТ ймовірність виникнення васкулярних подій набагато вища, ніж на при ПМФ [8, 9]. Відповідно до більшості досліджень із визначення внеску в збільшення ризику виникнення васкулярних подій носійства маркерів спадкової тромбофілії, останні, в першу чергу, є предикторами тромбозів у осіб без інших факторів їх розвитку [19]. Так, V. De Stefano і співавт. довели наявність впливу носійства спадкової тромбофілії на ризик розвитку судинних подій при ЕТ при виключенні зі статистичного аналізу хворих

1.51–50.00,  $p = 0.035$  respectively). In the control group PMF the difference in the rate of the incidence of any thrombosis and venous vascular events, among patients with *G1691A* allele of the proaccelerin gene and persons without it was 33.33 person-years (95 % CI = 9.09–50.00;  $p = 0.004$  and 95 % CI = 16.66– 50.00,  $p = 0.0001$  respectively).

The significant difference of the rate incidence of venous thrombotic events, what was amounted to 25.00 person-years (95 % CI = 11.11–50.00,  $p = 0.0008$ ), was found at spontaneous PMF patients with the *G20210A* allele of the prothrombin gene and persons with the wild-type allele. Also, at spontaneous PMF, on the border of statistical significance, was found the difference between the rate of any thrombosis, what was calculated for carriers of the *G20210A* nucleotide variant of the coagulation factors II gene and for those, who had the wild-type allele (25.00 person-years; 95 % CI = 3.03–50.00,  $p = 0.083$ ).

The summarizing the results of the study, we can state that the presence of the *G1691A* nucleotide variant of the coagulation factor V gene and the *G20210A* allele of the prothrombin gene significantly does not influence on the frequency of thromboses in radiation-associated and spontaneous PV and ET patients. Also, it was not confirmed that between the carriers of the markers of the hereditary thrombophilia with SP / ET and with a history of radiation anamnesis and without it, exists a difference on the incidence of thromboses. Instead, it was found, that at spontaneous PMF the carrying of any of the two molecular-genetic markers of the hereditary thrombophilia increases the frequency and risk of any thrombotic events Also, it was proved that the presence of the *G1691A* nucleotide variant of the proaccelerin gene in PMF patients, which are not exposed to ionizing radiation, increase the likelihood of venous thromboses.

The difference in contribution of genetic markers of thrombophilia in the incidence of thrombosis in patients with different Ph-negative MPN, most likely is due to the fact, that vascular events at PV and ET are much probable than at PMF [8, 9]. According to most studies on assay of contribution in the increasing risk of vascular events, the carrying of markers of hereditary thrombophilia, the last, first and foremost, is a predictor of thrombosis in patients without other factors of their development [19]. Thus, V. De Stefano et al. proved the influence on a risk of developing of vascular events at ET of hereditary thrombophilia carrying in a case of the exclusion from statistical analy-



з іншими предикторами тромбозів. Зокрема, у пацієнтів з ЕТ виявлено, що після їх стратифікації відповідно до віку та *JAK2V617F* статусу, збільшення ризику виникнення тромбозів, обумовлене носійством *G1691A* алеля гена фактору V або *G20210A* алеля гена фактору II коагуляції, зберігається тільки в осіб, молодших за 60 років [20]. Можна припустити, що означена тенденція екстраполюється і на різні за рівнем ризику виникнення тромбозів типи Ph-негативних МПН.

Отримані нами дані щодо реалізації тромбогенного потенціалу носійства нуклеотидного варіанта *G1691A* гена проакцелерину у хворих на ПМФ, які не зазнали впливу радіаційного іонізуючого опромінення в дозовому діапазоні 0,001–0,99 Гр, саме у венозному судинному руслі узгоджуються з результатами іншого дослідження. Результати аналізу, що демонструють наявність впливу носійства *G1691A* алеля гена проакцелерину на виникнення венозних тромбозів і рекурентних васкулярних подій при СП та ЕТ, опубліковані М. Ruggeri зі співавторами (2002). Частота зустрічальності Лейденської мутації у хворих з венозними тромботичними ускладненнями, що виникли до верифікації діагнозу, значуще вища, ніж у пацієнтів без них (16 % проти 3 %) [10]. Проте в дослідженні А. Trifa та співавторів підтверджено, що носійство *G1691A* алеля гена фактору V коагуляції збільшує ймовірність розвитку як артеріальних, так і венозних тромбозів при СП та ЕТ [13]. Щоправда, навіть комбінований мутаційний статус був предиктором розвитку артеріальних тромбозів за відсутності факторів ризику розвитку атеросклерозу [19]. Це підтримує гіпотезу щодо превалювання атерогенних факторів ризику над спадковими предикторами формування тромбофілічного фенотипу в патогенезі артеріальних васкулярних подій.

Також, за допомогою розрахунку коефіцієнту розвитку тромбозів у пацієнтів з наявністю та відсутністю генетичних маркерів спадкової тромбофілії, визначено їх внесок у зміну частоти виникнення васкулярних епізодів з урахуванням фактору часу.

Так, нами підтверджено, що при спонтанних і радіаційно-асоційованих Ph-негативних МПН більше значення коефіцієнта виникнення венозних, артеріальних та усіх тромбозів спостерігається в носіїв *G1691A* алеля гена фактору V коагуляції, ніж в осіб з алелем дикого типу. У контрольній групі ЕТ та ПМФ виявлено більше значення коефіцієнта виникнення венозних тромбозів також у носіїв нуклеотидного варіанта *G20210A* гена II фактору коагуляції,

sis patients with other predictors of thrombosis. In particular, it was found, that after stratification of ET patients according to age and *JAK2V617F* status, the increasing of the risk of thromboses, which is caused by the carrying of *G1691A* allele of coagulation factor V gene or the *G20210A* allele of coagulation factor II gene preserved only in individuals younger than 60 years [20]. We can assume that the trend is extrapolated to the different types Ph-negative MPN, which were formed according to a risk of thromboses.

Our data about the implementation of thrombogenic potential in the venous line of the carrying of the *G1691A* nucleotide variant of the proaccelerin u gene in PMF patients, who are not exposed to radiation ionizing radiation in the dose range 0,001–0,99 Gy, are consistent with data of other researches. The analysis, which is demonstrating the impact of the carrying of the *G1691A* allele of the proaccelerin gene in the occurrence of venous thrombosis and recurrent vascular events in PV and ET is published by M. Ruggeri et al (2002). The frequency of Leiden mutation in patients with venous thrombotic complications, which were arising before the diagnosis verifying, is significantly higher, than in those without mutation (16 % vs. 3 %) [8] However, the study of A. Trifa et al. was confirmed, that the carrying of the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene increases the likelihood of arterial and venous thrombosis at PV and ET [13]. However, even the combined mutational status was predictive of arterial thrombosis in the absence of the atherosclerosis risk factors [19]. This is supports the hypothesis about the predictive predominance in the pathogenesis of arterial vascular events the atherogenic risk factors over the heritable predictor of the thrombophilic phenotype formation.

Also, by calculating the incidence rate of thrombosis in patients with and without genetic markers of hereditary thrombophilia, their contribution have been defined to the change of the incidence of vascular episodes taking into account the time factor.

Thus, we confirmed that at spontaneous and radiation-associated Ph-negative MPN, the higher rate of the incidence of venous, arterial and all thrombosis was observed in the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene carriers, than in those with wild-type allele. The more rate of venous thrombosis in carriers of the *G20210A* nucleotide variant of the coagulation factor II gene, in comparison with patients with wild-type

порівняно з пацієнтами з алелем дикого типу. Натомість, при спонтанній СП не визначено більшого значення коефіцієнта виникнення будь-яких тромбозів і коефіцієнта розвитку артеріальних васкулярних подій у носіїв *G20210A* алеля гена II фактору коагуляції, порівняно з пацієнтами з диким типом гена протромбіну.

Дані, отримані в нашому дослідженні, дещо не узгоджуються з результатами дослідження, проведеного Н. Gisslinger та співавторами [12]. Згідно з ними, Лейденська мутація не асоціювалась з розвитком венозних тромботичних подій, на противагу нуклеотидному варіанту *G20210A* гена протромбіну. Частота венозних тромботичних епізодів у хворих на ЕТ та СП із *G20210A* алелем гена протромбіну становила 6,2 випадку на 100 людино-років, натомість у пацієнтів із алелем дикого типу – 0,8 випадку на 100 людино-років. А носійство *G20210A* алеля гена протромбіну збільшувало частоту виникнення венозних тромбозів протягом періоду клінічного спостереження в 17,5 раза. Тенденція щодо превалювання васкулярних подій у венозному судинному руслі в носіїв мутантного алеля гена протромбіну зберігалася як у когорті з маніфестацією тромбозу до, так і після верифікації Ph-негативної МПН [12].

Зазначимо, що існують дослідження, в яких не виявлено жодного впливу носійства маркерів спадкової тромбофілії, зокрема *G1691A* алеля гена фактора V коагуляції та *G20210A* алеля гена протромбіну, на збільшення ризику розвитку васкулярних подій при Ph-негативних МПН [11].

Наявність додаткового внеску радіаційного анамнезу у збільшення ризику виникнення тромботичних подій, зумовлених наявністю спадкової тромбофілії у хворих на Ph-негативні МПН, виявлено у дослідженні [21], яке було проведено нами раніше. Визначено, що при ПМФ більша частота тромбозів спостерігається в носіїв мутантного алеля гена проакцелерину з радіаційним анамнезом, ніж у осіб з диким алелем. Проте зазначена тенденція не спостерігалася у хворих на ПМФ, які не постраждали від впливу ІР. У поточному дослідженні нами не виявлено жодного внеску ІР у зміну частоти або вірогідність виникнення тромботичних васкулярних подій, детермінованих носійством маркерів спадкової тромбофілії при СП, ЕТ та ПМФ, що найімовірніше пояснюється збільшенням вибірки хворих, порівняно з попереднім нашим дослідженням.

Інші дослідження, метою яких було визначення взаємодії між носійством маркерів спадкової

allele, was detected in the control group of ET and PMF. However, at spontaneous PV the more incidence rate of any thrombosis and arterial vascular events was observed in carriers of the *G20210A* allele of the coagulation factor II gene, compared with patients with the wild-type of the prothrombin gene.

The data obtained in our study somewhat do not agree with a study conducted by H. Gisslinger et al. [12]. According to them, Leiden mutation was not associated with the development of venous thrombotic events as opposed the *G20210A* nucleotide variant of the prothrombin gene. The incidence of venous thrombotic episodes in ET and PV patients with the *G20210A* allele of the prothrombin gene was 6.2 cases per 100 person-years, while in patients with wild-type allele – 0.8 cases per 100 person-years. The carrying of the *G20210A* allele of the prothrombin gene increased the incidence of venous thrombosis to 17.5 times during a period of the clinical observation. The trend towards the prevalence of the venous vascular events in the mutant allele carriers of the prothrombin gene was kept in a cohort of patients with the thrombosis, which were manifested before and after the verification of Ph-negative MPN [12].

Note, that there are studies in which no any influence of carrying of genetic markers of the thrombophilia was identified, in particular the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene and the *G20210A* allele of the prothrombin gene, into the risk increasing of vascular events at Ph-negative MPN [11].

The presence of additional contribution of the radiation anamnesis into the increasing of the risk of thrombotic events, which were caused by the presence of the hereditary thrombophilia at Ph-negative MPN patients, was found in our study [21], which was conducted earlier. It was determined, that the greater frequency of thrombosis at PMF is observed in carriers of the mutant allele of the proaccelerin gene with the radiation anamnesis, than those with wild allele. However, this trend was not observed in PMF patients, who are not affected by the impact of IR. In the current study we have not identified any contribution of IR to the change of the frequency or the likelihood of thrombotic vascular events, which were determined the carrying of the hereditary thrombophilia at PV, ET and PMF. It is likely due to the increasing of samples of patients, compared to the previous our study.

Other studies, the purpose of which was the determination of the interaction between the

тромбофілії та ІР щодо модифікації ризику виникнення тромбозів у хворих на Ph-негативні МПН відсутні.

Отже, визначення особливостей внеску ІР у підвищення ймовірності виникнення тромботичних подій у осіб з іншими спадковими та набутими тригерами їх розвитку є перспективним і потребує подальшого дослідження.

## ВИСНОВКИ

1. При спонтанному ПМФ носійство будь-якого з двох молекулярно-генетичних маркерів спадкової тромбофілії збільшувало частоту (3 із 6 проти 8 із 72;  $p = 0,033$ ) і ризик виникнення ( $RR = 6,09$ ; 95 % ДІ = 1,40–26,43) будь-яких тромботичних подій.
2. Наявність нуклеотидного варіанта *G1691A* гена проакцелерину у хворих на ПМФ, які не зазнали впливу іонізуючого випромінювання в дозовому діапазоні 0,001–0,99 Гр зумовлює зростання ймовірності розвитку тромбозів у венозному судинному руслі в 10,14 раза (95 % ДІ = 1,67–61,33).
3. У носіїв *G1691A* алеля гена проакцелерину, які належали до контрольної та основної груп хворих на СП, спостерігається на 25,00 людино-років і 33,33 людино-року відповідно достовірно більший коефіцієнт виникнення будь-яких тромбозів (95 % ДІ = 0,62–50,00;  $p = 0,044$  та 95 % ДІ = 0,22–100,00;  $p = 0,048$  відповідно) та судинних подій у венозному руслі (95 % ДІ = 10,00–50,00;  $p = 0,039$  та 95 % ДІ = 12,50–50,00;  $p = 0,003$  відповідно), ніж в осіб з алелем дикого типу.
4. При спонтанній ЕТ різниця в загальній частоті виникнення будь-яких тромбозів і судинних подій у венозному руслі між особами з *G1691A* алелем гена проакцелерину та пацієнтами без нього становить 33,33 людино-року (95 % ДІ = 0,08–50,0;  $p = 0,049$  та 95 % ДІ = 12,5–50,0;  $p = 0,003$  відповідно). Також, у хворих на спонтанну ЕТ, на межі статистичної значущості ( $p = 0,050$ ), виявлено різницю між коефіцієнтами виникнення венозних тромбозів у носіїв нуклеотидного варіанта *G20210A* гена II фактора коагуляції та осіб з алелем дикого типу, що складала 20,00 людино-років (95 % ДІ = 0,002–33,33;  $p = 0,050$ ).
5. В основній групі хворих на ПМФ встановлено достовірну різницю (20,00 людино-років; 95 % ДІ = 1,51–50,00;  $p = 0,035$ ) між коефіцієнтом виникнення будь-яких тромбозів і артеріальних васкулярних подій, розрахованим для носіїв *G1691A* алеля гена фактору V коагуляції та для осіб з алелем дикого типу. У контрольній групі ПМФ різниця в частоті ви-

inherited thrombophilia markers and IR to the modification of the risk of thrombosis in Ph-negative MPN patients, do not exist.

Thus, the determination of features of the IR contribution to the increasing of the likelihood of thrombotic events in patients with other hereditary and acquired triggers their development is promising and needs further investigation.

## CONCLUSIONS

1. At spontaneous PMF the carrying of any of the two molecular genetic markers of the hereditary thrombophilia increased the frequency (3 of 8 vs 6 of 72,  $p = 0.033$ ) and risk ( $RR = 6.09$ ; 95 % CI = 1.40–26.43) of any thrombotic events.
2. The presence of the *G1691A* nucleotide variant of the proaccelerin gene in PMF patients, who are not exposed to the ionizing radiation in the dose range 0,001–0,99 Gy, causes to increase the likelihood of venous thrombosis to 10.14 times (95 % CI = 1.67–61.33).
3. In the carriers of the *G1691A* allele of the proaccelerin gene, that belonged to the control and main group of PV patients, observed at 25.00 person-years and 33.33 person-years the significantly greater rate of any thrombosis (95 % CI = 0.62–50.00,  $p = 0.044$  and 95 % CI = 0.22–100.00,  $p = 0.048$  respectively) and venous vascular events (95 % CI = 10.00–50.00,  $p = 0.039$  and 95 % CI = 12.50–50.00,  $p = 0.003$  respectively), than in those with wild-type allele.
4. At spontaneous ET the difference of the overall incidence of any thrombosis and venous vascular events between persons with the *G1691A* allele of the proaccelerin gene and those without it, is 33.33 person-years (95 % CI = 0.08–50.0,  $p = 0.049$  and 95 % CI = 12.5–50.0,  $p = 0.003$  respectively). Also, at spontaneous ET patients on the border of statistical significance ( $p = 0.050$ ), was observed the difference between the incidence of venous thrombosis in carriers of the *G20210A* nucleotide variant of the coagulation factor II gene and those with wild-type allele, which was accounted at 20.00 person-years (95 % CI = 0.002–33.33,  $p = 0.050$ ).
5. In the main group of PMF patients was found the significant difference (20.00 person-years; 95 % CI = 1.51–50.00,  $p = 0.035$ ) between the incidence ratios of any thrombosis and arterial vascular events, what were calculated for the *G1691A* allele of the coagulation factor V gene carriers and for those with wild-type allele. The difference in the incidence of

никнення будь-яких тромбозів і судинних подій у венозному руслі між хворими з *G1691A* алелем гена проакцелерину та пацієнтами без нього становила 33,33 людино-року (95 % ДІ = 9,09–50,00,  $p = 0,004$  та 95 % ДІ = 16,66–50,00,  $p = 0,0001$  відповідно). Між хворими на спонтанний ПМФ із *G20210A* алелем гена протромбіну та особами з алелем дикого типу виявлено достовірну різницю коефіцієнтів виникнення венозних тромботичних подій, яка дорівнювала 25,00 людино-років (95 % ДІ = 11,11–50,00,  $p = 0,0008$ ).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Radiation exposure and circulatory disease risk: Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivor data, 1950-2003 / Y. Shimizu, K. Kodama, N. Nishi [et al.] // *BMJ*. - 2010. - Vol. 340. - P. b5349. - doi: 10.1136/bmj.b5349.
2. Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950-1997 / D. L. Preston, Y. Shimizu, D. A. Pierce [et al.] // *Radiat. Res.* - 2003. - Vol. 160, no. 4. - P. 381-407.
3. Lee C.K. The need for long-term surveillance for patients treated with curative radiotherapy for Hodgkin's disease: University of Minnesota experience / C.K. Lee, D. Aeppli, M.E. Nierengarten // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* - 2000. - Vol.48, no. 1. - P. 169-179.
4. Castoldi E. APC resistance: biological basis and acquired influences / E. Castoldi, J. Rosing // *J. Thromb. Haemost.* - 2010. - Vol.8, no. 3. - P.445-453.
5. 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, no. 23. - P. 2472-2485.
6. Combined carrier status of prothrombin 20210A and factor XIII-A Leu34 alleles as a strong risk factor for myocardial infarction: evidence of a gene-gene interaction / C. Butt, H. Zheng, E. Randell [et al.] // *Blood*. - 2003. - Vol.101, no. 8. - P. 3037-3041.
7. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis / S. Poort, F. Rosendaal, P. Reitsma, R. M. Bertina // *Blood*. - 1996. - Vol. 88, no. 10. - P. 3698-3703.
8. Cerebral venous thrombosis and myeloproliferative neoplasms: results from two large databases / F. Dentali, W. Ageno, E. Rumi [et al.] // *Thromb. Res.* - 2014. - Vol.134, no. 1. - P.41-43.
9. Tefferi A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management / A.Tefferi // *Am. J. Hematol.* - 2013. - Vol. 88, no. 6. - P. 507-516.
10. 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, no. 1. - P.1-6.
11. JAK2 V617F, hemostatic polymorphisms, and clinical features as risk factors for arterial thrombotic events in essential thrombocythemia / M. Moreno, M. Lozano, V. Roldan [et al.] // *Ann. Hematol.* - 2008. - Vol.87, no. 9. - P. 763-776.

any thrombosis and venous vascular events between patients with the *G1691A* allele of the proaccelerin gene and persons without it, was totaled 33.33 person-years (95 % CI = 9.09–50.00,  $p = 0.004$  and 95 % CI = 16.66–50.00,  $p = 0.0001$  respectively) in the control group of PMF. Among patients with spontaneous PMF the *G20210A* allele the prothrombin gene and persons with wild-type allele was found the significant difference rate of venous thrombotic events, which amounted at 25.00 person-years (95 % CI = 11.11–50.00,  $p = 0.0008$ ).

## REFERENCES

1. Shimizu Y, Kodama K, Nishi N, Kasagi F, Suyama A, Soda M, et al. Radiation exposure and circulatory disease risk: Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivor data, 1950–2003. *BMJ*. 2010;340:b5349. doi: 10.1136/bmj.b5349.
2. Preston DL, Shimizu Y, Pierce DA, Suyama A, Mabuchi K. Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950–1997. *Radiat. Res.* 2003;160(4):381-407.
3. Lee CK, Aeppli D, Nierengarten ME. The need for long-term surveillance for patients treated with curative radiotherapy for Hodgkin's disease: University of Minnesota experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000;48(1):169-79.
4. Castoldi E, Rosing J. APC resistance: biological basis and acquired influences. *J Thromb Haemost.* 2010;8(3):445-53.
5. Segal JB, Brotman DJ, Necochea AJ, Emadi A, Samal L, Wilson LM, et al. Predictive value of factor V Leiden and prothrombin G20210A in adults with venous thromboembolism and in family members of those with a mutation. *JAMA.* 2009;301(23):2472-85.
6. Butt C, Zheng H, Randell E, Robb D, Parfrey P, Xie YG. Combined carrier status of prothrombin 20210A and factor XIII-A Leu34 alleles as a strong risk factor for myocardial infarction: evidence of a gene-gene interaction. *Blood.* 2003;101(8):3037-41.
7. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 1996;88(10):3698-703.
8. Dentali F, Ageno W, Rumi E, Casetti I, Poli D, Scoditti U, et al. Cerebral venous thrombosis and myeloproliferative neoplasms: results from two large databases. *Thromb Res.* 2014;134(1):41-3.
9. Tefferi A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2013;88(6):507-16.
10. Ruggeri M, Gisslinger H, Tosetto A, Rintelen C, Mannhalter C, Pabinger I, et al. Factor V Leiden mutation carriership and venous thromboembolism in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Hematol.* 2002;71(1):1-6.
11. Moreno MJ, Lozano ML, Roldan V, Bellosillo B, Garcia-Barbera N, Rivera J, et al. JAK2 V617F, hemostatic polymor-

12. 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, no. 3. - P.408-410.
13. The relationship between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR mutations and the first major thrombotic episode in polycythemia vera and essential thrombocythemia / A. Trifa, A. Cucuianu, R. Popp [et al.] // *Ann. Hematol.* - 2014. - Vol. 93, no. 2. - P. 203-209.
14. Absence of factor V Leiden (G1691A) mutation, FII G20210A allele in coronary artery disease in North India / N. Gupta, F. Khan, M. Tripathi [et al.] // *IJMS*. - 2003. - Vol. 57, no. 12. - P. 535-542.
15. Gandrille S. A rapid screening method for the factor V Arg506>Gln mutation / S. Gandrille, M. Alhenc-Gelas, M. Aiach // *Blood Coagul. Fibrinolysis*. - 1995. - Vol.6, no.3. - P. 245-248.
16. Боровиков В.П. СТАТИСТИКА: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов / В. П. Боровиков. - СПб.: Питер, 2003. - 688 с.
17. Орлов А.И. Прикладная статистика: учебник / А. И. Орлов. - М.: Экзамен, 2004. - 656 с.
18. Sahai H. Statistics in epidemiology: methods techniques and applications / H. Sahai, A. Kurshid. - CRC Press, 1996. - 352 p.
19. Prevalence of factor V Leiden and prothrombin variant G20210A in patients age <50 years with no significant stenoses at angiography three to four weeks after myocardial infarction / F. J. Van de Water, J. K.French, M.Lund [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* - 2000. - Vol. 36, no. 3. - P. 717-722.
20. 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, no. 5. - P. 733-737.
21. Molecular characterization of Ph-negative myeloproliferative neoplasms in Ukraine / O.Y. Mishcheniuk, O.M. Kostukevich, I.V. Dmytrenko [et al.] // *Exp. Oncol.* - 2013. - Vol.35, no. 3. - P. 202-206.
- phisms, and clinical features as risk factors for arterial thrombotic events in essential thrombocythemia. *Ann Hematol.* 2008;87(9):763-76.
12. Gisslinger H, Mullner M, Pabinger I, Heis-Vahidi-Fard N, Gisslinger B, Brichta A, et al. Mutation of the prothrombin gene and thrombotic events in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia: a cohort study. *Haematologica*. 2005;90(3):408-10.
13. Trifa AP, Cucuianu A, Popp RA, Coada CA, Costache RM, Militaru MS, et al. The relationship between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR mutations and the first major thrombotic episode in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Ann Hematol.* 2014;93(2):203-9.
14. Gupta N, Khan F, Tripathi M, Singh VP, Tewari S, Ramesh V, et al. Absence of factor V Leiden (G1691A) mutation, FII G20210A allele in coronary artery disease in North India. *IJMS*. 2003;57(12):535-42.
15. Gandrille S, Alhenc-Gelas M, Aiach M. A rapid screening method for the factor V Arg506>Gln mutation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1995 May;6(3):245-8.
16. Borovikov VP. [STATISTIKA: the art of data analysis on the computer. For professionals]. Sanct Peterburg; 2003. 688 p. Russian.
17. Orlov AI. [Applied Statistics: textbook]. Moscow: Ekzamen; 2004. 656 p.
18. Sahai H, Kurshid A. Statistics in epidemiology: methods techniques and applications. CRC Press, 1996. 352 p.
19. Van de Water NS, French JK, Lund M, Hyde TA, White HD, Browett PJ. Prevalence of factor V Leiden and prothrombin variant G20210A in patients age <50 years with no significant stenoses at angiography three to four weeks after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36(3):717-22.
20. De Stefano V, Za T, Rossi E, Fiorini A, Ciminello A, Luzzi C, et al. Influence of the JAK2 V617F mutation and inherited thrombophilia on the thrombotic risk among patients with essential thrombocythemia. // *Haematologica*. 2009;94(5):733-7.
21. Mishcheniuk OY, Kostukevich OM, Dmytrenko IV, Sholyko WV, Prokopenko IM, Martina ZV, et al. Molecular characterization of Phnegative myeloproliferative neoplasms in Ukraine. *Exp Oncol*. 2013;35(3):202-6.

Стаття надійшла до редакції 27.04.2016

Received: 27.04.2016