

Т.Н. Александрова, И.И. Мулина, Х.А. Куртанов,
И.Е. Соловьева, Л.Д. Терехова, Н.И. Павлова,
В.Н. Ядрихинская, Н.А. Соловьева, А.Т. Дьяконова

ВЗАИМОСВЯЗЬ НОСИТЕЛЬСТВА МУТАЦИИ JAK2V617F И ЧАСТОТЫ ТРОМБОТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С КЛАССИЧЕСКИМИ РН-НЕГАТИВНЫМИ ХРОНИЧЕСКИМИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

DOI 10.25789/YMJ.2020.69.04

УДК 612.13-15;22-23

Исследование проведено с целью оценки влияния клинико-лабораторных показателей и мутации JAK2V617F на частоту развития тромботических осложнений среди пациентов с классическими Рн-негативными хроническими миелопролиферативными заболеваниями. Мутация JAK2V617F выявлена у больных истинной полицитемией, эссенциальной тромбоцитемией и первичным миелофиброзом. Тромботические осложнения достоверно чаще наблюдались у носителей мутации JAK2V617F и больных, имеющих сердечно-сосудистые факторы риска.

Ключевые слова: хронические миелопролиферативные заболевания, JAK2V617F, тромбозы.

The study was conducted with aim to assess the effect of clinical and laboratory parameters and JAK2V617F mutation on the incidence of thrombotic complications in patients with classical Ph-negative chronic myeloproliferative diseases. JAK2V617F mutation was detected in patients with polycythemia vera, essential thrombocythemia and patients with primary myelofibrosis. Thrombotic complications were significantly more often observed in carriers of the JAK2V617F mutation and in patients with cardiovascular risk factors.

Keywords: chronic myeloproliferative diseases, JAK2V617F, thrombosis.

Введение. Основной клинической проблемой больных хроническими миелопролиферативными заболеваниями (ХМПЗ) являются сосудистые осложнения, к которым можно отнести микроциркуляторные нарушения, тромбозы венозных и артериальных сосудов, а также геморрагические осложнения [2]. В последние годы в связи с улучшением понимания молекулярных механизмов заболеваний и разработкой нового класса препаратов – ингибиторов янус-киназ удалось добиться уменьшения клинических симптомов среди больных истинной полицитемией (ИП) и первичным миелофиброзом (ПМФ), резистентных к

терапии гидроксимочевинной или с непереносимостью препарата [8]. Однако частота тромботических осложнений остается высокой, занимая одно из лидирующих позиций среди причин летальности и инвалидизации. Согласно литературным данным, совокупная частота тромбозов при ИП составляет 3,8 на 100 пациенто-лет, при эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ) — от 2 до 4, при ПМФ — 2,23 на 100 пациенто-лет [1]. Ведущее место в структуре тромботических осложнений занимают артериальные тромбозы – инфаркт миокарда, ишемический инсульт и транзиторная ишемическая атака.

Тромбообразование представляет собой сложный многокомпонентный процесс. Генетические аномалии, качественные и количественные нарушения форменных элементов крови, дисфункция эндотелия вносят определенный вклад в формирование тромба [10]. Наиболее значимыми факторами риска тромботических осложнений среди больных ХМПЗ признаны возраст старше 60 лет, перенесенные тромбозы, сердечно-сосудистые факторы риска, а также наличие мутации V617F гена JAK2. В настоящее время в связи с широким распространением персонализированного подхода к терапии многих заболеваний, изучение

молекулярных маркеров тромбогенного риска приобретает особую актуальность. Доказано, что для носителей мутации JAK2V617F характерно увеличение пула активированных лейкоцитов и тромбоцитов, обладающих более тромбогенным потенциалом, и повышение их агрегационной способности. Кроме того, немаловажна роль мутации в развитии дисфункции эндотелия и коагуляционного звена гемостаза [6,10].

Цель исследования – оценить влияние клинико-лабораторных показателей и мутации JAK2V617F на частоту развития тромботических осложнений.

Материалы и методы исследования. В исследование включено 70 пациентов с подтвержденными диагнозами эссенциальная тромбоцитемия (n=31, 44,3%), истинная полицитемия (n=22, 31,4%) и первичный миелофиброз (n=17, 24,3%). Медиана наблюдения больных составила 48 мес. (от 2 до 252 мес.). Всем больным проведено молекулярно-генетическое исследование на выявление мутации JAK2V617F (rs77375493) методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием стандартных пар праймеров производства «SybEnzyme» (г. Новосибирск) [4]. Ре-

ЯНЦ КМП: **АЛЕКСАНДРОВА Туйара Николаевна** – м.н.с., врач-гематолог РБ№1-НЦМ, alexandrova_tuyara@mail.ru, **КУРТАНОВ Харитон Алексеевич** – к.м.н., гл. н.с.-руковод. отдела, hariton_kurtanov@mail.ru, **ПАВЛОВА Надежда Ивановна** – к.б.н., в.н.с., **СОЛОВЬЕВА Наталья Алексеевна** – к.м.н., с.н.с., **ДЬЯКОНОВА Александра Тимофеевна** – м.н.с. РБ№1-Национальный центр медицины, г. Якутск: **МУЛИНА Инна Ивановна** – гл. внештат. гематолог МЗ РС(Я), зав. отделением, **СОЛОВЬЕВА Ирина Еремеевна** – врач-гематолог, **ТЕРЕХОВА Лена Дмитриевна** – врач-гематолог; **ЯДРИХИНСКАЯ Вера Николаевна** – к.м.н., доцент МИ СВФУ им. М.К. Аммосова.

Таблица 1

Температурный режим для ПЦР

№	Стадия	t, °C	Время	Количество циклов
1	Первая денатурация	95	10 мин	1
2	Денатурация	95	30 с	36
3	Отжиг	56	30 с	
4	Элонгация	72	1 мин	
5	Заключительная элонгация	72	10 мин	1

акционная смесь общим объемом 25 мкл на 1 образец включала: праймеры прямой аллель-специфичный (AGCA TTTGGTTTTAAATTATGGAGTATATT), прямой (ATCTATAGTCATGCTGAAAGT AGGAGAAAG) по 0,5 мкл и обратный (CTGACACCTAGCTGTGATCCTG) по 1 мкл; Dream Taq PCR мастер микс 12,5 мкл; деионизированную воду 9,5 мкл и ДНК 1 мкл. Оптимизированные температурные режимы ПЦР представлены в табл. 1.

Детекция продуктов ПЦР проводилась в 3%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, с использованием стандартного трис-ацетатного буфера при 120 В в течение 45 мин. Длина амплификата для аллеля G составила 364 пары нуклеотидов (п.н.), Т – 364 и 203 п.н (рисунок).

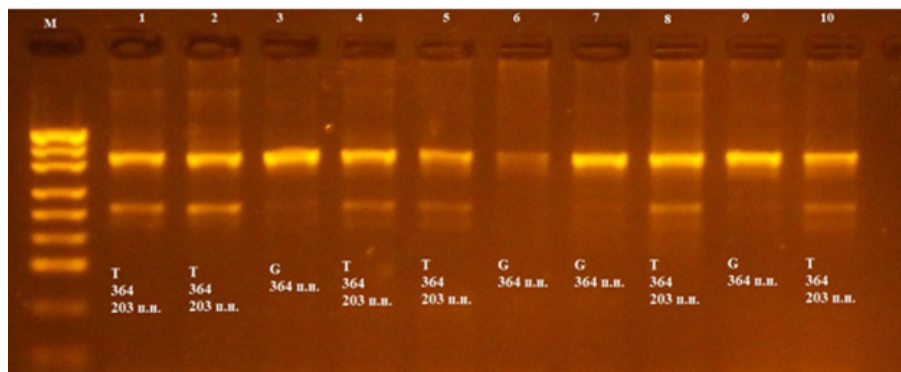
При анализе распространенности тромботических осложнений и факторов риска использовались клинические и лабораторные данные, полученные в ходе амбулаторного консультирования пациентов. Статистическая значимость различий между исследуемыми группами оценивалась с помощью критерия χ -квадрат с поправкой Йейтса. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

χ -квадрат с поправкой Йейтса рассчитывали по следующей формуле:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(|O_{ij} - E_{ij}| - 0,5)^2}{E_{ij}}.$$

Для оценки влияния факторов риска на частоту развития тромботических осложнений рассчитывали отношения шансов (ОШ). Результаты представлены в виде ОШ и 95% доверительного интервала (ДИ).

Результаты и обсуждение. За период наблюдения тромботические осложнения зарегистрированы у 28,6% (20/70) больных, из них у 7,14% (5/70) – два и более эпизода. При сравнительном анализе распространенность тромбозов среди больных ИП составила 36,4%, ЭТ – 16 и ПМФ – 35,2%. 55% (11/20) тромбозов наблюдались до момента диагностики заболевания. Медиана времени наблюдения от развития тромботического события до диагностики заболевания составила 9 мес. (от 1 до 78 мес.). Из литературных данных известно, что больные ИП характеризуются наибольшим тромбогенным потенциалом, связанным с резким увеличением числа форменных элементов крови, гематокрита и повышением вязкости крови. Распространенность тромбозов в данной группе составляет 12-39%



Электрофореграмма результатов ПЦР: PUC19/MspI – ДНК маркер, лунки 1, 2, 4, 5, 8, 10 – аллель Т (364 и 203 пары нуклеотидов), лунки 3, 6, 7, 9 – аллель G (364 пары нуклеотидов)

на момент диагностики и 10-25% по мере прогрессирования заболевания. Для больных ЭТ более характерны микроциркуляторные нарушения, чем тромбозы крупных сосудов, а среди больных ПМФ тромботические осложнения встречаются с частотой 4-7% случаев в дебюте и 2-4% по мере прогрессирования [3, 9]. В большинстве случаев тромбозы локализовались в артериальном русле (80%) – острый инфаркт миокарда (ОИМ, 58,8), острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК, 35,3) и тромбоз глубокой бедренной артерии (5,9%). Венозные тромбозы встречались реже (20%) и представлены тромбозами глубоких вен (ТГВ) нижних конечностей (10%) и вен портальной системы (10%).

По результатам генотипирования, аллель Т гена *JAK2* (*JAK2V617F*) выявлен у 90,9% больных ИП, у 61,3% – ЭТ и 64,7% больных ПМФ. При сравнении *JAK2V617F*-положительных и *JAK2V617F*-отрицательных больных выявлено, что тромбозы достоверно чаще наблюдаются у носителей мутации *JAK2* – 45 и 10% соответственно ($p=0,008$).

На следующем этапе было проанализировано наличие основных (возраст старше 60 лет, наличие мутации *JAK2V617F*, сердечно-сосудистых факторов риска) и дополнительных (гипертромбоцитоз, лейкоцитоз) факторов риска развития тромботических

осложнений (табл.2). К сердечно-сосудистым факторам риска относили артериальную гипертензию, сахарный диабет, курение.

По результатам проведенного анализа тромботические осложнения достоверно чаще наблюдались у носителей мутации *JAK2V617F* ($p=0,036$) и больных, имеющих сердечно-сосудистые факторы риска ($p=0,014$). ОШ развития тромботических осложнений у носителей мутации *JAK2* составило 11,645 (95% ДИ 1,440-94,191), у лиц, имеющих сердечно-сосудистые факторы риска, – 3,605 (95% ДИ 1,213-10,715). В подгруппе старше 60 лет достоверных отличий по частоте тромбозов не получено ($p=0,242$), что, вероятно, связано с небольшой долей исследуемых старше 60 лет – лишь 30,4%.

По мнению большинства авторов, наиболее значимыми независимыми факторами риска тромбозов среди больных ИП, ЭТ и ПМФ являются возраст и перенесенные тромбозы [5]. Однако по мере накопления знаний о молекулярно-генетическом патогенезе развития заболеваний большую актуальность приобретают прогностические шкалы, основанные на мутационном статусе больных. В настоящее время доказано, что носительство мутации *JAK2V617F* повышает риск тромбозов среди больных ЭТ до 45%, а также является предиктором развития

Таблица 2

Тромботические осложнения у больных ХМПЗ в зависимости от факторов риска

Фактор риска	Пациенты с хроническими миелопролиферативными заболеваниями, % (абс. число)		Критерий χ^2	Значимость, р	ОШ (95% ДИ)
	с тромбозами, n=20	без тромбозов, n=50			
Возраст старше 60 лет	65 (13)	46 (23)	1,374	0,242	2,180 (0,745-6,382)
Сердечно-сосудистые факторы риска	65 (13)	34 (17)	4,411	0,036	3,605 (1,213-10,715)
Наличие мутации JAK2V617F	95 (19)	62 (31)	6,092	0,014	11,645 (1,440-94,191)
Лейкоцитоз $>11 \cdot 10^9/\text{л}$	45 (9)	36 (18)	0,182	0,67	1,455 (0,507-4,171)

Примечание. Критерий χ^2 – χ -квадрат с поправкой Йейтса, р – уровень значимости, ДИ – доверительный интервал.

повторных тромбозов. Аналогичные результаты были получены во многих крупных исследованиях, что позволило включить наличие JAK2V617F мутации в шкалу IPSET-thrombosis (универсальный инструмент для оценки риска развития больных ЭТ) в качестве независимого тромбогенного фактора для больных ЭТ [10]. Данные о влиянии JAK2-статуса на частоту тромбозов среди больных ИП противоречивы. В отдельных работах было показано, что высокий уровень аллельной нагрузки ассоциирован с повышенным риском тромботических осложнений. В группе больных ПМФ наибольший риск развития тромбозов связан с носительством мутации JAK2V617F и лейкоцитозом [7].

В исследуемой группе больных более половины тромботических осложнений наблюдались до диагностики заболевания. Случаи длительного латентного течения ХМПЗ, когда клиническая картина представлена лишь тромбозами, трудны для диагностики. Раннее проведение молекулярно-генетического исследования среди лиц с пограничной полицитемией позволит улучшить диагностику маскированных форм ХМПЗ и предотвратить развитие фатальных осложнений, а определение показаний для выявления

JAK2V617F мутации среди больных с тромбозами требует дальнейшего изучения.

Закключение. Возникновение тромботических осложнений является важным фактором, влияющим на выживаемость и качество жизни больных ХМПЗ. По результатам проведенного исследования регистрировались среди пациентов с ИП с частотой 36,4%, ПМФ – 35,2 и ЭТ – 16%. В большинстве случаев (55%) тромбозы являются первым клиническим симптомом заболевания или регистрируются до верификации диагноза. Носительство мутации JAK2V617F и наличие сердечно-сосудистых факторов риска достоверно повышают риск развития тромботических осложнений. Раннее проведение молекулярно-генетического исследования позволит улучшить диагностику маскированных форм ХМПЗ и предотвратить развитие фатальных осложнений.

Литература

1. Клинические особенности эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза в зависимости от молекулярных характеристик заболевания / А.Л. Меликян, И.Н. Суборцева, А.Б. Судариков [и др.] // Терапевт. архив. – 2017. – Т.89, №7. – С.4-9. DOI: 10.17116/terarkh20178974-9

Clinical features of essential thrombocythemia and primary myelofibrosis, depending on the molecular characteristics of disease / A.L. Melikyan, I.N. Subortseva, A.B. Sudarikov [et al] // Therapeutic archive. – 2017. – Т.89, №7. – С.4-9. DOI: 10.17116/terarkh20178974-9

2. Меликян А.Л. Миелопролиферативные новообразования: новые данные / А.Л. Меликян, И.Н. Суборцева // Клинич. онкогематология. – 2016. – Т.9, №2. – С.218-228. Melikyan A.L. Myeloproliferative neoplasia: new data / A.L. Melikyan, I.N. Subortseva // Clinical oncohematology. – 2016. – Vol.9, №2. – P. 218-228.

3. Что нам известно об истинной полицитемии (обзор литературы и собственные данные) / К.М. Абдулкадыров, В.А. Шуваяев, И.С. Мартынкевич // Онкогематология. – 2015. – Т.10, № 3. – С.28-42. DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-3-28-42.

All we know about polycythemia vera: literature review and own experience / K.M. Abdulkadyrov, V.A. Shuvaev, I.S. Martynkevich // Oncohematology. – 2015. – Vol.10, №3. – P.28-42. DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-3-28-42. DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-3-28-42.

4. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders [published correction appears in Lancet / E.J. Baxter, L.M. Scott, P.J. Campbell // Lancet. – 2005. – Vol.9464, №365. – P.1054-1061. DOI:10.1016/S0140-6736(05)71142-9

5. Arachchilage DR. Pathogenesis and Management of Thrombotic Disease in Myeloproliferative Neoplasms / DR Arachchilage, M Laffan // Semin Thromb Hemost. 2019. Vol. 45, №6. – P.604-611. DOI:10.1055/s-0039-1693477

6. Clinical Manifestations and Risk Factors for Complications of Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasms / B Duangnapasatit, E Rattaritramrong, T Rattana-thammethae // Asian Pac J Cancer Prev. – 2015. – Vol.16, №12. P. 5013-5018. DOI: 10.7314/apjcp.2015.16.12.5013

7. Martin K. Risk Factors for and Management of MPN-Associated Bleeding and Thrombosis / K Martin // Curr Hematol Malig Rep. – 2017. – Vol. 12, №5. – P.389-396. DOI: 10.1007/s11899-017-0400-3.

8. Ruxolitinib for the treatment of inadequately controlled polycythemia vera without splenomegaly: 80-week follow-up from the RESPONSE-2 trial / M Griesshammer, G Saydam, F Palandri [et al] // Annals of Hematology. – 2018. Vol.97. – P.1591-1600. DOI: 10.1007/s00277-018-3365-y

9. Thrombosis in Philadelphia negative classical myeloproliferative neoplasms: a narrative review on epidemiology, risk assessment, and pathophysiologic mechanisms / S Ball, KZ Thein, A Maiti [et al] // J Thromb Thrombolysis. – 2018. – Т.45, №4. – P.516-528. DOI:10.1007/s11239-018-1623-4

10. Thrombotic complications of myeloproliferative neoplasms: risk assessment and risk-guided management / A. Casini, P. Fontana, TP. Le-compte // J Thromb Haemost. – 2013. – Vol.11, №7. – P.1215-1227. DOI: 10.1111/jth.12265