

УДК: 616-036.1:616.155.191-021.3: 616.155.291: 575.162

О. Ю. Міщенко<sup>1</sup>✉, О. М. Костюкевич<sup>2</sup>, І. В. Дмитренко<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, Київ, 04050, Україна<sup>2</sup>Державна наукова установа “Науково-практичний центр профілактичної та клінічної медицини”, Державного управління справами, вул. Верхня, 5, Київ, 01014, Україна

## ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ ТА КЛІНІЧНОЇ КАРТИНИ ЕСЕНЦІАЛЬНОЇ ТРОМБОЦИТЕМІЇ ЗАЛЕЖНО ВІД JAK2V617F СТАТУСУ ХВОРИХ

**Мета.** Метою нашого дослідження було проаналізувати особливості взаємозв'язку між наявністю мутації V617F гена *JAK2* та клінічною картиною, ризиком виникнення тромбозів у пацієнтів зі спонтанною і радіаційно-асоційованою есенціальною тромбоцитемією (ЕТ).

**Матеріали та методи.** Проаналізовано результати клінічних, лабораторно-гематологічних, гістоморфологічних та молекулярно-генетичних характеристик хворих на ЕТ. Група хворих на радіаційно-асоційовану ЕТ представлена 10 особами, а когорта спонтанної ЕТ – 111 пацієнтами.

**Результати.** Підтверджено, що *JAK2V617F*-позитивний мутаційний статус хворих на спонтанну ЕТ є предиктором збільшення розповсюдженості тромбозів (23,0 % проти 6,0 %), ризику їх виникнення (відносний ризик = 1,5; 95 % довірчий інтервал = 1,3–1,8) та скорочення тривалості безтромботичної виживаності. Доведено, що наявність *JAK2V617F* мутації збільшує ймовірність виникнення саме венозних тромбозів (відносний ризик = 1,5; 95 % довірчий інтервал = 1,3–1,7) у пацієнтів з ЕТ без радіаційного анамнезу. Урахування *JAK2V617F* мутаційного статусу хворих на спонтанну та радіаційно-асоційовану ЕТ (площа під ROC-кривою = 0,62 та площа під ROC-кривою = 0,68 відповідно) характеризується середнім рівнем ефективності щодо прогнозування виникнення в них тромбозів. Носійство *JAK2V617F* мутації хворими на спонтанну та радіаційно-асоційовану ЕТ характеризується високим (93,9 % та 100 % відповідно) значенням предиктивної цінності негативного результату для оцінки ймовірності виникнення тромбозів. У загальному аналізі крові хворих на спонтанну ЕТ із *JAK2V617F* мутацією, порівняно з пацієнтами без неї, визначається більше середнє значення еритроцитів, гемоглобіну, середнього об'єму еритроцитів та менший показник швидкості осідання еритроцитів, а в їх трепанобіоптаті - превалювання помірної гіперклітинності кісткового мозку, гігантських та крупних форм мегакаріоцитів, ретикулінового фіброзу, мікроциркуляторних порушень. У пацієнтів із радіаційно-асоційованою ЕТ та *JAK2V617F*-позитивним мутаційним статусом виявлено превалювання середньої кількості лейкоцитів порівняно з *JAK2V617F*-негативними хворими.

**Ключові слова:** есенціальна тромбоцитемія, клініко-лабораторні показники, тромбози, *JAK2V617F* мутація.

*Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2015. Вип. 20. С. 399–413.*

O. Y. Mishcheniuk<sup>1</sup>✉, O. M. Kostukevich<sup>2</sup>, I. V. Dmytrenko<sup>1</sup>, S. V. Klymenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Institution "National Research Center for Radiation Medicine of National Academy of Medical Sciences of Ukraine" (NRCRM), Melnikova str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

<sup>2</sup>State Institution "Scientific and Practical Center of Preventive and Clinical Medicine" of the State Administration, Verkhnia str., 5, Kyiv, 01014, Ukraine

## Specifics of the course and the clinical pictures of essential thrombocythemia depending on the *JAK2V617F* status of the patients

**Objective.** The purpose of the study was to analyze the specific features of the relationship between the *JAK2V617F* mutation and clinical presentation, and risks of thrombosis in patients with spontaneous and radiation-associated essential thrombocytopenia (ET).

**Materials and methods.** Clinical, laboratory-hematological, molecular-genetic characteristics of ET patients were analyzed. The group of patients with radiation-associated ET was represented by 10 individuals and the cohort of spontaneous ET represented by 111 persons.

**Results.** The *JAK2V617F*-positive mutation status in patients with spontaneous ET is the predictor of the increase of distribution of thrombosis (23.0 % vs. 6.0 %), risk of its development (relative risk = 1.5; 95 % confidence interval = 1.3–1.8), and the decrease of survival without thrombosis. It has been proved that presence of the *JAK2V617F* mutation increases the probability of venous thrombosis (relative risk = 1.5; 95 % confidence interval = 1.30–1.7) in spontaneous ET patients. The use of the *JAK2V617F* mutation status of patients with spontaneous and radiation-associated ET (AUC = 0.62 and AUC = 0.68 respectively) complies with the average power marker for the prediction of thrombosis. The carriage of the *JAK2V617F* mutation in patients with spontaneous and radiation-associated ET is characterized by a higher (93.9 % and 100 % accordingly) indicator of predictive value of a negative result to determine of the risk of thrombosis. ET patients with the *JAK2V617F* mutation were found to have a higher average value of erythrocytes, hemoglobin, mean corpuscular volume and lower erythrocyte sedimentation rate in their peripheral blood, when compared to those without the mutation. Trepanobiopstat samples of *JAK2V617F*-positive ET patients exhibited a prevalence of moderate hypercellularity of bone marrow, large and giant forms of megakaryocytes, reticulin fibrosis and microcirculation disorders compared to individuals without the mutation. A greater number of average quantities of leukocytes in *JAK2V617F*-positive patients with radiation-associated ET were found compared to *JAK2V617F*-negative persons.

**Key words:** essential thrombocytopenia, clinical-laboratorial characteristics, thrombosis, *JAK2V617F* mutation.

*Problems of radiation medicine and radiobiology. 2015;20:399-413.*

### ВСТУП

До найбільш клінічно та прогностично сприятливих Ph-негативних мієлопроліферативних неоплазій (МПН), із медіаною постдіагностичної виживаності від 19 до 22 років, належить есенціальна тромбocyтeмія (ET) [1].

Одним із маркерів клональності ET є мутація V617F гена *JAK2*, що, згідно з даними більшості ретроспективних досліджень, зустрічається в 50-60 % випадків [2].

Кіназа *JAK2* є незамінним компонентом *JAK/STAT* сигнального шляху, що відіграє провідну роль у передачі сигналів до клітинного ядра від мембранних рецепторів до гемопоетичних факторів росту та цитокінів, а саме рецепторів до еритропоетину, гранулоцитарного-колонієстимулюючого фактору, інтерлейкіну,  $\gamma$ -інтерферону [3]. Взаємодія вказаних цитокінів із відповідними рецепторами індукує фосфо-

### INTRODUCTION

Essential thrombocythemia (ET) belongs to the most clinically and prognostically favorable Ph-negative myeloproliferative neoplasms (MPN) with a median survival after diagnosis 19 to 22 years [1].

One of the markers of the ET clonality is the mutation V617F in the *JAK2* gene, which according to the most retrospective studies is found in 50-60% of cases [2].

Kinase *JAK2* is an indispensable component of the *JAK/STAT* signaling pathway, which plays a leading role in the transmission of signals to the cell nucleus from the membrane receptors for hematopoietic growth factors and cytokines, such as receptors for erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor, interleukin,  $\gamma$ -interferon [3]. Interaction of the cytokines with the appropriate receptors induces

рилювання JAK2 протеїну, що, в свою чергу, забезпечує активацію низхідних каскадних сигнальних шляхів: PI3K/Akt, RAS/ERK та STAT5. Ці сигнальні шляхи й регулюють проліферацію клітин, їх диференціювання та апоптоз [4].

За умов наявності мутації V617F відбувається аутофосфорилування JAK2 кінази, з наступною активацією каскаду JAK2/STAT5, PI3K/Akt, Ras/ERK, без попередньої взаємодії клітинних рецепторів зі своїми лігандами. Отже, наявність мутантного білка JAK2, незалежно від тригерного впливу цитокінів, забезпечує проходження фаз клітинного циклу та диференціювання клітин [5]. Антиапоптичний ефект *JAK2* V617F мутації опосередковується через гіперекспресію BCL<sub>x</sub> [6] та зменшення рецептор-опосередкованого апоптозу [7].

Провідна роль *JAK2*V617F мутації в патогенезі розвитку клональної мієлопроліферації, за даними деяких авторів, має своє віддзеркалення в клінічній картині та особливостях перебігу ЕТ. Так, визначають кореляційний зв'язок між *JAK2*V617F статусом пацієнтів та їх клінічними і лабораторно-гематологічними показниками. Зокрема, у *JAK2*V617F-позитивних хворих на ЕТ визначали більшу кількість еритроцитів, вищий рівень концентрації лужної фосфатази та масивнішу спленомегалію, ніж у *JAK2*V617F-негативних пацієнтів [8, 9].

Зважаючи на те, що в структурі ускладнень та летальності хворих на ЕТ тромбози займають провідну позицію [10, 11], особливу увагу звертають на внесок *JAK2*V617F мутації у збільшення ймовірності їх розвитку. Зокрема, A. Carobbio та співавторами визначено, що при ЕТ *JAK2*V617F-позитивний мутаційний статус підвищував рівень ризику виникнення артеріальних тромбозів у більше ніж 2,5 рази [12].

Проте результати досліджень з визначення зв'язку між мутаційним статусом гена *JAK2* або навантаженням мутаційною алелю та клінічною картиною ЕТ, залишаються суперечливими.

Отже, метою нашого дослідження було проаналізувати особливості взаємозв'язку між наявністю мутації V617F гена *JAK2* та клінічною картиною, ризиком виникнення тромбозів у пацієнтів зі спонтанною і радіаційно-асоційованою есенціальною тромбоземією.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Проаналізовано клінічні, лабораторно-гематологічні та молекулярно-генетичні характеристики хворих на ЕТ. Для запобігання упередженості щодо відбору клінічних випадків для аналізу, пацієнтів з

phosphorylation of the JAK2 protein, which in turn ensures the activation of the downstream signaling cascade pathway: PI3K/Akt, RAS/ERK and STAT5. These signaling pathways regulate cell proliferation, differentiation and apoptosis [4].

The JAK2 kinase autophosphorylation followed by the activation of cascade JAK2/STAT5, PI3K/Akt, Ras/ERK without previous interactions of its cellular receptors ligands, occurs upon availability of the V617F mutation. Therefore, the presence of the mutant protein JAK2 ensures the passing phases of the cell cycle and the cell differentiation, regardless of exposure to cytokine [5]. The antiapoptotic effect of the *JAK2*V617F mutation is mediated through overexpression of BCL<sub>x</sub> [6] and reduction of the receptor-mediated apoptosis [7].

The leading role of *JAK2*V617F mutations in the pathogenesis of the clonal myeloproliferation, according to some authors, is reflected in the clinical picture and the course of ET. As a result, a correlation between the *JAK2*V617F status of patients and their clinical/hematological laboratory parameters is determined. To illustrate, *JAK2*V617F-positive patients with ET, exhibit higher quantities of red blood cells, higher concentration of alkaline phosphatase and massive splenomegaly, when compared to *JAK2*V617F-negative patients [8, 9].

Given the fact that thromboses occupy a leading position in the structure of complications and mortality of ET patients [10, 11], special attention is paid to the contribution of the *JAK2*V617F mutation in increasing of their likelihood. In particular, A. Carobbio et al. determined that the *JAK2*V617F-positive mutation status increased the risk of arterial thrombosis more than 2.5-fold in ET patients [12].

However, the results of studies, which determined the relationship between either the mutation status of the *JAK2* gene or the load of mutation alleles and characteristic of ET, remain controversial.

So the purpose of our study was to analyze the specific features of the relationship between the presence of the *JAK2* V617F mutation and both clinical presentation risks of thrombosis in patients with spontaneous and radiation-associated ET.

## MATERIALS AND METHODS

Clinical, laboratory-hematological and molecular-genetic characteristics of ET patients were analyzed. To prevent bias on the selection of clinical cases for analysis, ET patients were included in the

ЕТ включали в дослідження за госпітально-орієнтованим принципом. Отже, в аналіз включені хворі на ЕТ, які лікувалися або були консультовані в Державній установі “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України” в 1987–2015 рр. Матеріал для дослідження отримано шляхом проспективного обстеження, а також пошуку ретроспективних даних і біологічних зразків пацієнтів, яким верифіковано ЕТ. Усі хворі на ЕТ перевірені на відповідність їх діагнозу до переглянутих у 2008 р. ВООЗ критеріїв мієлоїдних неоплазм та ГЛ [13].

Група хворих на радіаційно-асоційовану ЕТ представлена 10 особами (5 пацієнтів – учасники ЛНА на ЧАЕС у 1986–1991 рр., 5 пацієнтів – постійно проживають на радіоактивно забруднених територіях України), а когорта спонтанної ЕТ – 111 особами, які зазнали опромінення виключно в межах природного радіаційного фону. Вік пацієнтів із радіаційно-асоційованою та спонтанною ЕТ коливався від 32 до 77 років та від 28 до 88 років відповідно, а його середнє значення дорівнювало ( $59,0 \pm 12,5$ ) і ( $53,3 \pm 15,0$ ) рокам відповідно ( $p = 0,614$ ). Тривалість захворювання на момент включення в обстеження хворих на радіаційно-асоційовану і спонтанну ЕТ варіювала від 0,5 до 5,8 року та від місяця до 10,0 років відповідно. Медіана клінічного спостереження за хворими на радіаційно-асоційовану ЕТ дорівнювала 2,6 року (25- та 75-перцентиль становив 0,7 та 5,8 року, відповідно), а за пацієнтами зі спонтанною патологією – 2,4 року (25- та 75-перцентиль складав 1,0 та 3,2 року, відповідно).

Клінічні дані та результати лабораторних обстежень осіб, які включені в дослідження, отримано під час збору анамнезу пацієнтів та обробки їх медичної документації. Звертали увагу на наявність в анамнезі хворих тромбозів, що підтверджувалось відповідним записом у медичній документації. Враховувалось в якому саме руслі, – артеріальному чи венозному, виник судинний епізод. Також фіксували наявність у пацієнтів в анамнезі геморагічних ускладнень, солідних пухлин та трансформацію ЕТ в пост-ЕТ мієлофіброз (пост-ЕТ МФ).

Визначали період часу між первинним оглядом пацієнта гематологом, із верифікацією діагнозу ЕТ, та останнім його обстеженням, фіксуючи загальну тривалість клінічного спостереження. Також розраховували тривалість безтромботичної виживаності хворих на ЕТ, за яку вважали час від моменту верифікації діагнозу до виникнення судинного епізоду.

study according to the hospital-oriented principle. Therefore, for this analysis we included ET patients who have been treated or consulted at the State Institution “National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine” between 1987–2015. The material for the study was obtained by prospective examination and retrospective search of data and biological samples of patients who have been diagnosed with ET. The ET diagnosis of all patients was tested for compliance with myeloid neoplasms and AL criteria revised in 2008 by the WHO [13].

The group of patients with radiation-associated ET was represented by 10 individuals (5 patients were liquidators at Chernobyl between 1986–1991, 5 patients permanently living in radiation-contaminated areas of Ukraine) and the cohort of spontaneous ET – 111 persons who were exposed to natural background radiation. The age of patients with radiation-associated and spontaneous ET ranged from 32 to 77 and from 28 to 88 respectively, and its average value equal to  $59.0 \pm 12.5$  and  $53.3 \pm 15.0$  accordingly ( $p = 0.614$ ). The disease duration at the time of inclusion in the examination of patients with radiation-associated and spontaneous ET varied from 0.5 to 5.8 years and from 1 month to 10.0 years respectively. The median of the clinical observation of the radiation-associated ET patients equaled 2.6 years (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentile was 0.7 and 5.8 years respectively) and the patients with spontaneous pathology – 2.4 years (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentile was 1.0 and 3.2 years respectively).

The clinical data and the laboratory examinations of individuals, who were included in the study, were received during medical history intake and processing of patient medical records. Increased attention was paid to patients with a history of thrombosis verified by the respective clinical record with taking into account if the arterial or venous vascular episode occurred. Also, history of bleeding complications, solid tumors and transformation ET in post ET MF was emphasized and recorded.

We determined the period of time between a patient’s initial ET diagnosis and his last examination, recording the total time of the clinical observation. We also counted the duration of survival for patients without thrombotic complication, which took into consideration the time from initial diagnosis to the manifestation of a vascular episode.

Під час опитування або обробки медичної документації пацієнтів з ЕТ звертали увагу на наявність у них скарги на еритромелалгію, біль у кістках, пітливість, втрату ваги, аквагенний свербіж шкіри, підвищення температури до субфебрильних цифр. Серед показників об'єктивного обстеження хворих враховували наявність у них збільшення розміру селезінки та/або печінки, що було визначено під час пальпації або за допомогою УЗД органів черевної порожнини.

Проведено аналіз клініко-гематологічних даних, зокрема цитоморфологічного дослідження периферійної крові з підрахунком лейкограми.

На етапі діагностики ЕТ, у пацієнтів оцінювався стан кісткового мозку (КМ), що визначали в гістологічних препаратах трепанобіоптатів, отриманих методом задньої трепанобіопсії здухвинної кістки. У кістковій тканині акцентували увагу на співвідношенні гемопоетичного та жирового компоненту КМ, наявності специфічних змін (клітинність КМ, наявність гіперплазії еритроїдного, мієлоїдного та мегакаріоцитарного (МГКЦ) паростків, морфологічних характеристик МГКЦ, процеси визрівання клітин мієлоїдного паростка (лівий зсув або переважання молодих форм), присутності ретикулінового або колагенового фіброзу та мікроциркуляторних порушень.

Також проаналізовано результати молекулярно-генетичного скринінгу на наявність JAK2V617F мутації у хворих на спонтанну та радіаційно-асоційовану ЕТ.

Середні величини в таблицях та тексті наведені у вигляді  $M \pm m$ . За умови невідповідності числового ряду значень параметричних показників Пуасонівському розподіленню, його охарактеризували медіаною з відповідним 25- та 75-перцентилем. Параметричні показники порівнювали за допомогою *t*-тесту (Стьюдента) у двобічному варіанті, а непараметричні – точного тесту Фішера у двобічному варіанті. Ступінь взаємозв'язку між категоріальними показниками виражали у вигляді відносного ризику (ВР) із відповідним 95 % довірчим інтервалом (ДІ). Взаємозв'язок між кількісними показниками визначався за допомогою множинного лінійного регресійного аналізу з розрахунком коефіцієнту детермінації та F-критерію Фішера.

Сукупну тривалість безтромботичного перебігу захворювання оцінювали за методом Каплана-Мейера з використанням логрангового критерію. Для оцінки тривалості безтромботичного перебігу захворювання (безтромботичної виживаності) використовували часовий інтервал між датою верифікації діагнозу та датою розвитку судинного епізоду або ос-

While surveying ET patients and processing their medical records, special attention was paid to complaints of erythromelalgia, bone pain, sweating, weight loss, aquagenic itching, subfebrile fever. While conducting physical patient examinations through use of palpation and diagnostic ultrasound, we noticed and recorded irregularities, such as increased sizes of the spleen and/or liver.

The analysis of clinical and hematological data includes cytomorphological study of peripheral blood with counting of leukogram.

During ET diagnosis, histological samples of trepanobiopsates, obtained by the posterior trephine biopsy of Ilium, were used to determine the state of a patients' bone marrow (BM). Looking at the BM, we focused on the relationship of hematopoietic and fatty components, presence of specific changes (cellularity of BM, the presence of hyperplasia of erythroid, myeloid and megakaryocytic (MGKC) lineage), morphological characteristics of MGKC, processes of maturation of cells myeloid lineage (left shift or the predominance of young forms), presence of reticulin or collagen fibrosis and microcirculation disorders.

Also, the results of molecular-genetic screenings for the presence of the JAK2V617F mutation in patients with spontaneous and radiation-associated ET were analyzed.

The average values in the tables and text below are presented as  $M \pm m$ . In case of inconsistencies for numerical values of parametric indicators to the Poisson distribution, these were characterized by the median with the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentile. Parametric indicators were compared using a *t*-test (Student) in a bidirectional version, while non-parametric used a bidirectional Fisher's exact test. The degree of the relationship between categorical indicators is expressed as relative risk (RR) with a corresponding 95% confidence interval (CI). The relationship between quantitative indicators was determined using multiple linear regression analysis with the calculation of the coefficient of determination and F-Fisher criterion.

The aggregate duration of the disease without thrombosis was estimated by the Kaplan-Meier method using the Logrank test. To assess the duration of the disease without thrombosis (survival without thrombosis) we used a time interval between the date of diagnosis and either the date of the initial vascular episode or last contact of a doc-

таннього контакту з пацієнтом. Із метою оцінки функції миттєвого ризику реалізації тромботичних ускладнень протягом певного інтервалу часу (період клінічного спостереження) за носійства молекулярно-генетичних предикторів виникнення судинних епізодів використано регресійну модель Кокса. Якщо в когорті хворих, яка досліджується, розповсюдженість тромбозів менше 50 % випадків, визначення медіани тривалості безтромботичного перебігу ЕТ не є коректним. Тому ми розраховували відсоток випадків виникнення судинних епізодів протягом одного року – сукупну середню щорічну частоту, що визначена як відношення відсотка осіб, в яких виникли тромбози, до середнього значення часу клінічного спостереження. Порівняння показників сукупної середньої щорічної частоти тромбозів в різних групах проведено за допомогою логрангового критерію [14]. Дискримінаційний аналіз із застосуванням ROC-кривих використано для визначення загального рівня практичної ефективності та підтвердження статистичної значущості для прогнозування виникнення тромбозів молекулярно-генетичних факторів їх розвитку. Загальна ефективність оцінювалася за допомогою аналізу площі під ROC-кривою (ППК). Площа під ROC-кривою, яка дорівнювала 0,5–0,6, відповідала незадовільній моделі, 0,6–0,7 – середній, 0,7–0,8 – добрій, 0,8–0,9 – дуже добрій, а 0,9–1,0 – відмінній. Для оцінки надійності маркерів для прогнозування виникнення тромботичних епізодів визначено та проаналізовано операційні характеристики, а саме чутливість, специфічність, предиктивну цінність позитивного результату (ПЦПР), предиктивну цінність негативного результату (ПЦНР). Твердження про наявність істотних розбіжностей припускали за вірогідності помилки менше 0,05. 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 ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У хворих на спонтанну та радіаційно-асоційовану ЕТ геморагічні ускладнення спостерігались у 6,0 % (у 7 осіб) та в 0 % (у 0 осіб) епізодів відповідно, а пост-ЕТ МФ виник в 1,8 % (у 2 осіб) та в 0 % (у 0 осіб) випадків відповідно. Одне і більше тромботичне ускладнення визначено у 18,0 % (у 20 осіб) хворих на ЕТ, які не зазнали впливу аварійного радіаційного опромінення, та в 20,0 % (у 2 осіб) пацієнтів, які постраждали внаслідок аварії на ЧАЕС.

tor with the patient. The Cox regression analysis was used to assess the risk of occurrence of thrombotic complications during a certain time interval (the period of clinical observation) for carriage of molecular-genetic predictors of vascular episodes. If in a cohort of patients the prevalence of thrombosis was less than 50% of all cases, it is not correct to determine the median duration of ET without thrombotic complication. Therefore, we calculated the percentage of cases of cardiovascular episodes in one year – the average annual total rate, which is defined as the ratio of the percentage of persons which have thrombosis to the mean time of clinical observation. A comparison between the indicators of the average annual frequency of thrombosis in different groups was performed using the Log-rank test [14]. Discriminant analysis using ROC-curves was used to determine the total level of practical efficiency and verification of statistical significance of molecular-genetic parameters for thrombotic prediction. The overall effectiveness was assessed by analyzing the area under the ROC-curve (AUC). The area under the ROC-curve which equaled 0.5–0.6 corresponded to unsatisfactory model, 0.6–0.7 – average, 0.7–0.8 – well, 0.8–0.9 – very good, and 0.9–1.0 – excellent. According with the requirements of evidence-based medicine, to assess the reliability of markers for predicting occurrence of thrombotic episodes, operating characteristics were identified and analyzed, such as sensitivity, specificity, predictive value of a positive result (PVPR) predictive value of a negative result (PVNR). 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

In patients with spontaneous and radiation-associated ET hemorrhagic complications were observed in 6.0 % (7 people) and 0 % (0 of persons) episodes respectively, and post ET MF emerged in 1.8 % (2 persons) 0 % (0 people in) cases respectively. One or more of the thrombotic complications were identified in 18.0 % (20 people) ET patients who are not exposed to radiation emergency, and 20.0 % (2 people) of patients who suffered from the Chernobyl accident.

При ЕТ розповсюдженість тромбозів у пацієнтів, які постраждали від іонізуючої радіації внаслідок аварії на ЧАЕС, та у хворих, розвитку мієлопроліферативного неопластичного процесу яких не передував вплив аварійного радіаційного опромінення, однакова (2 з 10 проти 20 із 111;  $p = 1,000$ ).

Пацієнти з тромбозами були стратифіковані відповідно до типу судинного русла, в якому вони виникли. У хворих на спонтанну та радіаційно-асоційовану ЕТ артеріальні тромбози спостерігались у 8,1 % (у 9 осіб) і в 10,0 % (в 1 особи) випадків відповідно, а венозні тромботичні судинні ускладнення – у 9,9 % (в 11 осіб) та у 10,0 % (в 1 особи) епізодів відповідно.

У хворих на ЕТ без радіаційного анамнезу та у пацієнтів, які постраждали внаслідок аварії на ЧАЕС, мутація V617F гена *JAK2* представлена у 70,3 % (78 осіб) і 70,0 % (7 осіб) випадків відповідно.

Розповсюдженість тромбозів у хворих на спонтанну та радіаційно-асоційовану ЕТ з наявністю мутації V617F гена *JAK2* становила 23,1 % (у 18 осіб) і 28,6 % (у 2 осіб), відповідно, а без неї – 6,1% (у 2 осіб) та 0% (0 осіб), відповідно. Підтверджено, що у хворих на спонтанну ЕТ з наявністю *JAK2*V617F мутації тромбози зустрічались частіше, ніж у *JAK2*V617F-негативних пацієнтів (18 із 78 проти 2 із 33;  $p = 0,033$ ), а її носійство збільшувало ВР тромбозів у 1,5 рази (95 % ДІ = 1,3-1,8). Натомість розповсюдженість тромбозів у хворих на радіаційно-асоційовану ЕТ із *JAK2*V617F-позитивним та *JAK2*V617F-негативним мутаційним статусом не відрізнялась (2 із 7 проти 0 із 3;  $p = 1,000$ ).

Стратифікація хворих на спонтанну ЕТ із судинними ускладненнями відповідно до русла, в якому вони виникли, дозволила виявити, що у пацієнтів із *JAK2*V617F-позитивним мутаційним статусом, порівняно з *JAK2*V617F-негативними особами, спостерігалось превалювання розповсюдженості венозних тромбозів (11 із 78 проти 0 із 33;  $p = 0,031$ ). Також визначено, що у пацієнтів з ЕТ без радіаційного анамнезу ймовірність виникнення тромбозів у венозному судинному руслі за наявності мутації V617F гена *JAK2* зростає в 1,5 рази (ВР = 1,5; 95 % ДІ = 1,3-1,7). Існування внеску носійства *JAK2*V617F мутації в зміну зустрічальності венозних тромбозів не підтверджено для хворих на радіаційно-асоційовану ЕТ (1 із 7 проти 0 із 3;  $p = 1,000$ ). Різниця в розповсюдженості артеріальних васкулярних подій між *JAK2*V617F-позитивними та *JAK2*V617F-негативними хворими на ЕТ контрольної (7 із 78 проти 2 із 33;  $p = 0,722$ ) і основної (1 із 7 проти 0 із 3;  $p = 1,000$ ) групи не спостерігалось.

The prevalence of thrombosis in patients, who were affected by radiation due to the accident, and in those patients with myeloproliferative neoplastic development process of which was not preceded by the impact of radiation emergency, is the same (2 of 10 vs. 20 of 111;  $p = 1.000$ ).

Patients with thrombosis were stratified according to the type of vascular channel in which they arise. In patients with spontaneous and radiation-associated ET, arterial thrombosis were observed in 8.1 % (9 people) and 10.0 % (1 person) cases, respectively, and venous thrombotic vascular complications – in 9.9 % (11 persons) and 10.0 % (1 person) episodes respectively.

In patients with ET but no radiation history and in those who suffered from the Chernobyl accident the V617F mutation of *JAK2* gene represented 70.3 % ( $n = 78$ ) and 70.0 % ( $n = 7$ ) cases respectively.

The prevalence of thrombosis in patients with both spontaneous and radiation associated ET as well as the presence of the *JAK2*V617F mutation was 23.1 % (18 persons) and 28.6 % (2 people), respectively, and those without it was 6.1 % (2 persons) 0 % (0 people) respectively. It is confirmed that in *JAK2*V617F-positive patients with spontaneous ET, thrombosis occurred more often, than in *JAK2*V617F-negative patients (18 of 78 vs. 2 of 33,  $p = 0.033$ ), and its carriage increased RR of thrombosis by 1.5 times (95 % CI = 1.3-1.8). Instead, the prevalence of thrombosis in *JAK2*V617F-positive and *JAK2*V617F-negative patients with radiation-associated ET did not differ (2 of 7 vs. 0 of 3;  $p = 1.000$ ).

The stratification of patients with spontaneous ET and vascular complications according to their bloodstream, revealed that in patients with the *JAK2*V617F-positive mutation status, compared with *JAK2*V617F-negative individuals, there was observed a prevalence of venous thrombosis (11 of 78 vs. 0 of 33;  $p = 0.031$ ). Also, there was determined that in ET patients without radiation history, the presence of the *JAK2*V617F mutation increased the likelihood of venous thrombosis by 1.5 times (RR = 1.5; 95 % CI = 1.3-1.7). The existence of the contribution of the *JAK2*V617F mutation carriage in the occurrence of venous thrombosis is not confirmed for patients with radiation-associated ET (1 of 7 vs. 0 of 3;  $p = 1.000$ ). The differences in the prevalence of arterial vascular events between *JAK2*V617F-positive and *JAK2*V617F-negative patients with ET of the control (7 of 78 vs. 2 of 33;  $p = 0.722$ ) and main (1 of 7 vs. 0 of 3;  $p = 1.000$ ) group was not observed.

Проведений статистичний аналіз визначив виключно внесок *JAK2* V617F-позитивного мутаційного статусу хворих у розповсюдженість тромбозів при ЕТ. Проте, не проаналізовано роль *JAK2* V617F мутації у зміні тривалості часу безтромботичного перебігу захворювання за методом Каплана-Мейера. Зважаючи на те, що частота тромбозів у групі хворих на ЕТ була менша, ніж 50 % випадків, визначення медіани тривалості безтромботичного перебігу неопластичного процесу не є коректним, тому нами розраховано відсоток виникнення судинних епізодів протягом одного року – сукупну середню щорічну частоту.

Визначено, що у хворих на ЕТ з радіаційним анамнезом і без радіаційного анамнезу сукупний середній щорічний відсоток осіб, у яких виникають тромбози, дорівнював 7,7 % та 7,5 % випадків, відповідно. Після розподілу пацієнтів на *JAK2*V617F-позитивних і *JAK2*V617F-негативних, виявлено більшу середню річну частоту розвитку судинних ускладнень (табл. 1) та нижчий рівень безтромботичної виживаності у хворих на спонтанну ЕТ (рис. 1) з наявністю мутації гена *JAK2* порівняно з особами, в яких вона відсутня ( $p = 0,011$ ).

На рис. 1 представлені криві Каплан-Мейера, що демонструють сукупний рівень безтромботичної виживаності протягом періоду клінічного спостереження у *JAK2*V617F-позитивних та *JAK2*V617F-негативних пацієнтів зі спонтанною ЕТ.

Також у дослідженні підтверджено, що як за радіаційно-асоційованої, так і спонтанної ЕТ урахування *JAK2*V617F мутаційного статусу хворих є ефективним інструментом для оцінки ймовірності тромбозів (табл. 2).

Наявність *JAK2*V617F мутації в пацієнтів зі спонтанною та радіаційно-асоційованою ЕТ характери-

Only the contribution of the *JAK2* V617F-positive mutation status in the prevalence of thrombosis in ET patients was revealed. However, the role of *JAK2*V617F mutation in the change of disease duration time without thrombosis by the method of Kaplan–Meier was not analyzed. Given the fact that the incidence of thrombosis in patients with ET was <50 % of cases, it is not correct to determine the median duration the ET without thrombotic complication. Therefore, we calculated the percentage of cases of cardiovascular episodes in one year – the average annual total rate.

It was determined that in ET patients with radiation and without radiation history, the cumulative average annual percentage of persons having thrombosis, equaled to 7.7% and 7.5% of cases respectively. After the separation of patients into *JAK2*V617F-positive and *JAK2*V617F-negative groups, a greater average annual incidence of vascular complications was found (Table 1); and the lower survival without thrombosis in the patients with spontaneous ET (Fig. 1) with the presence of the *JAK2* mutation in comparison of persons without of it ( $p = 0.011$ ).

Fig. 1 shows the Kaplan–Meier curves, which demonstrated the total level of the survival without thrombosis during the period of clinical observation in *JAK2*V617F-positive and *JAK2*V617F-negative patients with spontaneous ET.

Also, the study confirmed, that taking into account the *JAK2*V617F mutation status of patients is an effective tool for assessing the likelihood of thrombosis in radiation-associated and spontaneous ET (Table 2).

The presence of the *JAK2*V617F mutation in patients with spontaneous and radiation-associated

**Таблиця 1**

**Сукупна щорічна частота розвитку тромбозів у хворих на ЕТ із наявністю та відсутністю *JAK2*V617F мутації**

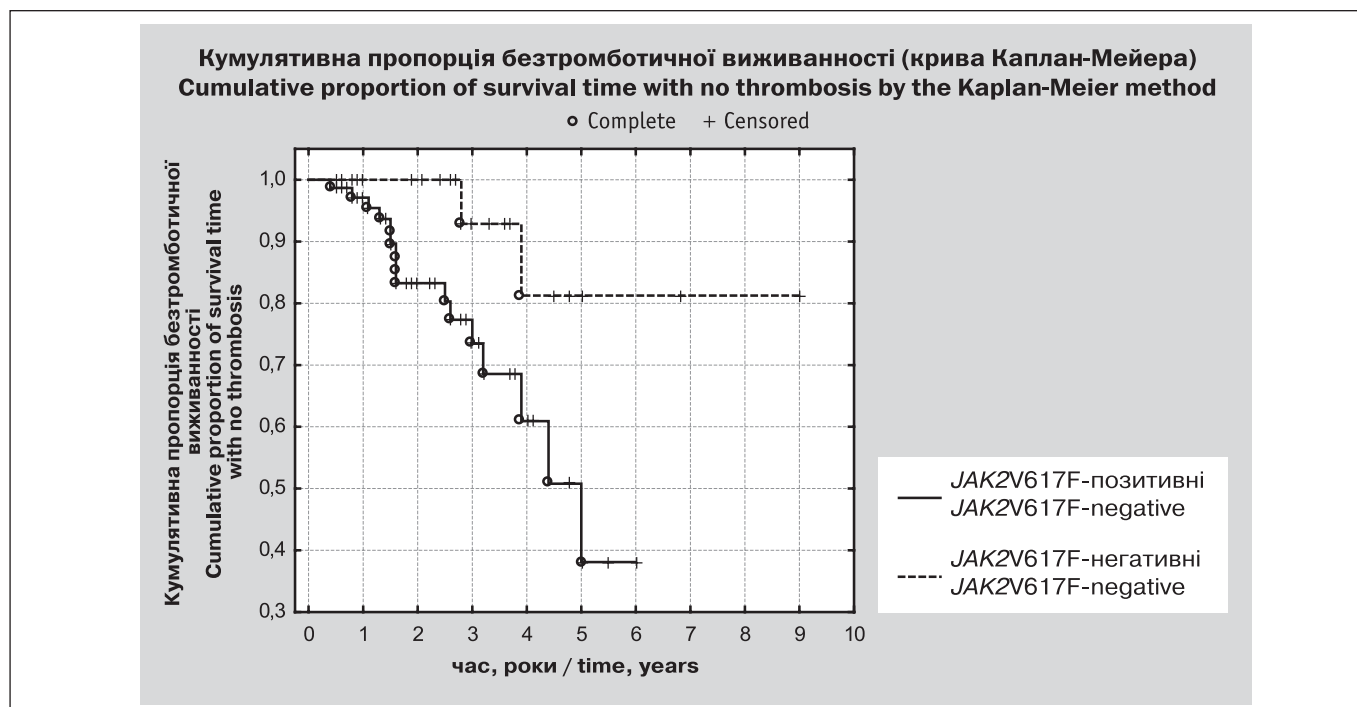
**Table 1**

**The total annual incidence of thrombosis in ET patients with presence and absence of the *JAK2*V617F mutation**

Група хворих на ЕТ Group of ET patients	<i>JAK2</i> V617F-позитивні хворі з наявністю тромбозів <i>JAK2</i> V617F-positive patients with thrombosis		<i>JAK2</i> V617F-негативні хворі з наявністю тромбозів <i>JAK2</i> V617F-negative patients with thrombosis		<i>p</i> *
	Середній термін спостереження, роки (25- та 75-перцентиль) The mean time of clinical observation (25 <sup>th</sup> and 75 <sup>th</sup> percentile)	% пацієнтів на рік % patients to year	Середній термін спостереження, роки (25- та 75-перцентиль) The mean time of clinical observation (25 <sup>th</sup> and 75 <sup>th</sup> percentile)	% пацієнтів на рік % patients to year	
Із радіаційним анамнезом With radiation anamnesis	2,6 (1,1–5,1)	7,7%	2,60 (1,9–3,3)	0	-
Без радіаційного анамнезу Without radiation anamnesis	2,2 (0,4–6,0)	10,7%	2,65 (0,9–4,2)	2,3	0,011

Примітки. \* – різниця між % сукупною щорічною частотою виникнення тромбозів у хворих на радіаційно-асоційовану та спонтанну ЕТ з наявністю і відсутністю *JAK2*V617F мутації.  
Notes. \* – the difference between the % of annual cumulative incidence of thrombosis in *JAK2*V617F-positive and *JAK2*V617F-negative patients with radiation-associated and spontaneous ET.





**Рисунок 1.** Криві сукупної безтромботичної виживаності у *JAK2V617F*-позитивних на *JAK2V617F*-негативних хворих на спонтанну ЕТ

**Figure 1.** The aggregate survival without thrombosis in *JAK2V617F*-positive and *JAK2V617F*-negative patients with spontaneous ET

зується низькою ПЦПР для визначення ризику розвитку тромбозів, проте – 93,9 % та 100 % ПЦНР відповідно. Площа під ROC-кривою використання *JAK2V617F* мутаційного статусу у хворих на радіаційно-асоційовану та спонтанну ЕТ для прогнозування тромботичних подій відповідає маркеру середньої потужності.

ET characterized by 23.1 % and 28.6 % PVPR was used to determine of the risk of thrombosis, however – 93.9 % and 100 % PVNR respectively. The use of the *JAK2V617F* mutation status of patients with spontaneous and radiation-associated ET, according to the ROC-curves, complies with the average power marker for the prediction of thrombosis.

**Таблиця 2**

Операційні характеристики ефективності та надійності молекулярно-генетичних показників для прогнозування розвитку тромбозів у хворих на радіаційно-асоційовану та спонтанну ЕТ

**Table 2**

The operating efficiency and reliability characteristics of the of molecular-genetic parameters for prediction of thrombosis in patients with radiation-associated and spontaneous ET

Показник Parameter	Значення, (95% ДІ) / value, (95 % CI) <i>JAK2 V617F</i> мутація / <i>JAK2V617F</i> mutation	
	без радіаційного анамнезу / without radiation anamnesis	із радіаційним анамнезом / with radiation anamnesis
Площа під ROC-кривою Area under ROC- curve	0,62 (0,52-0,71)	0,68 (0,33-0,92)
р	0,004	0,040
Чутливість Sensitivity	90,0 (68,3-98,8)	100 (15,8-100)
Специфічність Specificity	34,0 (24,5-44,7)	37,5 (8,5-75,5)
ПЦПР PVPR	23,1 (14,3-34,0)	28,6 (3,7-71,0)
ПЦНР PVNR	93,9 (79,8-99,3)	100 (29,2-100)

У хворих на спонтанну ЕТ частота скарги на біль у кістках та пітливість дорівнювала 1,8 % (у 2 осіб) та 5,4 % (у 6 осіб) випадків відповідно, а в пацієнтів із радіаційно-асоційованою патологією – 0 % (у 0 осіб) та 10,0 % (в 1 особи) епізодів відповідно. Різниця в розповсюдженості скарги на біль у кістках та пітливість між *JAK2V617F*-позитивними і *JAK2V617F*-негативними хворими на радіаційно-асоційовану (0 із 7 проти 0 із 3;  $p$  – не розраховується та 1 із 7 проти 0 із 3;  $p = 1,000$ , відповідно) і спонтанну (2 із 78 проти 0 із 33;  $p = 1,000$  та 5 із 77 проти 1 із 33;  $p = 0,664$ , відповідно) ЕТ не виявлено. Скарга на еритромелалгію при спонтанній та радіаційно-асоційованій ЕТ зустрічалась у 7,2 % (у 8 осіб) та у 10,0 % (в 1 особи) випадків відповідно, а аквагенний свербіж шкіри визначався у 3,6 % (4 осіб) та в 0 % (0 осіб) епізодів відповідно. Не виявлено більшої розповсюдженості скарги на еритромелалгію (7 із 78 проти 1 із 33;  $p = 0,432$ ) та пруритус (4 із 78 проти 0 із 33;  $p = 0,316$ ) у хворих на ЕТ контрольної групи з наявністю *JAK2V617F* мутації, ніж у пацієнтів без неї. В основній групі хворих на ЕТ також не спостерігалось різниці в частоті зустрічальності еритромелалгії між *JAK2V617F*-позитивними та *JAK2V617F*-негативними особами (1 із 7 проти 0 із 3;  $p = 1,000$ ).

У пацієнтів із радіаційно-асоційованою ЕТ збільшення розміру селезінки та печінки, що визначали під час пальпації або за допомогою УЗД органів черевної порожнини, спостерігалось у 10,0 % (в 1 особи) та 10,0 % (в 1 особи) випадків відповідно, а у хворих на спонтанний мієлопроліферативний процес – у 8,1 % (у 9 осіб) та в 1,8 % (у 2 осіб) епізодів відповідно. Не підтверджено наявності різниці в розповсюдженості випадків збільшення розміру селезінки та печінки у хворих на радіаційно-асоційовану (1 із 7 проти 0 із 3;  $p = 1,000$  та 1 із 7 проти 0 із 3;  $p = 1,000$ ), а також спонтанну (6 із 78 проти 3 із 33;  $p = 1,000$  та 2 із 78 проти 0 із 33;  $p = 1,000$ ) ЕТ з наявністю та відсутністю мутації *V617F* у гені *JAK2*.

Під час аналізу лабораторно-гематологічних показників визначено, що у хворих на спонтанну ЕТ із *JAK2V617F* мутацією спостерігається більше середнє значення еритроцитів ( $p = 0,00005$ ), гемоглобіну ( $p = 0,003$ ), середнього об'єму еритроцитів (MCV) ( $p = 0,031$ ) та менший показник швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ) ( $p = 0,026$ ), ніж у пацієнтів без неї. У хворих на радіаційно-асоційовану ЕТ із *JAK2V617F*-позитивним мутаційним статусом виявлено превалювання середньої кількості лейкоцитів порівняно з *JAK2V617F*-негативними особами ( $p = 0,048$ ) (табл. 3).

In patients with spontaneous ET, the frequency of complaints of bone pain and sweating amounted to 1.8 % ( $n = 2$ ) and 5.4 % ( $n = 6$ ) cases respectively, and in patients with radiation-associated disease – 0 % (0 of persons) and 10.0 % (1 person) episodes respectively. The differences in the prevalence of complaints of bone pain and sweating between *JAK2V617F*-positive and *JAK2V617F*-negative patients with radiation-associated (0 of 7 vs. 0 of 3;  $p =$  not calculated and 1 of 7 vs. 0 of 3;  $p = 1.000$  respectively) and spontaneous (2 of 78 vs. 0 of 33,  $p = 1.000$  and 5 of 77 vs. 1 of 33;  $p = 0.664$  respectively) ET were not found. The complaint of erythromelalgia with spontaneous and radiation-related ET was found in 7.2 % (8 persons) and 10.0 % (1 person) cases respectively, and aquagenic itching determined in 3.6 % (4 persons) and 0 % (0 of persons) episodes respectively. Not defined was the greater prevalence of the complaint of erythromelalgia (7 of 78 vs. 1 of 33;  $p = 0.432$ ) and pruritus (4 of 78 vs. 0 of 33,  $p = 0.316$ ) in the control group of ET patients with the *JAK2V617F* mutation, than in those without it. In the main group of ET patients differences in the frequency of occurrence of erythromelalgia between *JAK2V617F*-positive and *JAK2V617F*-negative persons (1 of 7 vs. 0 of 3;  $p = 1.000$ ) were not found.

In patients with radiation-associated ET, increased size of spleen and liver, which were determined during palpation or ultrasound of the abdomen, was observed in 10.0 % (1 person) and 10.0 % (1 person) of cases respectively, and in patients with the spontaneous myeloproliferative process – in 8.1 % (9 persons) and 1.8 % (2 people) of episodes respectively. The difference in the prevalence of increased spleen and liver sizes in patients with radiation-associated (1 of 7 vs. 0 of 3;  $p = 1.000$  and 1 of 7 vs. 0 of 3;  $p = 1.000$ ), and spontaneous (6 of 78 vs. 3 of 33;  $p = 1.000$  and 2 of 78 vs. 0 of 33;  $p = 1.000$ ) ET with the presence and absence the *JAK2V617F* mutation were not observed.

An increase was observed of the average value of erythrocytes ( $p = 0.00005$ ), hemoglobin ( $p = 0.003$ ), mean corpuscular volume (MCV) ( $p = 0.031$ ) and a decrease of erythrocyte sedimentation rate (ESR) ( $p = 0.026$ ) in patients with spontaneous ET and with the *JAK2V617F* mutation over that of patients without the mutation. There was found a greater number of average quantities of leukocytes in the *JAK2V617F*-positive patients with radiation-associated ET, compared to the *JAK2V617F*-negative persons ( $p = 0.048$ ) (Table 3).

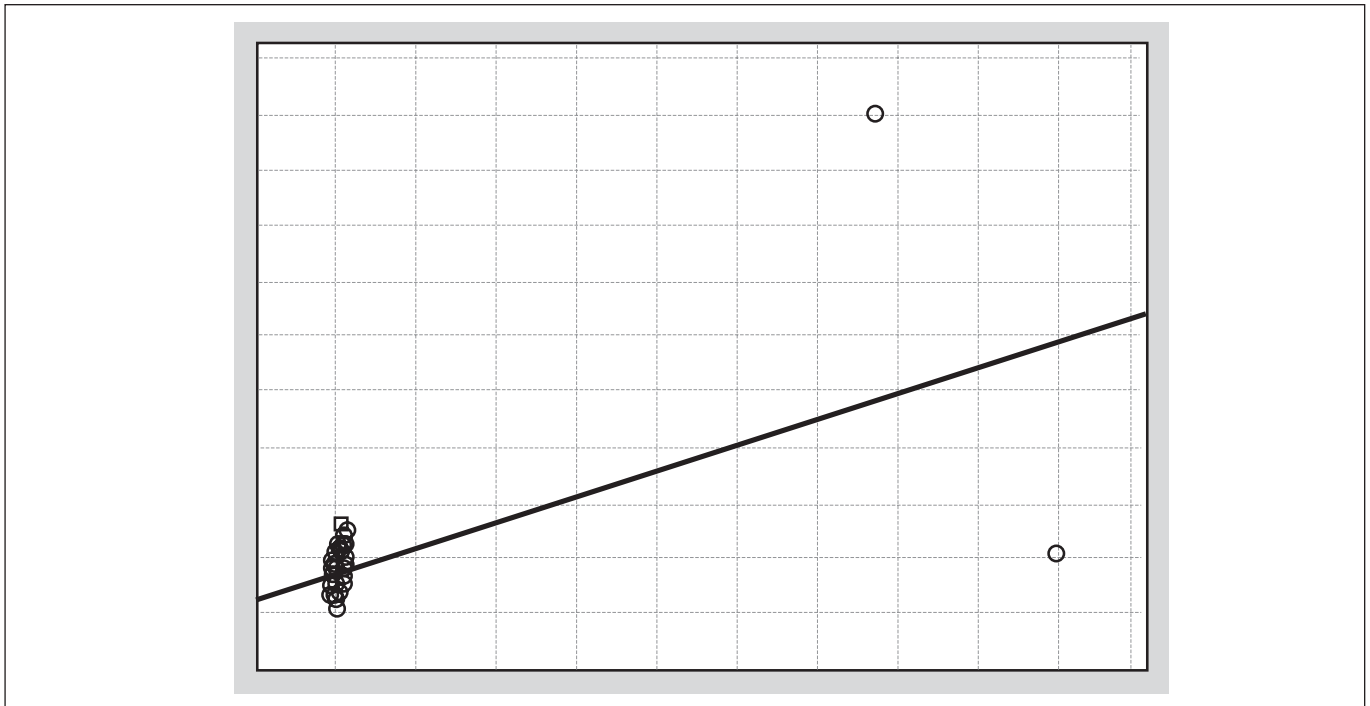
**Таблиця 3**
**Результати дослідження показників периферійної крові хворих на ЕТ**
**Table 3**
**The results of the study of peripheral blood in ET patients**

Показник Parameter	Показники загальноклінічного аналізу периферійної крові хворих на ЕТ Parameters of total blood test in ET patients			
	із радіаційним анамнезом with radiation anamnesis (n = 10)		без радіаційного анамнезу without radiation anamnesis (n = 111)	
	<i>JAK2V617F</i> -позитивні, <i>JAKV617F</i> -positive, n = 7	<i>JAK2V617F</i> -негативні, <i>JAKV617F</i> -negative, n = 3	<i>JAK2V617F</i> -позитивні, <i>JAKV617F</i> -positive, n = 78	<i>JAK2V617F</i> -негативні, <i>JAKV617F</i> -negative, n = 33
Еритроцити, $\times 10^{12}$ /л Erythrocytes, $\times 10^{12}$ /l	4,63 $\pm$ 0,37	4,18 $\pm$ 0,52	5,31 $\pm$ 0,51*	4,59 $\pm$ 0,44
Гемоглобін, г/л Hemoglobin, g/l	134,20 $\pm$ 12,93	140,00 $\pm$ 13,00	144,08 $\pm$ 15,32*	127,34 $\pm$ 33,59
Гематокрит, % Hematocrit, %	40,00 $\pm$ 1,19	42,65 $\pm$ 1,90	45,82 $\pm$ 17,77	40,87 $\pm$ 4,56
Ретикулоцити, % Reticulocytes, %	0	0	0	0
MCV, фл MCV, fl	84,00 $\pm$ 2,82	87,80 $\pm$ 0,14	87,60 $\pm$ 6,66*	80,10 $\pm$ 10,62
Тромбоцити, $\times 10^9$ /л Thrombocytes, $\times 10^9$ /l	778,66 $\pm$ 293,31	710,21 $\pm$ 172,36	867,67 $\pm$ 302,86	973,60 $\pm$ 411,00
Лейкоцити, $\times 10^9$ /л Leukocytes, $\times 10^9$ /l	12,84 $\pm$ 4,05*	10,48 $\pm$ 1,48	10,17 $\pm$ 2,96	9,88 $\pm$ 2,00
Бласти, % Blast cell, %	0	0	0	0
Промієлоцити, % Promyelocyte, %	0	0	0	0
Мієлоцити, % Myelocyte, %	0	0	0	0
Метамієлоцити, % Metamyelocyte, %	0	0	0	0
Палички, % Banded neutrophils, %	3,00 $\pm$ 2,70	1,66 $\pm$ 2,70	3,51 $\pm$ 3,48	3,29 $\pm$ 3,07
Сегменти, % Segmented neutrophils, %	69,82 $\pm$ 7,18	64,43 $\pm$ 2,15	63,93 $\pm$ 12,65	64,00 $\pm$ 6,59
Еозинофіли, % Eosinophils, %	2,50 $\pm$ 1,19	2,03 $\pm$ 2,62	5,41 $\pm$ 15,73	2,30 $\pm$ 1,60
Базофіли, % Basophils, %	1,10 $\pm$ 1,43	0,90 $\pm$ 0,12	0,73 $\pm$ 0,98	0,66 $\pm$ 1,63
Лімфоцити, % Lymphocytes, %	13,40 $\pm$ 8,56	23,36 $\pm$ 2,21	22,54 $\pm$ 14,87	22,66 $\pm$ 6,77
Моноцити, % Monocytes, %	11,40 $\pm$ 8,73	7,58 $\pm$ 3,26	9,36 $\pm$ 14,90	6,27 $\pm$ 3,92
ШОЕ, мм/ч ESR, mm/h	7,80 $\pm$ 5,16	6,00 $\pm$ 1,41	6,41 $\pm$ 4,88*	12,00 $\pm$ 12,87

Примітки. \*  $p < 0,05$  між середніми значеннями показника периферійної крові хворих на ЕТ із *JAK2V617F* мутацією та без неї в одній групі відповідно до радіаційного анамнезу.  
Notes. \*  $p < 0.05$  between average value of peripheral blood of ET patients with the *JAK2V617F* mutation and without it in the same group according to radiation anamnesis.

Крім того, у групі *JAK2V617F*-позитивних хворих на ЕТ, які не зазнали впливу аварійного радіаційного опромінення, за допомогою регресійного аналізу виявлено лінійну залежність між кількістю лейкоцитів та еритроцитів ( $R^2 = 0,4$ ;  $F(1,5) = 10,6$ ;  $p = 0,001$ ) (рис. 2).

In the group of *JAK2V617F*-positive ET patients who are not exposed to radiation emergency, using the help of the regression analysis, a linear relationship between the number of white blood and red blood cells was revealed ( $R^2 = 0.4$ ;  $F(1.5) = 10.6$ ;  $p = 0.001$ ) (Fig. 2).



**Рисунок 2.** Лінійна діаграма розсіяння з регресійною прямою величини лейкоцитів та кількості еритроцитів периферійної крові у неопромінених хворих на ЕТ

**Figure 2.** The linear diagram of the dispersion with a straight regression line of the amount of leukocytes and erythrocytes of peripheral blood in spontaneous ET patients

Проаналізовано гістоморфологічні характеристики *JAK2V617F*-позитивних та *JAK2V617F*-негативних пацієнтів з ЕТ. Виявлено, що у хворих на спонтанну ЕТ з наявністю мутації V617F гена *JAK2* спостерігалось превалювання помірної гіперклітинності КМ ( $p = 0,010$ ), гігантських та крупних форм МГКЦ ( $p = 0,003$ ), ретикулінового фіброзу ( $p = 0,033$ ), мікроциркуляторних порушень ( $p = 0,044$ ), ніж у пацієнтів без неї (табл. 4).

Histomorphological characteristics of *JAK2V617F*-positive and *JAK2V617F*-negative patients with ET were analyzed. It was revealed that in patients with spontaneous ET and presence of the *JAK2V617F* mutation, the prevalence of moderate hypercellularity of BM ( $p = 0.010$ ), large and giant forms of MGKC ( $p = 0.003$ ), reticulin fibrosis ( $p = 0.033$ ), microcirculation disorders ( $p = 0.044$ ), than in those without it, was observed (Table 4).

## ВИСНОВКИ

1. *JAK2V617F*-позитивний мутаційний статус хворих на спонтанну ЕТ є предиктором збільшення розповсюдженості тромбозів (23,0 % проти 6,0 %), ризику їх виникнення (ВР = 1,5; 95 % ДІ = 1,3–1,8) та скорочення тривалості безтромботичної виживаності. Доведено, що наявність *JAK2V617F* мутації підвищує ймовірність виникнення венозних тромбозів (ВР = 1,5; 95 % ДІ = 1,30–1,7) у хворих на спонтанну ЕТ та не впливає на ризик розвитку артеріальних кардіоваскулярних подій.
2. Урахування *JAK2V617F* мутаційного статусу хворих на спонтанну та радіаційно-асоційовану ЕТ (ППК = 0,62 та ППК = 0,68 відповідно) характеризується середнім рівнем ефективності щодо прогнозування тромбозів. Носійство *JAK2V617F* мутації хворими на спонтанну та радіаційно-

## CONCLUSIONS

1. The *JAK2V617F*-positive mutation status in patients with spontaneous ET is the predictor of increases in distribution of thrombosis (23.0 % vs. 6.0 %), risk of it developing (RR = 1.5; 95 % CI = 1.3– 1.8) and decrease of survival without thrombosis. It has been proved, that a presence of the *JAK2V617F* mutation increases the probability of venous thrombosis occurrence (RR = 1.5; 95 % CI = 1.30–1.7) in patients with spontaneous ET but does not affect the risk of arterial cardiovascular events.
2. The use of the *JAK2V617F* mutation status of patients with spontaneous and radiation-associated ET (AUC = 0.62 and AUC = 0.68 respectively) complies with the average power marker for the prediction of thrombosis. The carriage of the *JAK2V617F* mutation in patients with sponta-

## Таблиця 4

Гістоморфологічні показники трепанобіоптату у хворих на ЕТ

Table 4

The histomorphological characteristics of trepanobiopstat samples of ET patients

Показник Parameter	Гістоморфологічні показники трепанобіоптату у хворих на ЕТ The histomorphological characteristics of trepanobiopstat samples of ET patients			
	із радіаційним анамнезом with radiation anamnesis (n = 10)		без радіаційного анамнезу without radiation anamnesis (n = 111)	
	JAK2V617F-позитивні, JAK2V617F-positive, n = 7	JAK2V617F-негативні, JAK2V617F-negative, n = 3	JAK2V617F-позитивні, JAK2V617F-positive, n = 78	JAK2V617F-негативні, JAK2V617F-negative, n = 33
Помірна гіперклітинність КМ Moderate hypercellularity of BM	2 (28,57%)	0	24 (86,1 %)*	3 (21,9 %)
Гіперплазія мієлоїдного паростка Hyperplasia of myeloid lineage	0	0	2 (2,6 %)	0
Гіперплазія МГКЦ паростка Hyperplasia MGKC lineage	7 (100 %)	3 (100 %)	70 (88,6 %)	33 (100 %)
Гігантські та крупні МГКЦ Giant and large MGKC	6 (85,7 %)	3 (100 %)	44 (56,4 %)*	8 (24,2 %)
Плеоморфізм МГКЦ Pleomorphic MGKC	0	0	3 (3,8 %)	1 (3,0 %)
Гіперлобулярні ядра Hyperlobular nucleus	6 (85,7 %)	2 (66,6 %)	60 (76,9 %)	20 (60,6 %)
Гіполобулярні ядра Hypolobular nucleus	0	0	0	1 (3,0 %)
Гіпохромія ядер Hypochromic nucleus	0	0	2 (2,6 %)	0
Гіперхромія ядер Hyperchromic nucleus	4 (57,1 %)	1 (33,3 %)	3 (3,8 %)	2 (6,0 %)
Ретикуліновий фіброз Reticulin fibrosis	3 (42,8 %)	1 (33,3 %)	25 (32,0 %)*	4 (2,4 %)
Колагеновий фіброз Collagen fibrosis	0	0	6 (7,7 %)	1 (3,0 %)
Щільні кластери МГКЦ Dense cluster MGKC	1 (14,3 %)	0	9 (11,5 %)	1 (3,0 %)
Нещільні кластери МГКЦ Loose cluster MGKC	7 (100 %)	2 (66,6 %)	52 (66,6 %)	17 (51,5 %)
Мікроциркуляторні порушення Microcirculation disorders	1 (14,3 %)	0	21 (26,9 %)*	3 (9,1 %)

Примітки. \*  $p < 0,05$  між показниками гістоморфологічного дослідження трепанобіоптату у хворих на ЕТ із JAK2V617F мутацією та без неї в одній групі відповідно до радіаційного анамнезу.

Notes. \*  $p < 0.05$  between histomorphological characteristics of histological samples of trepanobiopstat of ET patients with JAK2V617F mutation and without it in the same group according to radiation anamnesis.

асоційовану ЕТ характеризується високим (93,9 % та 100 % відповідно) значенням ПЦНР для оцінки ймовірності виникнення тромбозів, проте низьким (23,1 % та 28,6 % відповідно) показником ПЦПР.

3. У хворих на спонтанну ЕТ із JAK2V617F мутацією визначено більше середнє значення еритроцитів  $((5,31 \pm 0,51) \times 10^{12} / \text{л}$  проти  $(4,59 \pm 0,44) \times 10^{12} / \text{л}$ ), гемоглобіну  $((144,08 \pm 15,32) \text{ г/л}$  проти  $(127,34 \pm 33,59) \text{ г/л}$ ), MCV  $((87,60 \pm 6,66) \text{ фл}$  проти  $(80,10 \pm 10,62) \text{ фл}$ ) та менший показник ШОЕ  $((6,41 \pm 4,8) \text{ мм/г}$  проти  $(12,00 \pm 12,87) \text{ мм/г}$ ), ніж у пацієнтів

neous and radiation-associated ET is characterized by a higher (93.9 % and 100 % accordingly) indicator of PVNR to determine of the risk of thrombosis, however lower (23.1 % and 28.6 % respectively) indicators of PVPR.

3. An increase was observed in the average value of erythrocytes  $((5.31 \pm 0.51) \times 10^{12} / \text{l}$  vs.  $(4.59 \pm 0.44) \times 10^{12} / \text{l}$ ), hemoglobin  $((144.08 \pm 15.32) \text{ g/l}$  vs.  $(127.34 \pm 33.59) \text{ g/l}$ ), MCV  $((87.60 \pm 6.66) \text{ fl}$  vs.  $(80.10 \pm 10.62) \text{ fl}$ ) and a decrease of ESR  $((6.41 \pm 4.8) \text{ mm/g}$  vs.  $(12.00 \pm 12.87) \text{ mm/g}$ ), in patients with spontaneous ET and with the JAK2V617F mutation vs.

без неї. У *JAK2V617F*-позитивних хворих на спонтанну ЕТ виявлено лінійну залежність між кількістю лейкоцитів та еритроцитів –  $F(1,52) = 10,60$ .

4. У пацієнтів із радіаційно-асоційованою ЕТ та *JAK2V617F*-позитивним мутаційним статусом виявлено превалювання середньої кількості лейкоцитів у порівнянні з *JAK2 V617F*-негативними хворими ( $(12,84 \pm 4,05) \times 10^9$  /л проти  $(10,48 \pm 1,48) \times 10^9$  /л).

5. У трепанобіоптаті хворих на спонтанну ЕТ з наявністю мутації V617F гена *JAK2*, порівняно з пацієнтами без неї, визначено превалювання помірної гіперклітинності кісткового мозку (86,1 % проти 21,9 %), гігантських та крупних форм МГКЦ (56,4 % проти 24,2 %), ретикулінового фіброзу (32,0 % проти 2,4 %) та мікроциркуляторних порушень (26,9 % проти 9,1 %).

patients with no mutation. A linear relationship between the number of white blood and red blood cells was revealed ( $F(1.52) = 10.60$ ) in the group of *JAK2V617F*-positive patients with spontaneous ET.

4. A greater number of average quantities of leukocytes in *JAK2V617F*-positive patients with radiation-associated ET were found when compared to *JAK2V617F*-negative persons ( $(12.84 \pm 4.05) \times 10^9$  /l vs.  $(10.48 \pm 1.48) \times 10^9$  /l).

5. It was revealed that in patients with spontaneous ET and a presence of the *JAK2V617F* mutation, the prevalence of moderate hypercellularity of BM (86.1 % vs. 21.9 %), large and giant forms of MGKC (56.4 % vs. 24.2 %), reticulin fibrosis (32.0 % vs. 2.4 %) and microcirculation disorders (26.9 % vs. 9.1 %), was observed than in those without it.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long term complication rates, and prognostic factors / A. P. Wolanskyj, S. M. Schwager, R. F. McClure [et al.] // Mayo. Clin. Proc. – 2006. – Vol. 81, No. 2. – P. 159–166.
- Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post ET MF), blast phase PMF (PMF BP): consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG MRT) / R. A. Mesa, S. Verstovsek, F. Cervantes [et al.] // Leuk. Res. – 2007. – Vol. 31, No. 6. – P. 737–740.
- Epigenetic inactivation of suppressors of cytokine signalling in Philadelphia-negative chronic myeloproliferative disorders / D. Capello, C. Deambrogi, D. Rossi [et al.] // Br. J. Haematol. – 2008. – Vol. 141, No. 4. – P. 504–511.
- Two domains of the erythropoietin receptor are sufficient for Jak2 binding/activation and function / S. Pelletier, S. Gingras, M. Funakoshi-Tago [et al.] // Mol. Cell. Biol. – 2006. – Vol. 26(22). – P. 8527–8538.
- Activated Jak2 with the V617F point mutation promotes G1/S phase transition / C. Walz, B. J. Crowley, H. E. Hudon [et al.] // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281(26). – P. 18177–18183.
- Gaikwad A. Study of two tyrosine kinase inhibitors on growth and signal transduction in polycythemia vera / A. Gaikwad, J. T. Orchal // Exp. Hematol. – 2007. – Vol. 35, No. 11. – P. 1647–1656.
- New insights into the pathogenesis of *JAK2 V617F*-positive myeloproliferative disorders and consequences for the management of patients / J. L. Villeval, C. James, D. F. Pisani [et al.] // Semin. Thromb. Hemost. – 2006. – Vol. 32, No. 4. – P. 341–351.
- Clinical correlates of *JAK2V617F* allele burden in essential thrombocythemia / J. Kittur, R. A. Knudson, T. L. Lasho [et al.] // Cancer – 2007. – Vol. 109, No. 11. – P. 2279–2284.
- Influence of *JAK2V617F* allele burden on phenotype in essential thrombocythemia / E. Antonioli, P. Guglielmelli, G. Poli [et al.] // Haematologica – 2008. – Vol. 93, No. 1. – P. 41–48.

## REFERENCES

- Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long term complication rates, and prognostic factors. Mayo Clin Proc. 2006;81(2):159-66.
- Mesa RA, Verstovsek S, Cervantes F, Barosi G, Reilly JT, Dupriez B, et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post ET MF), blast phase PMF (PMF BP): consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG MRT). Leuk Res. 2007;31(6):737-40.
- Capello D, Deambrogi C, Rossi D, Lischetti T, Piranda D, Cerri M, et al. Epigenetic inactivation of suppressors of cytokine signalling in Philadelphia-negative chronic myeloproliferative disorders. Br. J. Haematol. 2008;141(4):504-11.
- Pelletier S, Gingras S, Funakoshi-Tago M, Howell S, Ihle JN. Two domains of the erythropoietin receptor are sufficient for Jak2 binding/activation and function. Mol Cell Biol. 2006;26(22):8527-38.
- Walz C, Crowley BJ, Hudon HE, Gramlich JL, Neuberg DS, Podar K, et al. Activated Jak2 with the V617F point mutation promotes G1/S phase transition. J Biol Chem. 2006;281(26):18177-83.
- Gaikwad A, Orchal JT. Study of two tyrosine kinase inhibitors on growth and signal transduction in polycythemia vera. Exp Hematol. 2007;35(11):1647-56.
- Villeval JL, James C, Pisani DF, Casadevall N, Vainchenker W. New insights into the pathogenesis of *JAK2 V617F*-positive myeloproliferative disorders and consequences for the management of patients. Semin Thromb Hemost. 2006;32(4):341-51.
- Kittur J, Knudson RA, Lasho TL, Finke CM, Gangat N, Wolanskyj AP, et al. Clinical correlates of *JAK2V617F* allele burden in essential thrombocythemia. Cancer. 2007;109(11):2279-84.

10. Risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera according to JAK2V617F mutation status / G. Finazzi, A. Rambaldi, V. Guerini [et al.] // *Haematologica*. – 2007. – Vol. 92, No. 1. – P. 135–136.
11. 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.
12. Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients / A. Carobbio, J. Thiele, F. Passamonti [et al.] // *Blood*. – 2011. – Vol. 117(22). – P. 5857–5859.
13. Tefferi A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms / A. Tefferi, J. Vardiman // *Leukemia*. – 2008. – Vol. 22, No. 1. – P. 14–22.
14. Орлов А. И. Прикладная статистика : учебник / А. И. Орлов. – М. : Экзамен, 2004. – 656 с.
9. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, et al. Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2008;93(1):41-8.
10. Finazzi G, Rambaldi A, Guerini V, Carobbo A, Barbui T. Risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera according to JAK2V617F mutation status. *Haematologica*. 2007;92(1):135-6.
11. Tefferi A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2013;88(6):507-16.
12. Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Ruggeri M, Rodeghiero F, et al. Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. *Blood*. 2011;117(22):5857-9.
13. Tefferi A, Vardiman J. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008;22(1):14-22.
14. Orlov AI. [Applied statistics: a tutorial]. Moscow: Ekzamen; 2004. 656 p. Russian.

*Стаття надійшла до редакції 24.09.2015*

*Received: 24.09.2015*