ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ГЕМАТОЛОГИИ И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»

На правах рукописи

Корсакова Наталья Евгеньевна

ОСОБЕННОСТИ ПРОТРОМБОТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА ПРИ PH-НЕГАТИВНЫХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

14.01.21 - гематология и переливание крови

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
Заслуженный деятель науки РФ
доктор медицинских наук, профессор
Бессмельцев Станислав Семёнович,
кандидат биологических наук
Головина Ольга Георгиевна

Санкт-Петербург - 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ…….4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ……...10
1.1 Ph-негативные миелопролиферативные новообразования: характеристика, патогенез, осложнения……..……..……10
1.1.1 Истинная полицитемия……10
1.1.2 Эссенциальная тромбоцитемия……..11
1.1.3 Первичный миелофиброз…….……...12
1.1.4 Тромбозы как одно из основных осложнений Ph-негативных МПН…….…….13
1.1.5 Молекулярно-генетические механизмы развития Ph-негативных МПН…….…….....15
1.2 Особенности системы гемостаза при Ph-негативных МПН…….19
1.2.1 Состояние плазменного звена гемостаза у пациентов с Ph-негативными МПН….……..19
1.2.1.1 Особенности коагуляционного гемостаза у больных Ph-негативными МПН……..19
1.2.1.2 Естественные антикоагулянты у пациентов с Ph-негативными МПН……...……21
1.2.1.3 АПС-резистентность у пациентов с Ph-негативными МПН……...……23
1.2.1.4 Особенности плазменного гемостаза при Ph-негативных МПН, выявляемые с помощью интегрального теста генерации тромбина……...……..24
1.2.2 Особенности тромбоцитарного звена гемостаза при Ph-негативных МПН…….....27
1.2.3 Состояние эндотелия при Ph-негативных МПН…….……..31
1.2.3.1 Функциональная диагностика изменений эндотелия при Ph-негативных МПН……..32
1.2.3.2 Биохимические маркеры активации и повреждения эндотелия при Ph-негативных МПН……..……..……34
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ……...41
2.1 Характеристика обследованной группы пациентов……..41
2.2 Преаналитическая подготовка…….……42
2.3 Методы исследования……...43
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ……..48
3.1 Исследование плазменного звена гемостаза у пациентов с Ph-негативными МПН……..48
3.1.1 Особенности плазменного звена гемостаза, характеризующие пациентов с Ph-негативными МПН……48
3.1.2 Особенности плазменного звена гемостаза, характерные для пациентов с различными нозологическими формами Ph-негативных МПН……...…..51
3.1.3 Особенности плазменного звена гемостаза пациентов с Ph-негативными МПН в зависимости от наличия тромбозов в анамнезе……..……...…….55
3.1.4 Особенности плазменного звена гемостаза пациентов с Ph-негативными МПН

в зависимости от мутационного статуса и аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F……..…59
3.1.5 Особенности плазменного звена гемостаза пациентов с Ph-негативными МПН
в зависимости от получаемой терапии…….……...63
3.1.6 Оценка гемостатического баланса у пациентов с Ph-негативными МПН…….……77
3.2 Исследование тромбоцитарного звена гемостаза у пациентов с Ph-негативными МПН…..80
3.3 Оценка эндотелиальной дисфункции у пациентов с Ph-негативными МПН……..90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ……..…….108
ВЫВОДЫ…….131
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ…….133
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ……..134
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ……...……137

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Тромботические осложнения занимают важное место в современной медицине, что обусловлено их высокой встречаемостью в популяции, а также существенной долей в структуре смертности населения. Тромбозы – одно из наиболее частых осложнений Ph-негативных миелопролиферативных новообразований (Ph(-)МПН) и ведущая причина смерти пациентов с этими заболеваниями, занимающая, по данным литературы, 35–70% в структуре смертности больных, что делает тромбозы наиболее важным фактором риска, влияющим на выживаемость [38]. Ph(-)МПН представляют собой группу заболеваний клональной природы, для которых характерна аномальная пролиферация миелоидного ростка кроветворения и соединительнотканных структур костного мозга. Классические формы Ph(-)МПН включают истинную полицитемию (ИП), эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ) и первичный миелофиброз (ПМФ). По данным ряда авторов, частота возникновения тромбоэмболических осложнений при ИП составляет 3,8 на 100 пациентов в год, при ЭТ – 2–4 на 100 пациентов в год, а при ПМФ – 2,23 на 100 пациентов в год, что существенно превышает частоту встречаемости тромбоэмболических событий в общей популяции [90, 94, 97, 208, 215]. Повышенная склонность к развитию тромботических осложнений вносит существенный вклад в ухудшение качества и сокращение продолжительности жизни больных.

В основе предполагаемого патогенетического механизма развития тромбозов при ИП и ЭТ лежит повышение как количества циркулирующих клеток крови (тромбоцитов, эритроцитов и лейкоцитов), происходящих от клональных гемопоэтических клеток-предшественников, приводящее к повышению вязкости крови, так и степени их активации с экспрессией протромботических факторов: продукции прокоагулянтов и протеолитических ферментов, секрецией провоспалительных цитокинов и экспрессией молекул клеточной адгезии. Повышенная вязкость крови и протеазы активированных лейкоцитов могут вызывать активацию и повреждение сосудистого эндотелия, что приводит к активации коагуляции. При ПМФ выявляются сходные изменения активационного статуса тромбоцитов, лейкоцитов, эндотелия и системы гемостаза.

Несмотря на многочисленные свидетельства активации свертывания крови при Ph-негативных МПН, коагуляционные тесты, применяемые для обследования пациентов в клинической практике, не всегда отражают имеющиеся изменения. В то же время вопрос диагностики протромботических состояний больных Ph(-)МПН весьма актуален для профилактики и своевременного предупреждения тромботических осложнений, что требует

комплексной оценки для выявления показателей, отражающих протромботическую направленность изменений в системе гемостаза у пациентов с Ph-негативными МПН.

Степень разработанности темы

Активация коагуляции у пациентов с Ph-негативными МПН в основном продемонстрирована при помощи различных исследовательских методик, которые не могут быть применимы в клинической практике для персонализированной оценки тромботического риска больных [46, 70, 102, 103, 104, 119, 144]. Имеющиеся в литературе данные по исследованию показателей системы гемостаза больных Ph(-)МПН весьма противоречивы и часто выявляют разнонаправленные изменения. В качестве плазменных детерминант развития протромботических состояний у пациентов с Ph(-)МПН авторы отмечают снижение чувствительности к активированному протеину С и тромбомодулину, а также снижение активности естественных антикоагулянтов, однако по присутствию указанных особенностей у пациентов различных нозологий, а также влиянию на них факторов риска развития тромбозов при Ph(-)МПН, а именно, тромботического анамнеза и мутации JAK2 V617F, между различными работами обнаруживаются противоречия [51, 57, 88, 99, 121, 156, 158, 167, 198, 204, 206, 217]. Сходным образом, не всегда однозначны имеющиеся литературные данные по выявлению эндотелиальной дисфункции у больных Ph(-)МПН [33, 43, 46, 72, 83, 84, 100, 104, 131, 147, 150, 154, 156, 158, 160, 180]. Кроме того, в исследованиях весьма скудно освещён вопрос влияния терапии, получаемой пациентами, на показатели гемостаза при данных заболеваниях.

Цель исследования

Установить особенности, характеризующие протромботическую направленность системы гемостаза, и предложить новый подход к оценке нарушений гемостатического баланса у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями.

Задачи исследования

1. Оценить параметры, характеризующие состояние плазменного звена гемостаза у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями.
2. Изучить особенности состояния тромбоцитарного звена гемостаза у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями.
3. Определить степень выраженности эндотелиальной дисфункции у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями.

4. Разработать подходы к оценке протромботической направленности изменений в системе гемостаза при Ph-негативных миелопролиферативных новообразованиях.

Научная новизна

Впервые для оценки степени нарушения гемостатического баланса предложен расчётный показатель – индекс коагуляции, определяемый по параметрам теста генерации тромбина.

Показано, что для больных Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями характерно увеличение активности антитромбина относительно значений здоровых лиц.

Впервые у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями выявлена взаимосвязь мутации JAK2 V617F с активностью естественных антикоагулянтов, проявляющаяся снижением активности антитромбина у JAK2 V617F-позитивных больных относительно значений носителей аллеля дикого типа.

У пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями впервые установлена обратная корреляционная связь уровней фактора Виллебранда и растворимого тромбомодулина с активностью протеина С и чувствительностью к тромбомодулину, что указывает на прямую вовлеченность эндотелиальной дисфункции в развитие протромботического состояния.

Впервые показано, что терапия пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями циторедуктивными и таргетными препаратами способствует усугублению прокоагулянтных изменений плазменного звена гемостаза и эндотелиальной дисфункции.

Теоретическая и практическая значимость исследования

В исследовании проведена комплексная оценка системы гемостаза у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями и выявлены особенности, характеризующие протромботическую направленность изменений плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза, а также выраженность дисфункции эндотелия.

Установлено, что наличие мутации JAK2 V617F у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями сопровождается уменьшением активности антитромбина относительно носителей аллеля дикого типа. Повышение аллельной нагрузки данной мутации коррелирует с падением активности и уровня естественных антикоагулянтов системы протеина С.

Предложен показатель индекса коагуляции, позволяющий осуществить персонализированный подход к выявлению нарушений гемостатического баланса у больных Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями.

Методология и методы исследования

Научная методология была основана на системном подходе к оценке системы гемостаза. В работе использованы клинические, биохимические, коагулологические, иммуноферментные, инструментальные, молекулярно-генетические и статистические методы исследования. Набор использованных методов исследования соответствует современному методологическому уровню обследования пациентов с Ph-негативными МПН. Применённые методы статистической обработки данных отвечают поставленной цели и задачам исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Протромботическая направленность изменений плазменного звена гемостаза у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями зависит от нарушения гемостатического баланса, обусловленного главным образом несостоятельностью антикоагулянтной системы протеина С.
2. Высокая функциональная активность тромбоцитов у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией и истинной полицитемией, не получающих лечения, проявляется in vitro ростом параметров агрегации под действием коллагена и ристоцетина. О повышении агрегационной активности тромбоцитов у больных первичным миелофиброзом, не получающих лечения, свидетельствует лишь тенденция к увеличению параметров агрегации под действием ристоцетина.
3. Для пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями характерна эндотелиальная дисфункция, обусловленная нарушением гемостатической и/или вазомоторной функций эндотелия.
4. Наличие мутации JAK2 V617F у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями ассоциируется с уменьшением активности антитромбина относительно значений носителей аллеля дикого типа. Аллельная нагрузка данной мутации связана обратной корреляционной связью с активностью протеина С и уровнем свободного протеина S.
5. Эндотелиальная дисфункция, сопровождающаяся прокоагулянтными изменениями плазменного звена гемостаза и увеличением функциональной активности тромбоцитов, определяет протромботическую направленность системы гемостаза у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность и обоснованность полученных результатов научной работы обусловлена детальным теоретическим анализом проблемы, необходимым объёмом проведённых исследований, характеризующих систему гемостаза, и адекватным статистическим анализом данных.

По теме диссертации опубликовано 32 печатных работы, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, из них 2 - в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для опубликования научных результатов диссертации на соискание учёной степени кандидата и доктора биологических наук по специальности 14.01.21 - гематология и переливание крови.

Материалы диссертации представлены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2019), Научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы клинической гематологии» (Санкт-Петербург, 2019), ISTH Virtual Congress (2021), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы трансфузиологии, онкогематологии и клеточной терапии» (Киров, 2021), II-й Научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2021), 23rd European Hematology Association Congress (Stockholm, 2018), 64th Meeting of Scientific and Standartization Committee (SSC) of the ISTH (Dublin, 2018), Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis совместно с 9-ой Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии (Санкт-Петербург, 2018), XXVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (Melbourne, 2019), ISTH Virtual Congress (2020), 10 Юбилейной всероссийской конференции по клинической гемостазиологии и гемореологии «Российский форум по тромбозу и гемостазу» (2020), ISTH Virtual Congress (2021), Российском Форуме по Тромбозу и Гемостазу (Москва, 2022).

Личный вклад автора

Автором выполнялись: формирование выборки, сбор анамнестических данных обследуемых лиц, проведение коагулологических исследований, в том числе определение показателей плазменного звена гемостаза и уровня растворимых маркеров эндотелиальной дисфункции, а также неинвазивной оценки функции эндотелия у больных Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями, анализ источников литературы, сбор и последующий статистический анализ данных, интерпретация полученных результатов.

Материалы, представленные в диссертации, получены, обобщены, статистически обработаны и проанализированы автором лично.

Структура и объём работы

Диссертационная работа представлена на 153 страницах печатного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3-х глав с изложением собственных результатов исследования, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, который включает 217 источников (13 отечественных и 204 зарубежных). Работа содержит 5 рисунков и 56 таблиц.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ph-негативные миелопролиферативные новообразования: характеристика, патогенез, осложнения

Миелопролиферативные новообразования (МПН) – группа редких заболеваний клональной природы, для которых характерна аномальная пролиферация гематопоэтических стволовых клеток миелоидного ростка кроветворения и соединительнотканных структур костного мозга, приводящая к увеличению количества зрелых клеток одной или нескольких линий дифференцировки [2, 175]. Классические, определяемые также как Philadelphia (Ph)-негативные, МПН (Ph(-)МПН) включают истинную полицитемию (ИП), эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ) и первичный миелофиброз (ПМФ). Их определяет отсутствие укороченной 22-й филадельфийской хромосомы, участвующей в образовании химерного гена BCR-ABL и характерной для хронического миелолейкоза [2, 189, 194]. Группа Ph-негативных МПН имеет сходный механизм патогенеза и ряд общих симптомов, в то же время для каждой формы патологии характерно определенное сочетание клинических проявлений, особенностей течения и лабораторных данных.

1.1.1 Истинная полицитемия

Истинная полицитемия (ИП) — миелопролиферативное новообразование, для которого характерна повышенная пролиферация миелоидных ростков кроветворения, в большей степени эритроидного, что постепенно приводит к развитию очагов экстрамедуллярного кроветворения (спленомегалии) и риску развития сосудистых осложнений. Начальная стадия заболевания характеризуется гиперплазией клеточного состава костного мозга. В периферической крови наблюдается умеренное повышение количества циркулирующих эритроцитов и уровня гемоглобина при нормальных уровнях лейкоцитов и тромбоцитов. Увеличение вязкости крови приводит к повышению артериального давления и возникновению симптоматической артериальной гипертензии или ухудшению течения гипертонической болезни. Также усугубляются течение ишемической болезни сердца, цереброваскулярной болезни и другие патологические состояния, связанные с нарушением микроциркуляции, приводя к развитию тромботических осложнений [1, 5]. В дальнейшем прогрессивно увеличивается масса циркулирующих эритроцитов – нарастают число эритроцитов, уровень гемоглобина и гематокрит. При последующем развитии заболевания в периферической крови увеличивается количество лейкоцитов за счет нейтрофилов, нарастает тромбоцитоз. В костном мозге

наблюдается расширение всех ростков миелоидного кроветворения с прогрессированием панмиелоза (тотальной трехростковой гиперплазии). Увеличиваются размеры селезенки и печени, первоначально за счет накопления избыточной клеточной массы, а затем вследствие их миелоидной метаплазии. С нарастанием выраженности отклонений показателей крови возрастает частота и тяжесть тромботических проявлений [1, 5]. Тем самым, основные риски при ИП представляют нарушения кровообращения, проявляющиеся расстройствами микроциркуляции и тромбозами различной локализации, особенно на фоне сердечно-сосудистой патологии и атеросклероза [2]. Длительная пролиферация патологических гемопоэтических клеток сопровождается фиброзом и замещением костного мозга волокнами коллагена – развитием вторичного постполицитемического миелофиброза [1, 5]. Другим вариантом исхода ИП является бластная трансформация заболевания и развитие бластного криза [2, 5, 215].

1.1.2 Эссенциальная тромбоцитемия

Эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) - заболевание клональной неопластической природы, которое характеризуется гиперплазией мегакариоцитарного ростка костного мозга, персистирующим тромбоцитозом и предрасположенностью к тромбозам и/или кровотечениям [1, 4, 6]. Начало заболевания часто бывает бессимптомным. На первоначальном этапе развития происходит постепенное увеличение опухолевой массы. Характерным признаком ЭТ является гипертромбоцитоз с числом тромбоцитов, достигающим 1000-3000*10^9/л. Тромбоциты в периферической крови больных ЭТ могут значительно варьировать в размерах, встречается их атипия с наличием гигантских форм, которые могут превышать размеры эритроцитов [2, 4, 123]. В клинической картине крови в начале заболевания уровень гемоглобина нормальный или даже повышен. Число лейкоцитов в норме или незначительно повышено. При длительном течении заболевания может наступить исход ЭТ во вторичный посттромбоцитемический миелофиброз, в результате которого происходит замещение кроветворного костного мозга фиброзом и миелосклерозом, что приводит к уменьшению клеточности и продукции гемопоэтических ниш, сопровождающимся снижением показателей крови [4]. При длительности заболевания более 10 лет увеличивается вероятность развития бластного криза [2, 74, 128, 163]. Клинические проявления ЭТ включают сосудистые осложнения (нарушения микроциркуляции, тромбозы артериальных и венозных сосудов, в том числе брыжеечных вен, систем воротной и нижней полой вен), геморрагические осложнения (кровотечения вследствие синдрома Виллебранда) и нарушения, связанные с развитием вторичного миелофиброза или бластной трансформации ЭТ [1, 4, 6].

1.1.3 Первичный миелофиброз

Первичный миелофиброз (ПМФ) – хроническое миелопролиферативное новообразование, характеризующееся фиброзом костного мозга, спленомегалией и экстрамедуллярным гемопоэзом. Заболевание часто осложняется прогрессирующей анемией, выраженной спленомегалией с присоединением симптомов опухолевой интоксикации. Причинами смерти больных могут быть бластная трансформация, прогрессирование заболевания с глубокой цитопенией и осложнения, связанные с тромбозами, портальной гипертензией с развитием кровотечений, инфекции [2, 117, 141]. По гистологической характеристике в зависимости от степени выраженности фиброза костного мозга выделяются префибротическая и фиброзная стадии заболевания. На первоначальном этапе развития происходит быстрое увеличение опухолевой массы, возникновение симптомов опухолевой интоксикации, связанное с секрецией цитокинов. В анализах крови уровень гемоглобина нормальный или несколько повышен. Число лейкоцитов на верхней границе нормы или умеренно повышено. Количество тромбоцитов, как правило, повышено, достигая 1000×10^9/л и более с появлением в периферической крови осколков мегакариоцитов и гигантских форм тромбоцитов. Лейкоцитоз и тромбоцитоз могут приводить к нарушениям микроциркуляции и развитию тромбозов. Нарушения микроциркуляции вызывают ухудшение сопутствующей патологии, в первую очередь сердечно-сосудистых заболеваний. В трепанобиоптате наблюдается гиперплазия всех ростков миелоидного кроветворения – гранулоцитарного, эритроидного и мегакариоцитарного. Выход миелоидных предшественников в периферическую кровь приводит к возникновению экстрамедуллярных очагов кроветворения в печени и селезенке. Гепатоспленомегалия повышает давление в системе воротной вены с возможностью развития синдрома портальной гипертензии. В гистологических препаратах костного мозга наряду с участками гиперплазированной костномозговой ткани обнаруживаются очаги фиброза, увеличивающиеся в динамике до полного замещения фиброзной тканью и развития остеосклероза. Прогрессирование фиброза костного мозга вызывает сокращение плацдарма кроветворения и развитие цитопений: нарастает анемия, лейкопения с увеличением риска инфекционных осложнений, тромбоцитопения с высокой вероятностью спонтанных кровотечений. Длительная пролиферация опухолевого клона приводит к появлению дополнительных мутаций и более высокой степени малигнизации, вследствие чего развивается бластный криз ПМФ [2, 3]. Наиболее частыми осложнениями клинического течения ПМФ являются опухолевая интоксикация, спленомегалия, анемия, инфекционные осложнения, тромбоцитопения и геморрагический синдром, наличие очагов экстрамедуллярного

кроветворения, бластная трансформация, мочекислый диатез, вторичный гемосидероз и тромбозы [2].

1.1.4. Тромбозы как одно из основных осложнений Ph-негативных МПН

Тромбозы составляют основную часть осложнений при Ph-негативных МПН, внося существенный вклад в тяжесть течения и смертность при данных патологиях [63, 81, 191]. Общая частота тромбозов у пациентов с Ph(-)МПН существенно выше в сравнении с общей популяцией и составляет по данным различных исследований 12-45% при ИП, 11-30% при ЭТ и 7,2-11,6% при ПМФ [28, 71, 81, 82, 130, 159, 170, 177, 191, 192, 208, 215]. Частота тромбозов крупных сосудов на момент установления диагноза составляет 34–38,6% при ИП, 9,7–29,4% при ЭТ и 13% при ПМФ [177, 193].

Клинически тромботические проявления при Ph-негативных МПН варьируют от микроциркуляторных нарушений до тромбозов крупных артериальных и венозных сосудов. Микроциркуляторные нарушения – наиболее характерные тромботические проявления при ИП и ЭТ, ответственные за широкий спектр клинических симптомов вследствие образования тромбоцитарных тромбов в капиллярном русле периферических, церебральных, коронарных, абдоминальных сосудов и сосудах кожи. Микрососудистые осложнения при Ph(-)МПН могут включать эритромелалгию, транзиторные ишемические атаки, судороги, мигрень, сосудистые головные боли, головокружения, нетипичную боль в груди, зрительные или слуховые временные дефекты (преходящая слепота, мерцательная скотома и/или глазные мигрени, звон в ушах), периферические парестезии, точечную депигментацию/ишемию, акроцианоз и сетчатое ливедо. Эти явления, несомненно, ухудшают качество жизни больных, но существенно не влияют на прогноз заболевания [38, 71, 81, 168, 177].

Макрососудистые тромботические осложнения при Ph-негативных МПН могут иметь самую различную локализацию. Артериальные тромбозы наблюдаются более часто (примерно в 2 раза чаще венозных) [81, 170, 177, 192], обуславливая 60-70% сосудистых осложнений при данных заболеваниях. Артериальные тромбозы при Ph(-)МПН включают нарушения мозгового кровообращения (ишемический инсульт, транзиторные ишемические атаки), ишемию коронарных артерий (острый инфаркт миокарда, нестабильную стенокардию) и окклюзию периферических артерий (острые периферические и висцеральные тромбоэмболии, окклюзия почечных артерий) [81, 168, 177]. При ИП тромбозы наиболее часто возникают в цереброваскулярном бассейне (инсульты и транзиторные ишемические атаки), коронарных сосудах (инфаркты миокарда), отмечается окклюзия периферических артерий [114, 159]. Ишемический инсульт составляет 30-40% от всех тромботических осложнений при ИП. Острые

коронарные синдромы более редки, особенно у пациентов, находящихся под наблюдением и получающих медикаментозное лечение. Острые сосудистые окклюзии в других областях часто встречаются как у больных ИП, так и ЭТ [177].

Венозные тромбозы при Ph-негативных МПН представлены тромбозом глубоких вен нижних конечностей, легочной эмболией, тромбозами поверхностных вен (поверхностный тромбофлебит), а также венозными тромбозами необычной локализации: тромбозами сосудов брюшной полости (окклюзия портальной, печёночных, селезёночной, брыжеечных, почечных вен) и тромбозами в цереброваскулярном бассейне (тромбоз церебральных вен и венозного синуса) [81, 168, 177]. Встречаемость венозных тромбозов необычных локализаций повышена среди пациентов с Ph(-)МПН в сравнении с общей популяцией [177], выявление этих событий часто предшествует установлению диагноза [81, 168]. Частота тромбозов вен брюшной полости при Ph(-)МПН варьирует от 1% до 23% (10% для ИП, 13% для ЭТ и 1% для ПМФ) [86, 177]. Тромбозы вен брюшной полости в большинстве случаев ассоциированы с Ph-негативными МПН [177], представляющими наиболее частую причину 40-50% случаев синдрома Бадда-Хиари и 25-32% тромбозов портальной вены [38, 81, 142, 168, 177]. При ИП венозные тромбозы составляют примерно одну треть осложнений [81, 168] и по большей части возникают в системах вен нижних конечностей или легких, а также в сосудах брюшной полости (воротная и печеночные вены) [5]. У пациентов с ЭТ тромбоз глубоких вен и легочные эмболии встречаются реже, чем при ИП [59, 215]. В крупнейшем эпидемиологическом исследовании по истинной полицитемии European Collaboration on Low-dose Aspirin (ECLAP) смертность от сердечно-сосудистых осложнений насчитывала 41% от всех летальных исходов, в основном за счет ишемической болезни сердца (15% всех летальных исходов), хронической сердечной недостаточности (8%), негеморрагического инсульта (8%) и легочной эмболии (8%) [38, 215].

Как артериальные, так и венозные тромботические осложнения нередки и у пациентов с ПМФ [63, 82, 207, 208]. Артериальные события обычно включают инсульт/транзиторные ишемические атаки, патологию периферических сосудов, ишемическую болезнь сердца или острый коронарный синдром и окклюзию центральной артерии сетчатки, в то время как венозные тромбозы включают тромбоз глубоких вен, легочную эмболию, а также тромбозы необычной локализации (тромбоз портальной вены, синдром Бадда-Хиари и тромбоз церебрального венозного синуса). Общая частота тромбозов у пациентов с ПМФ, по-видимому, сходна с частотой, наблюдаемой при ЭТ, но значительно ниже, чем при ИП [63, 82, 120, 208, 215]. Встречаемость тромботических осложнений при ПМФ на момент или до установления диагноза насчитывает по данным различных авторов 7,2-13,2%, при последующем наблюдении 10,7-11,6% [63, 82, 207, 208]. По данным Cervantes F. et al. (2006) 4,8% смертельных исходов при ПМФ были напрямую обусловлены тромботическими эпизодами, которые включали

синдром Бадда-Хиари, тромбоз портальной вены, инсульт и легочную тромбоэмболию. Из всех тромбоэмболических осложнений 20% представляли тромбоз вен брюшной полости и 3% - тромбоз церебрального венозного синуса [82]. В исследовании Kaifie A. et al. (2016) у 18% пациентов с ПМФ обнаруживался тромбоз вен брюшной полости [39]. Достаточно низкий общий уровень смертности от сердечнососудистых нарушений (2%) и относительно низкий уровень тромбозов при ПМФ, вероятно, связаны с более существенным вкладом других осложнений, включая лейкемическую трансформацию, инфекции, цитопении и осложнения после трансплантации стволовых клеток, определяющие значительно более тяжелые исходы при ПМФ по сравнению с другими Ph-негативными МПН [38, 63, 208].

1.1.5 Молекулярно-генетические механизмы развития Ph-негативных МПН

Одним из ключевых моментов патогенеза Ph-негативных МПН считается активация JAK-STAT сигнального пути, обусловленная наличием мутации JAK2 V617F, мутаций в 12 экзоне гена JAK2, в генах CALR, MPL, либо другими более редкими мутациями.

Сигнальный путь JAK-STAT (рисунок 1) представляет собой один из основных механизмов передачи цитокинового сигнала в ядро, принимающий участие в регуляции пролиферации, дифференцировки, миграции, апоптоза и клеточного выживания [87, 125]. При связывании цитокинового рецептора с лигандами (такими как эритропоэтин, тромбопоэтин, интерлейкины) происходит фосфорилирование двух нерецепторных тирозинкиназ (Janus-киназ), расположенных в цитозоле рядом с клеточной мембраной в непосредственной близости от цитокиновых рецепторов. Janus-киназы фосфорилируют белки STAT (signal transducer and activator of transcription), что позволяет им образовывать активные димеры, которые, проникая в ядро, регулируют экспрессию генов [2, 106, 175]. Каскад фосфорилирования Janus-киназами индуцирует передачу сигнала через STAT5, STAT3, RAS-MAPK и PI3K-Akt, которые регулируют пролиферацию и дифференцировку миелоидных предшественников [145].

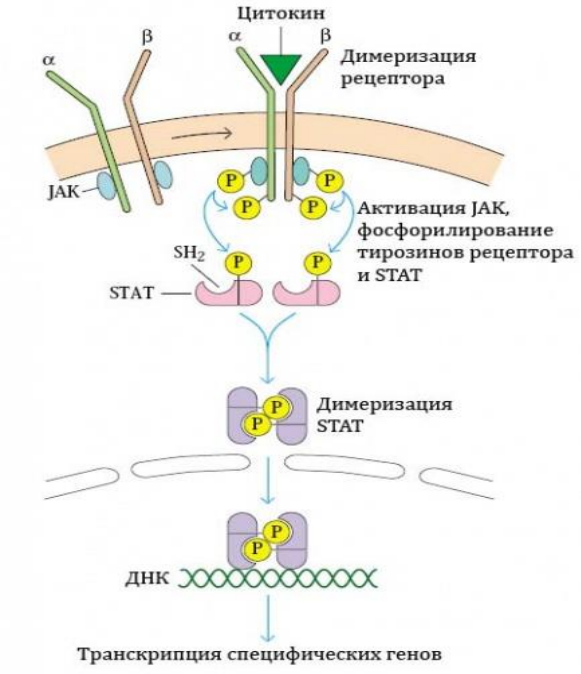

Рисунок 1 - JAK-STAT сигнальный путь передачи сигнала при связывании цитокинового рецептора с лигандом [по 125]

Семейство Janus-киназ включает белки JAK1, JAK2, JAK3 и Tyk2 [190]. Janus-киназы имеют 7 описанных гомологичных участков, обозначаемых JH1-7 (Janus homology domains 1-7) (рисунок 2). Домен JH1 обладает каталитической активностью, в то время как домен JH2, структурно сходный с JH1, считается каталитически неактивным и выполняет регуляторную функцию, оказывая подавляющее влияние на активность протеинкиназы [87, 139, 176]. Мутации в регуляторном домене JH2 вызывают потерю автоингибиторных свойств JH2, что приводит к повышению киназной активности и цитокин-независимому росту клеточных линий и культуры клеток костного мозга [36, 77, 110].

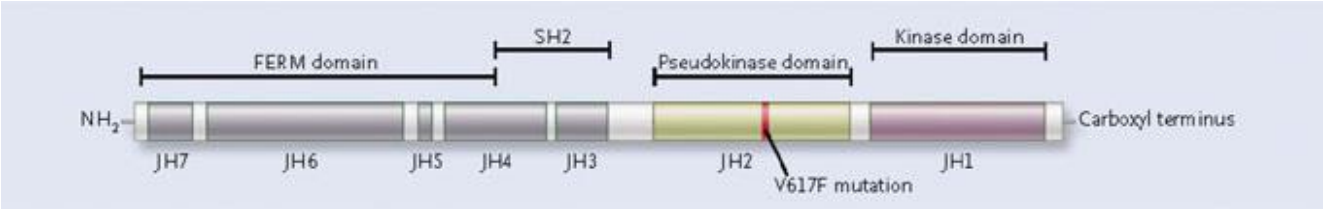

Рисунок 2 - Структура Janus-киназы и мутация JAK2 V617F [122]

Специфическая точковая приобретенная мутация в 14 экзоне кДНК JAK2, приводящая к замене валина на фенилаланин в 617 положении регуляторного домена JH2-псевдокиназы белка JAK2 (JAK2 V617F) (рисунок 2), впервые была описана у пациентов с МПН в 2005 г. [17, 22, 25, 26, 36]. Наличие JAK2 V617F приводит к независимой конститутивной активации Janus-киназы и JAK-STAT сигнального пути в отсутствие стимуляции рецепторов, что вызывает увеличение

пролиферации миелоидного ростка [2]. Мутация JAK2 V617F обнаруживается в гемопоэтических стволовых клетках и их потомках, которые поддерживают долговременный клональный гемопоэз [199], и выявляется у большинства пациентов с ИП (90-95%), приблизительно у 50–70% больных ЭТ и 40–50% пациентов с ПМФ [145].

У пациентов с Ph-негативными МПН мутация JAK2 V617F в значительной степени ассоциирована с повышенными показателями уровня гемоглобина и числа лейкоцитов [60, 171, 188]. Клинические данные указывают на ассоциацию данной мутации с повышенным тромботическим риском у пациентов с ЭТ и ИП [48, 165, 171, 201]. Для JAK2 V617F-позитивных пациентов с ЭТ характерна более высокая частота встречаемости венозных тромбозов [47, 171]. Наряду с другими факторами установлено прогностическое значение наличия и аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F на риск развития тромбозов и выживаемость при ЭТ. Мутация JAK2 V617F включена в Международную Прогностическую Шкалу риска развития тромбозов ВОЗ 2012 при ЭТ (IPSET-thrombosis) [62]. У пациентов с миелофиброзом мутация JAK2 V617F ассоциируется также с большей выраженностью спленомегалии, повышенным числом тромбоцитов и более низкой выживаемостью [111, 140, 212].

У части JAK2 V617F-негативных пациентов с ИП выявляются различные соматические мутации в 12 экзоне JAK2, соответствующем участку, связывающему JH2 и JH3 домены [175] (рисунок 2). Присутствие данных мутаций вызывает структурную модификацию домена JH2, индуцируя цитокин-независимую пролиферацию с повышением уровня тирозинового фосфорилирования JAK2 и STAT5 [108, 145, 184, 210]. Пациенты с мутациями в 12 экзоне JAK2 характеризуются повышенным уровнем гемоглобина, снижением числа лейкоцитов и тромбоцитов, большинство имеют субнормальный уровень эритропоэтина сыворотки крови, часто изолированный эритроцитоз [108, 109, 134, 153, 161].

У пациентов с ЭТ и ПМФ, негативных по мутациям JAK2, могут обнаруживаться соматические мутации в гене кальретикулина (CALR). Кальретикулин представляет собой высококонсервативный белок эндоплазматического ретикулума, выполняющий множество функций, включая шаперонную активность и поддержание кальциевого гомеостаза, которые играют важную роль в клеточной пролиферации и дифференцировке, апоптозе и гибели иммуногенных клеток [41, 185, 216]. Обнаружено 36 типов мутаций (инсерций и делеций) в 9 экзоне гена CALR. Эти мутации выявляются у 67% пациентов с ЭТ и 88% пациентов с ПМФ, не имеющих мутаций в JAK2 или MPL [183]. В клетках с мутацией CALR фосфорилирование STAT5 как следствие активации сигнального пути JAK-STAT повышено при низкой концентрации или отсутствии интерлейкина-3 [116].

Показано, что CALR-позитивные пациенты с ЭТ в сравнении с JAK2 V617F-позитивными отличаются более низкими значениями уровня гемоглобина и числа лейкоцитов, более высоким количеством тромбоцитов, имеют более низкую кумулятивную встречаемость тромбозов и, в целом, характеризуются пониженным риском развития тромбозов [96, 116, 182, 183]. При ПМФ мутации CALR ассоциированы с более молодым возрастом пациентов, высоким числом тромбоцитов, низким значением по шкале DIPSS-plus и низкой встречаемостью анемии и лейкоцитоза, CALR-позитивные пациенты менее склонны к трансфузионной зависимости [42].

У JAK2 V617F-негативных пациентов с миелофиброзом описана соматическая мутация другого компонента JAK-STAT сигнального пути, рецептора тромбопоэтина (ТПО) MPL (MPLW515L) [137]. MPL принадлежит к суперсемейству цитокиновых рецепторов и играет важную роль в регуляции мегакариопоэза. При наличии MPLW515L происходит замена триптофана на лейцин в 515 кодоне амфипатического мотива, следующего непосредственно за трансмембранным доменом, который имеет определяющее значение в поддержании неактивного состояния рецептора в отсутствие лиганда [29]. Мутация MPLW515L вызывает спонтанную активацию JAK-STAT сигнального пути, приводя к трансформации гемопоэтических клеток в сторону цитокин-независимой пролиферации [137, 146]. При наличии мутации MPLW515L у пациентов с миелофиброзом характерна клеточная пролиферация за счет гиперчувствительности к ТПО по сравнению с немутированным рецептором MPL [137]. Кроме MPLW515L, встречаются также другие мутации MPL: W515A, W515R, W515K (замена триптофана аланином, аргинином или лизином, соответственно), Y252H во внеклеточном домене MPL [30, 45, 135, 136, 146]. В целом, соматические мутации MPL обнаруживаются редко, приблизительно 3-15% при ЭТ или ПМФ [45, 135, 136, 138].

Мутации MPL ассоциированы с повышенным числом тромбоцитов и уровнем эритропоэтина в сыворотке, пониженным уровнем гемоглобина и клеточности костного мозга, с увеличением возраста больных. Также мутации MPL являются существенным фактором риска развития тромботических осложнений и трансфузионной зависимости в сравнении с JAK2V617F-позитивными пациентами [27, 44, 136, 138].

1.2 Особенности системы гемостаза при Ph-негативных МПН

Учитывая повышенную склонность пациентов с Ph-негативными МПН к развитию тромбозов, значительный интерес представляет определение особенностей системы гемостаза при данных патологиях и выявление лабораторных маркеров, в наибольшей степени отражающих выраженность протромботических изменений.

1.2.1 Состояние плазменного звена гемостаза у пациентов с Ph-негативными МПН

Плазменное звено гемостаза включает в себя плазменные факторы свёртывания крови, гуморальные противосвёртывающие и фибринолитические компоненты и принимает участие как в механизмах свёртывания крови, так и в ограничении этого процесса.

1.2.1.1 Особенности коагуляционного гемостаза у больных Ph-негативными МПН

Для общей оценки состояния плазменного гемостаза стандартно применяются такие временные скрининговые тесты как активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ) и протромбиновый тест (ПТ), позволяющие выявить нарушения внутреннего или внешнего пути свёртывания крови, соответственно. Удлинение или укорочение времени свёртывания в каждом из этих тестов может указывать на гипокоагуляционные или гиперкоагуляционные сдвиги в системе гемостаза. Пролонгация АПТВ и протромбинового времени у больных хроническими МПН, включая пациентов с ЭТ, ИП и ПМФ, относительно контрольных показателей описана в работах различных групп авторов [83, 88, 92, 204], свидетельствуя о наличии у пациентов с Ph-негативными МПН некоторого сдвига показателей базовых коагуляционных тестов в сторону гипокоагуляционных значений.

Ряд исследований свидетельствует, что высокий уровень коагуляционных факторов, например фактора V (фV) и фактора VIII (фVIII), наряду с другими изменениями ассоциирован с увеличением риска тромбозов [129]. Следовательно, повышенный уровень гемостатических факторов может быть напрямую вовлечен в патофизиологию тромботических осложнений при Ph(-)МПН. Значительное повышение активности циркулирующих фV и фVIII получено у больных ЭТ с тромбозами в анамнезе по сравнению с контрольной группой и пациентами без тромбозов в исследовании Arellano-Rodrigo E. et al. В мультивариантном анализе повышенная активность фV в плазме была независимо ассоциирована с увеличением риска тромбозов. По предположению авторов, повышение активности данного фактора приводит к ускорению свёртывания, вызывая риск образования тромбов. При этом коагуляционные факторы II, VII,

IX, X, XI, XII, XIII у пациентов с ЭТ не обнаруживали существенных отличий от показателей здоровых лиц, а также в зависимости от тромбозов в анамнезе. Наличие мутации JAK2 V617F у пациентов с ЭТ не влияло на активность коагуляционных факторов в плазме [158]. В работах Duchemin J. et al. и Tripodi A. et al. уровень и активность фVIII в плазме пациентов с Ph-негативными МПН не обнаруживали существенных отличий от референтных значений [88, 99]. В исследовании Marchetti M. et al. выявлялось существенное снижение активности протромбина (фII) и фV в плазме пациентов с ЭТ и ИП по сравнению с контрольной группой [204], снижение активности фII в плазме относительно нормальных показателей также получено у больных ИП, ЭТ и ПМФ в работе Tripodi A. et al. [88]. Наиболее низкие значения активности фII и фV определялись у JAK2V617F-позитивных пациентов с ЭТ, у больных ИП более выраженное снижение данных показателей отмечалось у гомозигот по мутации JAK2 V617F [204]. Авторы предполагают, что причиной снижения активности фII и фV у пациентов с ЭТ и ИП может являться увеличение количества и степени активации клеток крови, особенно лейкоцитов, совместно с развитием хронического протромботического состояния, происходящим при данных заболеваниях. Текущее хроническое протромботическое состояние может вызывать потребление коагуляционных факторов [204].

Таким образом, данные различных групп авторов относительно уровня или активности отдельных факторов свёртывания у больных Ph-негативными МПН достаточно противоречивы: имеются свидетельства как повышения, так и снижения данных показателей, что не позволяет применять эти маркеры для выявления пациентов с наибольшим риском развития тромбозов.

В качестве биохимического инструмента для определения состояния гиперкоагуляции могут быть применимы такие плазменные маркеры активации системы свертывания, как фрагменты протромбина 1+2 (F1+2), тромбин-антитромбиновые комплексы (ТАТ-комплексы) и D-димеры, представляющие собой фермент-ингибиторные комплексы или побочные продукты реакций коагуляции, высвобождаемые в процессе активации свертывания. Активация коагуляции при Ph-негативных МПН продемонстрирована в ряде исследований по оценке уровня данных маркеров. Значительное повышение плазменных концентраций таких маркеров гиперкоагуляции, как F1+2 и ТАТ-комплексы, у больных ЭТ и ИП относительно показателей здоровых лиц получено Falanga A. et al., свидетельствуя о существенной активации коагуляции у пациентов с Ph(-)МПН. Лабораторные признаки активации системы коагуляции у больных ЭТ и ИП были ассоциированы с активацией лейкоцитов in vivo [160]. Значимые различия плазменного уровня F1+2 между пациентами с ЭТ и контрольной группой наблюдались в исследовании Arellano-Rodrigo E. et al., уровень F1+2 при этом напрямую коррелировал с уровнем растворимого P-селектина (sP-селектина) в плазме, предполагая, что сверхэкспрессия sP-селектина тромбоцитами может быть стимулом для активации свёртывания при ЭТ. Наличие

мутации JAK2V617F у больных ЭТ не влияло на плазменную концентрацию маркеров активации коагуляции [158]. По данным Alvarez-Larra´n A. et al. у пациентов с ПМФ также обнаруживался существенно повышенный уровень F1+2 в плазме в сравнении с контрольными показателями, причём больные, позитивные по мутации JAK2V617F, имели значительно более высокие значения F1+2, чем носители аллеля дикого типа. Уровень F1+2 напрямую коррелировал как с наличием мутации JAK2, так и экспрессией маркеров активации лейкоцитов, CD11b нейтрофилов и моноцитов. Таким образом, по повышению уровня F1+2 в плазме пациенты с ПМФ обнаруживали черты активации коагуляции, сходные с больными ИП и ЭТ [104].

В то же время в отношении такого маркера активации свёртывания, как плазменный уровень D-димеров, Arellano-Rodrigo E. et al. у пациентов с ЭТ и Alvarez-Larra´n A. et al. у больных ПМФ не наблюдали значимых различий относительно группы здоровых лиц [104, 158]. По данным Falanga A. et al. уровень D-димеров был существенно повышен только в группе ИП относительно как контрольной группы, так и больных ЭТ [160].

Результаты приведенных исследований по определению уровня плазменных маркеров активации свёртывания в основном подтверждают состояние активации коагуляции у пациентов с Ph-негативными МПН, преимущественно при оценке уровня фрагментов протромбина F1+2, в то время как в отношении других маркеров, в том числе D-димеров, данные неоднозначны.

1.2.1.2 Естественные антикоагулянты у пациентов с Ph-негативными МПН

Естественные антикоагулянты играют важную роль в сохранении гемостатического баланса, обеспечивая поддержание крови в жидком состоянии в циркуляции, и включают такие белки как антитромбин (АТ), ингибитор пути тканевого фактора (tissue factor pathway inhibitor - TPFI), систему протеина С (PC) и другие. Дефицит естественных антикоагулянтов может служить причиной развития протромботических состояний и тромботических осложнений.

Первые работы по определению естественных антикоагулянтов у больных МПН предпринимались достаточно давно. Некоторые исследования свидетельствовали о снижении уровня естественных антикоагулянтов у пациентов с данными заболеваниями, тогда как другие авторы не отмечали такой особенности. Подобные расхождения могли объясняться малым числом исследованных случаев, что часто приводило к противоположным результатам [51, 57, 121, 156, 198, 217].

Первое исследование крупной выборки (81 пациент с хроническими МПН, в т.ч. 33 больных ИП и 48 больных ЭТ), осуществленное Bucalossi A. et al., выявило одиночный или

множественный дефицит естественных антикоагулянтов у 43,5% пациентов с тромбозами против 5,7% в группе без тромбозов. У больных с тромбозами в анамнезе наблюдалось существенное снижение активности АТ и общего антигена протеина S (PS) в сравнении с пациентами без тромбозов. В зависимости от наличия тромбозов различий активности PC авторы не обнаружили, в то время как при сравнении с контрольной группой у больных ИП и ЭТ выявлялось значимое снижение активности PC [167]. Зависимость активности PC от наличия тромбозов в анамнезе установлена в исследовании Amitrano L. et al. Из 79 пациентов с Ph-негативными МПН (в том числе 26 больных ЭТ, 27 - ИП и 26 - ПМФ) изолированный дефицит PC был обнаружен у 23% пациентов с тромбозами вен брюшной полости, у 5% пациентов с артериальной патологией и у 6,8% пациентов без тромбозов в анамнезе против 1% в контрольной группе. По результатам множественного логистического регрессионного анализа низкий уровень PC выступал в качестве независимого прогностического фактора тромбоза вен брюшной полости у больных Ph(-)МПН. В то же время авторы отмечали, что наблюдаемый дефицит естественных антикоагулянтов мог быть вторичен по отношению к тромбозу портальной вены у обследованных пациентов [206]. Вследствие окклюзии может происходить портосистемное шунтирование с последующим развитием умеренной коагулопатии потребления, приводящей к снижению уровня PC и других естественных антикоагулянтов [58, 206].

Зависимость уровня PS от наличия мутации JAK2 V617F исследована Marchetti M. et al. и Arellano-Rodrigo E. et al. По данным Marchetti M. et al. у пациентов с МПН (среди которых 59 больных ЭТ и 30 больных ИП), особенно у носителей мутации JAK2 V617F, уровень свободного PS был значительно ниже контрольных значений. Общий уровень PS был существенно снижен у JAK2 V617F-позитивных пациентов с ЭТ по сравнению с контролем. У больных ИП наблюдалось существенное снижение общего и свободного PS, наиболее выраженное в подгруппе гомозигот по мутации JAK2 V617F [204]. В исследовании Arellano-Rodrigo E. et al. у 53 больных ЭТ также обнаруживался более низкий уровень свободного PS по сравнению с показателями здоровых лиц, наиболее значительное снижение отмечалось у пациентов с мутацией JAK2 V617F. Для плазменного уровня PS наблюдался дозо-зависимый эффект мутантного аллеля (≥12%), подтверждая ассоциацию между аллельной нагрузкой мутации JAK2 V617F и уровнем свободного PS. При этом по активности антитромбина, PC и уровню общего PS не наблюдалось существенных отличий между пациентами и контрольной группой [158].

Снижение уровня свободного PS относительно здоровых лиц обнаружено у больных ЭТ, ИП и ПМФ в работах Duchemin J. et al. и Tripodi A. et al. [88, 99]. Tripodi A. et al. также отмечали снижение уровня PC у пациентов с ИП в сравнении с показателями контрольной

группы [88], в то время как Duchemin J. et al. подобного изменения у больных ЭТ и ИП не наблюдали [99]. Уровень АТ по данным Tripodi A. et al. не отличался от нормальных значений [88].

В целом результаты приведенных работ свидетельствуют об изолированном или множественном снижении активности и/или уровня естественных антикоагулянтов, наиболее выраженном для системы РС у пациентов с Ph(-)МПН, особенно позитивных по мутации JAK2 V617F и при наличии тромбозов в анамнезе.

1.2.1.3 APC-резистентность у пациентов с Ph-негативными МПН

Известно, что одной из причин несостоятельности антикоагулянтной системы РС, кроме количественного дефицита, является устойчивость к активированному протеину С (APC), или APC-резистентность. APC-резистентность представляет собой наиболее частую патологию, ассоциированную с тромботическими событиями [31, 167]. В большинстве случаев резистентность к APC обусловлена мутацией “фактор V Leiden” с аминокислотной заменой Arg506Gln в факторе V, расположенной в месте основного сайта его специфического протеолиза под действием APC. В результате этой замены активная форма фV становится устойчивой к APC-опосредованной инактивации и сохраняет свои прокоагулянтные свойства в течение более длительного времени по сравнению со своей нормальной изоформой. Кроме того, теряется способность к инактивации активного фVIII (фVIIIa), что также увеличивает коагуляционный потенциал плазмы крови.

С повышенным риском тромбозов также ассоциирована APC-резистентность в отсутствие мутации фV Лейден при таких состояниях, как беременность, приём оральных контрацептивов, гормонозаместительная терапия, антифосфолипидный синдром и онкологические заболевания [18, 19, 21, 67, 68, 129, 204]. Приобретенная APC-резистентность может быть напрямую вовлечена в патофизиологию тромботических осложнений при Ph-негативных МПН. В связи с этим определение данного состояния может быть применимо для выявления пациентов с наибольшим риском развития тромбозов [158]. Наличие APC-резистентности определяется с помощью классического анализа на основе АПТВ по снижению чувствительности к APC, рассчитываемой в виде отношения АПТВ в присутствии и в отсутствии активированного протеина С.

В доступной литературе представлены противоречивые данные об APC-резистентности у пациентов с Ph-негативными МПН, определяемой на основе АПТВ. Так, в работе Marchetti M. et al. у больных ЭТ и ИП не обнаруживалось значимых отличий от показателей здоровых лиц, а также в зависимости от наличия мутации JAK2 V617F [204]. Тем самым, тест на основе АПТВ

не выявлял APC-резистентность в плазме пациентов с Ph(-)МПН, аналогично данным Ruggeri M. et al. [78, 204]. В то же время, в работе Bucalossi A. et al. APC-резистентность выявлялась у 3 из 20 (15%) больных ЭТ и ИП с тромбозами в анамнезе и отсутствовала у 11 пациентов без тромбозов, указывая на возможную роль APC-резистентности в тромботических событиях при ЭТ и ИП [167]. В исследовании Arellano-Rodrigo E. et al. больные ЭТ с предшествующими тромбозами имели значительно более низкие значения чувствительности к APC, соответственно, приобретенная APC-резистентность также была более распространена в этой группе пациентов (8 из 26, 31%), чем среди больных без тромбозов (1 из 27, 4%) или в контрольной группе (0 из 53, 0%). При проведении мультивариантного анализа приобретённая APC-резистентность была независимо ассоциирована с повышенным риском развития тромбозов, подтверждая роль данного состояния в тромбообразовании при ЭТ. JAK2 V617F-позитивные пациенты имели более низкие показатели чувствительности к APC, чем больные без мутации, однако различия не были значимы. В зависимости от наличия мутации JAK2 V617F не наблюдалось различий по доле пациентов с приобретенной APC-резистентностью [158]. По предположению авторов, факторами, вызывающими развитие APC-резистентности, могут выступать сниженный уровень PS, высокие значения активности факторов V и VIII и уровня фактора Виллебранда (АгфВ), выявляемые у больных ЭТ [49, 98, 204], а также наличие антифосфолипидных антител [158].

Резюмируя результаты приведенных исследований, можно заключить, что APC-резистентность, определяемая по тесту на основе АПТВ, выявляется в основном у пациентов с Ph-негативными МПН, имевших тромбозы в анамнезе, что позволяет предположить существенный вклад сниженной чувствительности к APC в развитие тромботических событий при данных патологиях.

1.2.1.4 Особенности плазменного гемостаза при Ph-негативных МПН, выявляемые с помощью интегрального теста генерации тромбина

Как показано в предыдущих разделах, у пациентов с Ph-негативными МПН часто выявляются незначительные или противоречивые изменения в традиционных коагуляционных тестах, в том числе оценивающих ПТ и АПТВ, активность отдельных факторов свёртывания, уровень D-димера и другие. Вероятно, это связано с тем, что данные тесты не отражают особенности коагуляционного баланса, обусловленные противоположным действием про- и антикоагулянтов. В работах ряда авторов показано, что глобальные, или интегральные, тесты, в том числе тест генерации тромбина (ТГТ), могут быть более информативными для оценки подобного баланса [40]. Так, в тестах генерации тромбина динамику образования этого

фермента, являющегося основным в плазменном гемостазе, можно мониторировать от начала генерации до затухания процесса. Основными количественными характеристиками генерации тромбина, оцениваемыми методом калиброванной автоматизированной тромбинографии, являются эндогенный тромбиновый потенциал (Endogenous Thrombin Potential, ETP), определяемый как площадь под кривой генерации тромбина и представляющий собой общий показатель протромботических или геморрагических тенденций [195, 203], высота пика кривой генерации тромбина (Peak thrombin), отражающая максимальную концентрацию образующегося тромбина, и скорость образования тромбина.

Постановка теста генерации тромбина возможна в различных условиях, что позволяет моделировать ситуацию в кровеносном русле [88]. Так, для выявления дисфункции антикоагулянтной системы PC возможно проведение ТГТ в присутствии экзогенного APC. Такая постановка чувствительна как к генетическим, так и приобретенным гиперкоагуляционным состояниям [15, 61, 68, 204]. Снижение ETP и Peak thrombin при добавлении APC относительно показателей в отсутствии данного реагента характеризует чувствительность плазмы к антикоагулянтному действию активированного протеина С, снижение которой свидетельствует о наличии APC-резистентности. Сходным образом, параллельное проведение ТГТ без тромбомодулина (TM) и с добавлением в реакционную среду TM, являющегося рецептором тромбина и физиологическим активатором эндогенного PC на эндотелиальных клетках, позволяет оценить чувствительность к тромбомодулину, которая характеризует эффективность работы системы протеина С. Чувствительность к TM рассчитывают как процент падения показателей ETP и Peak thrombin после добавления тромбомодулина. Постановка ТГТ с добавлением TM более адекватно отражает коагуляционный процесс in vivo, моделируя присутствие эндотелия сосудистой стенки [40].

Первое исследование, описывающее генерацию тромбина у пациентов с Ph-негативными МПН, осуществлено Marchetti M. et al. [204]. Эндогенный потенциал тромбина в плазме больных ЭТ и ИП был ниже, чем в контрольной группе, снижение было наиболее выражено у пациентов с ИП и носителей мутации JAK2 V617F. Сходная тенденция наблюдалась для показателя Peak thrombin, но различия с контрольной группой не достигали статистической значимости. У больных с тромбозами в анамнезе значения Peak thrombin превышали показатели пациентов без тромбозов. При этом у больных Ph(-)МПН, перенесших венозный тромбоз, отмечалось не только повышение концентрации тромбина, но и более высокие значения ETP [204]. Согласуясь с результатами Marchetti M. et al. [204], снижение ETP относительно показателей здоровых лиц показано также Duchemin J. et al. и Tripodi A. et al. в плазме пациентов с ЭТ, ИП и ПМФ [88, 99]. При этом у больных ЭТ и ИП эндогенный потенциал и скорость генерации тромбина обратно коррелировали с аллельной нагрузкой JAK2 V617F,

сходная тенденция также наблюдалась для показателей Peak thrombin, но корреляция не достигала статистической значимости [99].

Выполнение ТГТ в присутствии экзогенного активированного протеина С в работе Marchetti M. et al. выявило наличие APC-резистентности у пациентов с ЭТ и ИП. APC-резистентность была более выражена у больных ИП и носителей мутации JAK2 V617F, достигая наибольших значений у гомозигот с ИП. Следовательно, усиление APC-резистентного фенотипа, определяемое позитивным статусом JAK2 V617F, поддерживает гипотезу более выраженного состояния гиперкоагуляции у носителей мутации JAK2 V617F. Авторами была обнаружена значимая обратная корреляция между APC-резистентностью и плазменным уровнем фV, общего и свободного PS и свободного TFPI. По результатам множественного линейного регрессионного анализа основными детерминантами развития APC-резистентности являлись низкие уровни свободного PS и активности фV в плазме [204].

При оценке параметров генерации тромбина в присутствии экзогенного тромбомодулина в исследованиях Duchemin J. et al. и Tripodi A. et al. в плазме пациентов с ИП, ЭТ и ПМФ выявлялось снижение чувствительности к ТМ относительно показателей здоровых лиц [88, 99]. У больных ЭТ и ИП по данным Duchemin J. et al. чувствительность к ТМ находилась под влиянием мутационного статуса JAK2 V617F. Наибольшее снижение этого показателя отмечалось у пациентов, гомозиготных по мутации JAK2 V617F [99]. Отмеченная особенность не нашла подтверждения в работе Tripodi A. et al., по данным которых чувствительность к ТМ у пациентов с ЭТ, ИП и ПМФ не зависела от мутационного статуса JAK2 V617F [88]. Снижение чувствительности к ТМ у больных Ph(-)МПН было ассоциировано с числом тромбоцитов, а также со снижением уровня свободного PS, активности PC и AT [88, 99].

Таким образом, выполнение теста генерации тромбина в плазме пациентов с Ph-негативными МПН обнаруживало, с одной стороны, снижение количественных показателей, характеризующих уровень образования тромбина, а с другой — падение чувствительности к APC или ТМ, свидетельствующее о снижении антикоагулянтного потенциала, что может приводить к дисбалансу в системе гемостаза и вносить вклад в состояние гиперкоагуляции, наблюдаемое у больных Ph(-)МПН, тем самым объясняя тромботический риск, ассоциированный с миелопролиферативными заболеваниями.

Резюмируя вышеизложенные данные литературы по особенностям плазменного звена гемостаза, выявляемым у пациентов с Ph-негативными МПН, можно заключить, что, несмотря на имеющиеся свидетельства активации коагуляции, в том числе, по оценке уровня ряда плазменных маркеров активации свёртывания, гиперкоагуляционные изменения не всегда выявляются при использовании традиционных коагуляционных методов, оценивающих ПТ и АПТВ, активность отдельных факторов свёртывания, уровень D-димера и другие. С большей

вероятностью плазменными детерминантами нарушения гемостатического баланса и развития протромботических состояний у больных Ph(-)МПН могут выступать снижение чувствительности к активированному протеину С и тромбомодулину, а также снижение активности естественных антикоагулянтов.

1.2.2 Особенности тромбоцитарного звена гемостаза при Ph-негативных МПН

Кроме плазменного звена, другим компонентом, принимающим активное участие в гемостазе, выступают форменные элементы крови, преимущественно тромбоциты. Тромбоциты представляют собой безъядерные сложно организованные и метаболически активные фрагменты мегакариоцитов костного мозга, выполняющие многофункциональную роль в организме. В интактном состоянии они не взаимодействуют с неповрежденным эндотелием стенки сосудов и с другими форменными элементами крови. Взаимодействие мембранных рецепторов тромбоцитов со специфическими агонистами, экзогенными для этих клеток в нормальной циркуляции, в том числе нерастворимыми адгезивными белками субэндотелия, а также естественными растворимыми субстанциями зоны повреждения, приводит к стимуляции тромбоцитов, необходимой для проявления их дальнейшей коагуляционной активности. При активации тромбоцитов изменяется их форма, структурная организация, метаболические и биохимические реакции. В активированном состоянии тромбоциты приобретают способность взаимодействовать с поврежденными сосудистыми стенками, с клетками крови и друг с другом. При повреждении эндотелия происходят адгезия кровяных пластинок к субэндотелиальным структурам, обратимая агрегация циркулирующих в зоне повреждения тромбоцитов к уже адгезированным и затем секреция и необратимая агрегация с образованием тромбоцитарной пробки, непроницаемой для крови. Последовательная и связанная цепь реакций кровяных пластинок представляет собой в целом тромбоцитарный (первичный) гемостаз [12].

Кроме центральной роли в первичном гемостазе и, соответственно, развитии тромботических нарушений, тромбоциты вовлечены в широкий круг патофизиологических процессов, включая иммунный ответ, воспаление, ангиогенез, регенерацию тканей и опухолевое метастазирование [214]. В последнее время тромбоциты рассматриваются в качестве ключевых регуляторов воспалительного ответа. В обеспечении этих функций важную роль выполняют как тромбоцитарные рецепторы, так и секреция содержимого тромбоцитарных гранул хранения, способствуя взаимодействию тромбоцитов с эндотелием и системой врождённого иммунитета [196]. Так, помимо гемостатически активных субстанций, принимающих участие в процессе свертывания крови и его регуляции, тромбоцитарные гранулы являются важным источником про- и антивоспалительных медиаторов, хемокинов,

модуляторов эндотелиальных клеток и факторов роста [89, 196]. Перемещение на поверхность тромбоцитов при их активации таких белков, как Р-селектин и CD40-лиганд (CD40-L), способствует взаимодействию кровяных пластинок с иммунными и эндотелиальными клетками, стимулируя повышение сосудистой проницаемости, тромбоз и воспаление [91, 196, 202].

Учитывая тромботическую предрасположенность пациентов с Ph-негативными МПН, а также определяющую роль воспаления в патогенезе данной группы заболеваний, можно предположить существенный вклад тромбоцитов в развитие этих состояний.

Повышение числа тромбоцитов в результате пролиферации патологического клона мегакариоцитов характерно для всех Ph-негативных МПН, особенно для ЭТ. Однако в отношении вклада тромбоцитоза в тромботический риск при Ph(-)МПН имеются существенные противоречия, т.к. между числом тромбоцитов и развитием сосудистых осложнений часто не выявляется корреляционных взаимосвязей [52]. Более того, значительный тромбоцитоз (>1,000–1,500×10^9/л) ассоциирован с повышенной кровоточивостью, а не с тромбозами. Действительно, пациенты с ЭТ с экстремальным тромбоцитозом в отсутствии лейкоцитоза имеют более низкий тромботический риск [205]. Снижение числа тромбоцитов с помощью циторедуктивной терапии до значений <400×10^9/л применимо для предотвращения тромботических и геморрагических осложнений у пациентов с Ph-негативными МПН [76, 95, 126, 169].

Несмотря на неоднозначную роль высокого числа тромбоцитов, имеются неоспоримые свидетельства существенного вклада активации тромбоцитов в развитие прокоагулянтного состояния у больных Ph(-)МПН. Активация тромбоцитов in vivo продемонстрирована при ЭТ, ИП и ПМФ [103, 104, 119, 158, 209] путем выявления таких маркеров, как поверхностный и растворимый Р-селектин и CD40L [103, 119, 154, 158], повышенный уровень β-тромбоглобулина, тромбоцитарного фактора 4 и тромбоцитарного фактора роста (platelet derived growth factor, PDGF) в плазме [73, 213] и метаболитов тромбоксана А2 (TxA2) в моче как свидетельства его биосинтеза [209]. Одним из механизмов активации кровяных пластинок при Ph-негативных МПН выступают внутренние патологические изменения тромбоцитов, связанные с нарушением функции гемопоэтической стволовой клетки за счёт драйверных мутаций, которые приводят к гиперактивации JAK-зависимой передачи сигнала [172]. Повышение активации тромбоцитов вызывают и внешние факторы, в том числе межклеточные взаимодействия с активированными лейкоцитами, эндотелиальными клетками и растворимыми медиаторами, которые могут запускать активацию кровяных пластинок, происходящих не только от клональных клеток, но и от мегакариоцитов, не вовлеченных в неопластический клон. Кроме того, повышенный оборот тромбоцитов, приводящий к большей доле вновь

образованных кровяных пластинок с повышенной реактивностью, также может вносить свой вклад в состояние гиперактивации при Ph-негативных МПН [112, 158].

Вопреки присутствию базальной активации тромбоцитов, в отношении их ответа ex vivo на классические агонисты, такие как АДФ и TRAP (thrombin receptor activating peptide), имеются противоречивые результаты. В то время как некоторые исследования обнаруживают нормальный или повышенный ответ на стимуляцию классическими агонистами [103], другие описывают ослабление гемостатической функции, выявляемое по снижению уровня Р-селектина, экспрессии CD63 (лизосомально-ассоциированного мембранного белка) и связывания PAC-1 (активированного комплекса GPIIb/IIIa) или фибриногена в ответ на стимулы [66, 102]. Подобным образом, световая трансмиссионная агрегатометрия может выявлять спонтанную агрегацию тромбоцитов совместно с нарушенным ответом на различные агонисты, в частности АДФ и адреналин [14], хотя имеются предположения, что нарушение агрегации in vitro может быть частично связано с лабораторным артефактом [107] или зависеть от аналитических условий [75]. Высвобождение содержимого гранул тромбоцитов in vivo за счет спонтанной активации и вторичный дефицит пула хранения могут объяснять нарушение функции тромбоцитов, обнаруживаемое ex vivo. Дефицит пула хранения может быть обусловлен и наличием в костном мозге значительного патологического клона мегакариоцитов и патологическими изменениями происходящих от него тромбоцитов [13]. Сосуществование активации и нарушения функции тромбоцитов может вносить вклад в парадоксальную встречаемость как тромботических, так и геморрагических осложнений. Кроме того, связывание высокомолекулярных мультимеров фактора Виллебранда (фВ) с тромбоцитарным рецептором GPIb, ведущее к потере крупных мультимеров фВ и синдрому Виллебранда, играет роль в развитии геморрагического диатеза [200].

Активированные тромбоциты опосредуют различные функциональные ответы, которые вносят вклад в развитие протромботического состояния при Ph-негативных МПН. Экспозируя на своей мембране фосфатидилсерин, активированные тромбоциты обеспечивают каталитический субстрат для сборки коагуляционных комплексов и генерации тромбина. О повышенном прокоагулянтном потенциале тромбоцитов свидетельствует усиление индуцируемой тромбоцитами генерации тромбина при ЭТ и ИП [157]. Кроме того, тромбоциты при Ph(-)МПН экспрессируют на поверхности повышенный уровень тканевого фактора, который представляет собой основной инициатор свертывания крови, усиливающий прокоагулянтную активность [211].

Взаимодействие тромбоцитов с лейкоцитами является центральным в протромботическом сценарии при Ph-негативных МПН. Тромбоциты связываются с лейкоцитами в крови в участках активированного или поврежденного эндотелия за счет

рецепторных взаимодействий, в том числе таких адгезивных молекул, как P-селектин, с рецептором PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1), рецепторов GPIbα и GPIIb/IIIa (через фибриноген) с CD11b/CD18 (macrophage 1 antigen, MAC-1, αMβ2), и CD40L тромбоцитов со своим рецептором CD40 [118, 152, 196, 202]. Соответственно увеличению уровня P-селектина в циркуляции выявляется повышенный уровень тромбоцитарно-нейтрофильных и тромбоцитарно-моноцитарных агрегатов при ЭТ [103, 119], ИП [119] и ПМФ [104]. Взаимодействие между тромбоцитами и лейкоцитами запускает взаимную активацию обоих типов клеток, внося вклад в развитие активированного фенотипа.

У нейтрофилов при Ph-негативных МПН отмечается усиление функциональных лейкоцитарных ответов, включая высвобождение внутриклеточных протеаз, таких как эластаза и катепсин G, которые активируют тромбоциты и запускают каскад свертывания, инактивируя ингибиторы коагуляции [160]. Кроме того, нейтрофилы при Ph(-)МПН продуцируют высокий уровень активных форм кислорода (АФК) [105], которые вызывают повреждение эндотелия и модифицируют коагуляционные факторы. Активированные тромбоциты являются известными триггерами образования нейтрофилами внеклеточных ловушек (NETs), которые представляют собой сети из ДНК, гистонов и гранулярных компонентов, способствующие тромбообразованию [164]. Нерегулируемое формирование NETs лежит в основе некоторых протромботических состояний [164], однако при Ph-негативных МПН роль NETs остается неоднозначной. Показано, что нейтрофилы пациентов с Ph(-)МПН могут спонтанно образовывать NETs ex vivo, в то время как стимуляция формирования NETs различными индукторами даёт дифференцированный ответ [101, 144].

Взаимодействие тромбоцитов с моноцитами может инициировать функции последних, включая повышенную при Ph-негативных МПН экспрессию тканевого фактора [103, 166] и синтез цитокинов [20], конститутивно активированный в моноцитах при ПМФ [54], тем самым закрепляя протромботическую и провоспалительную цепь при Ph(-)МПН.

Важную роль в развитии протромботического состояния при Ph-негативных МПН играет и функциональное взаимное влияние между активированными тромбоцитами и эндотелием. Активированные эндотелиоциты, демонстрирующие протромботический фенотип, способствуют рекрутингу тромбоцитов и лейкоцитов. Высвобождаемый фВ связывает тромбоциты, последующая активация которых приводит к поверхностной транслокации тромбоцитарного CD40L, связывающегося с эндотелиальным рецептором CD40. Расщепление мембранного CD40L дает растворимый фрагмент sCD40L, повышение которого отмечается в плазме при Ph(-)МПН [158].

Пациенты с ЭТ характеризуются повышенным числом циркулирующих микрочастиц, происходящих от тромбоцитов, эндотелиоцитов и лейкоцитов, причем подавляющее

большинство популяции микрочастиц имеют тромбоцитарное происхождение [70]. Тромбоцитарные микрочастицы обогащены тканевым фактором, характеризуются фосфолипид-зависимой прокоагулянтной активностью и могут транспортировать цитокины и хемокины тромбоцитарного происхождения, тем самым усиливая тромбоцитарный провоспалительный и прокоагулянтный сигналы [151].

Таким образом, несмотря на многочисленные свидетельства активации тромбоцитов и их вклада в развитие прокоагулянтного состояния при Ph-негативных МПН, у пациентов отмечается также и склонность к геморрагическим проявлениям при существенном повышении числа кровяных пластинок.

1.2.3 Состояние эндотелия при Ph-негативных МПН

Кроме плазменного и тромбоцитарного звеньев, важнейшее участие в выполнении функций системы гемостаза принимает эндотелиальная стенка сосудов. Эндотелий — основной компонент гистогематических барьеров, выполняющий разнообразные функции, в том числе вазомоторную, гемостатическую, адгезивную, ангиогенную и др. Вазомоторная функция обеспечивает регуляцию сосудистого тонуса и, соответственно, кровотока за счет продукции вазоконстрикторов и вазодилататоров. Гемостатическая функция осуществляется путем продукции регуляторов системы гемостаза. Адгезивная функция необходима для регуляции взаимодействия сосудистой стенки с клетками крови. Ангиогенная функция выполняется посредством модуляции роста гладкомышечных клеток и ремоделирования сосудистого русла [113, 143]. Выделяют также иммунную функцию эндотелия, реализуемую за счет синтеза цитокинов и антигенпрезентирующей роли [7, 55].

В рамках гемостатической функции в физиологических условиях эндотелиальные клетки в основном нацелены на образование атромбогенных веществ, обеспечивая сохранение жидкого состояния крови. В ответ на повреждение или воспаление происходит стимуляция и активация эндотелия с повышением экспрессии тромбогенных факторов и поверхностных адгезивных молекул, что увеличивает гемостатический потенциал в месте повреждения. В определенных условиях это можно рассматривать как защитную реакцию организма, направленную на ограничение патологического процесса. Однако при нарушении механизмов, контролирующих гемостаз, результатом может быть развитие локального тромбоза или внутрисосудистое свертывание крови [10, 11]. Действие повреждающих факторов различной природы может приводить к структурным изменениям эндотелиальных клеток, нарушению их межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействий и выполняемых функций - дисфункции эндотелия [56]. Эндотелиальная дисфункция (ЭД) является ключевым звеном патогенеза

широкого круга заболеваний, а в ряде случаев — и начальным этапом развития патологических процессов [7, 132]. Дисфункции эндотелия принадлежит ведущая роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), при которых ЭД присутствует на доклинической фазе, предрасполагая в дальнейшем к развитию тромбозов [72, 93, 173].

Учитывая, что сосудистые осложнения, в том числе тромбозы, являются одним из основных патологических проявлений и существенной причиной смертности пациентов с Ph-негативными МПН, особенно больных ИП и ЭТ, определение избыточной активации и дисфункции эндотелия как начального патогенетического звена в развитии тромбозов может играть важную роль в выявлении протромботических состояний и предупреждении тромботических осложнений при Ph(-)МПН.

1.2.3.1. Функциональная диагностика изменений эндотелия при Ph-негативных МПН

Выявление ЭД возможно при помощи методов функциональной диагностики, которые позволяют оценить в основном реализацию вазомоторной функции эндотелия за счет изменения продукции оксида азота (NO) и других вазоактивных веществ. Эта группа методов включает определение эндотелий-зависимой вазодилатации при помощи различных средств детекции [7]. В настоящее время поток-зависимая вазодилатация (flow-mediated dilatation, FMD) плечевой артерии, определяемая при помощи ультразвуковых датчиков, является наиболее широко используемым функциональным тестом для оценки эндотелиальной дисфункции [7, 148]. При этом оценивается вазодилататорный ответ плечевой артерии на напряжение сдвига, вызываемое реактивной гиперемией при повышении внутрисосудистого тока крови. Показано, что неинвазивная оценка эндотелиальной дисфункции в плечевой артерии при помощи ультразвука не только отражает нагрузку факторов риска ССЗ, но также коррелирует с инвазивным исследованием коронарной эндотелиальной функции [50] и с выраженностью и степенью тяжести коронарного атеросклероза [186]. Эндотелиальная дисфункция как в коронарных, так и в периферических артериях коррелирует с прогнозом риска развития артериальной патологии [115, 127, 178].

Первое исследование по оценке FMD у пациентов с Ph-негативными МПН было осуществлено Neunteufl T. et al. Авторы продемонстрировали, что эндотелий-зависимая FMD значимо нарушена у пациентов с ИП без клинических признаков артериальной патологии. Это свидетельствовало об ассоциации ИП с эндотелиальной дисфункцией на доклинической фазе заболевания и в дальнейшем могло предрасполагать к тромбозам [72]. Значительное снижение FMD у пациентов с ИП отмечалось также Lessiani G. et al. [180]. Существенное нарушение FMD

в общей группе больных Ph(-)МПН, включавшей пациентов с диагнозами ИП, ЭТ и ПМФ, в сравнении со здоровыми лицами продемонстрировано в исследовании Yildiz A. et al. При этом наибольшее снижение FMD наблюдалось у пациентов с Ph-негативными МПН, имевших тромботические осложнения в анамнезе, свидетельствуя о большей выраженности ЭД. Следовательно, дисфункция эндотелия может вносить вклад в развитие тромбозов или становиться более выраженной в результате тромботических проявлений при Ph(-)МПН [33].

Кроме FMD, для определения эндотелиальной функции используются различные виды плетизмографии, в том числе неинвазивный метод периферической артериальной тонометрии (peripheral arterial tonometry, PAT), позволяющий оценить микрососудистую функцию эндотелия путём регистрации изменений пульсового объема кончика пальца при развитии реактивной гиперемии [7, 53, 149]. Индекс реактивной гиперемии (reactive hyperemia index, RHI) характеризует способность эндотелия к NO-зависимой вазодилатации. Снижение RHI продемонстрировано у пациентов с коронарной эндотелиальной дисфункцией, выявленной инвазивным методом с ацетилхолином [149], показана прямая корреляция результатов PAT (RHI) с данными ультразвуковой регистрации FMD плечевой артерии [35]. Сходно с FMD плечевой артерии, снижение RHI связано с рядом факторов сердечно-сосудистого риска, в том числе диабетом, повышенным индексом массы тела, гиперхолестеролемией, курением и старшим возрастом [32, 34, 35, 53].

Оценка эндотелиальной функции методом PAT при помощи пальцевых плетизмографических датчиков была проведена в работе Vrtovec M. et al. у JAK2 V617F-позитивных пациентов с ЭТ без клинических проявлений атеросклероза в сравнении с практически здоровыми лицами. По показателю RHI не наблюдалось значимых различий между пациентами с ЭТ и контрольной группой, несмотря на некоторую тенденцию к ухудшению эндотелиальной реактивности у больных ЭТ [43].

Таким образом, данные представленных работ по оценке эндотелиальной функции у пациентов с Ph-негативными МПН при помощи методов функциональной диагностики обнаруживают определенные противоречия. В то время как исследование с использованием метода периферической артериальной тонометрии не выявляло значимых различий эндотелиальной функции пациентов с ЭТ в сравнении с показателями практически здоровых лиц [43], результаты ультразвуковой регистрации эндотелий-зависимой поток-опосредованной вазодилатации свидетельствовали о снижении показателей FMD при Ph(-)МПН, указывая на наличие ЭД [33, 72, 180].

1.2.3.2 Биохимические маркеры активации и повреждения эндотелия при Ph-негативных МПН

Биохимические методы диагностики состояния эндотелия основаны на выявлении и определении концентрации маркеров эндотелиальной дисфункции — различных веществ, продуцируемых эндотелиоцитами, что дает информацию практически обо всех функциях эндотелия, а также факторах его повреждающих [7, 56].

1.2.3.2.1 Маркеры нарушений вазомоторной функции эндотелия при Ph-негативных МПН

Биохимическая оценка вазомоторной функции эндотелия может быть проведена путем определения концентрации в крови продуцируемых им вазоактивных веществ. Эндотелий-зависимая вазодилатация в основном связана с синтезом в эндотелии оксида азота (NO), эндотелиального гиперполяризующего фактора (EDHF) и простациклина. Кроме эндотелий-зависимой вазодилатации, выделяют также и механизмы эндотелий-зависимой вазоконстрикции, связанные с синтезом в эндотелии тромбоксана А2, 20-HETE (20-гидроксиэйкозотетраеновой кислоты), эндотелина-1, ангиотензина II [11].

Для оценки продукции NO, являющимся наиболее мощным известным сосудистым вазодилатирующим агентом, используют определение концентрации его стабильных метаболитов — нитритов и нитратов [7]. Оценка активационного статуса сосудистых клеток у пациентов с Ph-негативными МПН путем измерения плазменного уровня производных NO впервые была проведена в работе Cella G. et al. Среди обследованных пациентов с ЭТ и ИП значительное повышение производных NO наблюдалось лишь у пациентов с ЭТ, принимавших гидроксимочевину, в сравнении как с остальными пациентами ЭТ, так и с контрольной группой [147]. Сходные данные получены Piccin A. et al.: заметное повышение уровня NO также отмечалось в группе пациентов с ЭТ, принимавших гидроксимочевину в сочетании с аспирином, по сравнению с пациентами как без терапии, так и получавшими лечение анагрелидом и/или аспирином. По данным Piccin A. et al., уровень NO был существенно снижен у пациентов с ЭТ без медикаментозного лечения относительно группы здоровых лиц, что предполагает значительное потребление и дефицит NO при ЭТ, свидетельствуя о дисфункции эндотелия и протромботических изменениях [150]. У пациентов с ЭТ, принимавших гидроксимочевину, отмечалось значительное повышение адреномедуллина (ADM), представляющего собой мощный вазодилатирующий пептид, действующий на эндотелиоциты как стимулятор высвобождения NO [24, 150]. Однако повышение уровня ADM относительно

показателей здоровых лиц наблюдалось у всех пациентов с ЭТ, включая пациентов без терапии, что подтверждает предположение об активации эндотелиоцитов при ЭТ, продуцирующих NO либо за счет синтеза эндотелиальной NO-синтазой, либо посредством стимуляции его высвобождения адреномедуллином в качестве компенсаторного механизма для ограничения протромботических изменений при ЭТ [150]. Определение концентрации эндотелина I (ET-1), мощного вазоконстриктора, вызывающего значительные изменения гемодинамики и ремоделирование сосудистого русла [7], выявляло значимое падение этого показателя у пациентов с ЭТ, принимавших анагрелид в сочетании с аспирином, относительно контрольных показателей. По-видимому, кроме снижения числа тромбоцитов при ЭТ, анагрелид может также ослаблять вазоконстрикцию за счет снижения ET-1 [150]. По предположению Piccin A. et al., терапия цитостатическими препаратами при ЭТ косвенно влияет на эндотелиальную активность за счет изменения продукции эндотелиальных модуляторов, причем, гидроксимочевина стимулирует вазодилатацию за счет повышения уровня NO и ADM, в то время как анагрелид подавляет вазоконстрикцию за счет снижения ET-1, приводя к сходному терапевтическому эффекту [150].

1.2.3.2.2 Маркеры нарушения тромборезистентности эндотелия при Ph-негативных МПН

Среди веществ, образующихся в эндотелии и участвующих в гемостазе или влияющих на этот процесс, можно выделить две группы – тромбогенные и атромбогенные факторы. К тромбогенным факторам, индуцирующим адгезию и агрегацию тромбоцитов, тромбиногенез, угнетающим фибринолиз, относятся фактор Виллебранда, фактор активации тромбоцитов, АДФ, тромбоксан А2, тканевой фактор, ингибиторы тканевого активатора плазминогена. Уровень продукции этих факторов определяет тромбогенный потенциал сосудов. К атромбогенным веществам относятся оксид азота, простациклин, экто-АДФазы, ингибитор внешнего пути свертывания крови, тромбомодулин, протеогликаны, тканевой активатор плазминогена и некоторые другие, которые тормозят процессы адгезии и агрегации тромбоцитов, тромбиногенез, активируют фибринолиз и тем самым определяют тромборезистентность. Снижение тромборезистентности сосудов, сопровождающееся сосудистой тромбофилией, - одно из проявлений дисфункции эндотелия [11]. Наиболее распространенными маркерами нарушения тромборезистентности эндотелия являются фактор Виллебранда, тромбомодулин, тканевой активатор плазминогена, ингибиторы тканевого активатора плазминогена, а также тканевой фактор [7, 11].

Фактор Виллебранда (фВ) – крупный мультимерный гликопротеин, по большей части синтезируемый и высвобождаемый эндотелиоцитами, который играет важную роль в формировании тромбоцитами тромба [85, 174]. Повышение содержания фВ в крови отражает повреждение эндотелиоцитов и развитие ЭД [7].

Ранние опубликованные данные описывают повышение уровня антигена фВ (АгфВ) в ассоциации с тромбозами в анамнезе у больных хроническими МПН, в то время как другие авторы отмечали лишь незначительное увеличение содержания фВ у пациентов с ЭТ относительно контрольных показателей, не достигавшее статистической значимости [84, 156]. Статистически значимое повышение АгфВ в циркуляции относительно показателей здоровых лиц наблюдали Falanga A. et al. в группе больных ЭТ и ИП, а также Arellano-Rodrigo E. et al. у пациентов с ЭТ [158, 160]. При этом наиболее выраженное увеличение плазменного уровня циркулирующего фВ выявлялось у больных ЭТ с тромбозами в анамнезе относительно пациентов без тромбозов, а также у JAK2 V617F-позитивных пациентов с ЭТ относительно носителей аллеля дикого типа. Плазменный уровень фВ коррелировал с аллельной нагрузкой JAK2 V617F [158]. Вероятно, повышенный АгфВ в циркуляции у пациентов с МПН, особенно при наличии тромботического анамнеза и мутации JAK2 V617F, может обусловливать акселерацию свертывания, приводящую к повышенному риску тромбообразования [84, 158, 160].

В то же время имеются данные о снижении уровня и активности фактора Виллебранда при Ph-негативных МПН, с чем связывают развитие у 12-20% пациентов (до 55% при ЭТ) синдрома Виллебранда, сопровождающегося повышенной кровоточивостью [79, 80, 133, 162]. Развитие приобретенного синдрома Виллебранда при Ph(-)МПН может быть обусловлено потерей крупных мультимеров фВ из-за усиления их протеолиза расщепляющей протеазой ADAMTS13 при повышенном напряжении сдвига, а также абсорбции фВ на поверхности тромбоцитов или других клеток опухолевого клона [79, 162].

Важным компонентом, обеспечивающим антикоагулянтную активность сосудистой стенки, является тромбомодулин (ТМ) [7]. Тромбомодулин представляет собой рецептор тромбина, экспрессируемый в большом количестве эндотелиальными клетками [10, 65]. Тромбин, поступающий в кровь из зоны повреждения, связывается с ТМ на интактных клетках эндотелия, где под действием комплекса тромбин/ТМ происходит активация протеина С [10]. Повышенное содержание растворимого ТМ (sТМ) свидетельствует о повреждении эндотелиальных клеток [7].

Повышение концентрации sТМ в плазме пациентов с Ph-негативными МПН отмечается в ряде работ [83, 104, 131, 160]. Так, плазменный уровень sТМ в группе пациентов с ИП и ЭТ значимо превышал показатели здоровых лиц по ранним данным Musolino C. et al., а также в

исследовании Falanga A. et al. [131, 160]. Существенное повышение содержания sTM в плазме пациентов с ПМФ относительно здоровых добровольцев отмечалось в работе Alvarez-Larra´n A. et al., указывая на активацию и повреждение эндотелия при ПМФ, сходно с ИП и ЭТ [104]. Подтверждая данные перечисленных исследований, значительно повышенный уровень TM описан у пациентов с МПН в сравнении с контрольной группой в работе Jensen M.K. et al., указывая на повреждение эндотелиальных клеток и нарушение эндотелиальной функции [83]. Однако отдельный анализ нозологических групп в исследовании Falanga A. et al. обнаружил существенное увеличение TM в сравнении с показателями здоровых лиц лишь у пациентов с ИП, в то время как незначительное повышение TM у больных ЭТ не достигало уровня статистической значимости [160], согласуясь с ранними данными Bellucci S. et al. [156]. Arellano-Rodrigo E. et al. также не обнаружили значимых различий по концентрации sTM у пациентов с ЭТ и группой здоровых добровольцев. При этом повышение уровня sTM было ассоциировано с наличием мутации JAK2 у больных ЭТ [158]. Данные другой работы группы авторов Musolino C. et al. свидетельствовали о значимом увеличении TM лишь у пациентов с хроническими МПН, имевшими тромбозы в анамнезе, относительно больных без тромботических эпизодов [100]. Терапия гидроксимочевиной, по-видимому, не влияла на уровень TM в группе пациентов с ЭТ и ИП [160].

Повышение концентрации sTM у пациентов с Ph-негативными МПН, отмеченное в ряде представленных работ, предполагает длительное повреждение эндотелиальных клеток, которое может вносить существенный вклад в патогенез тромбоэмболических событий у этих пациентов [83, 104, 131, 160]. В то же время в ряде исследований повышенный уровень sTM выявлялся не во всех нозологических формах Ph(-)МПН, либо только при наличии тромботического анамнеза или мутации JAK2 V617F [100, 158].

Одним из наиболее значимых тромбогенных факторов, образующихся в эндотелии и участвующих в гемостазе, является тканевой фактор (ТФ) [11]. Экспрессия ТФ эндотелиальными клетками повышается в ответ на повреждение или воспаление, что увеличивает гемостатический потенциал в месте повреждения. Повреждение эндотелия сосудистой стенки сопровождается экспозицией в кровь ТФ, который инициирует активацию свертывания крови [10]. По плазменному уровню растворимого ТФ у пациентов с ЭТ и ПМФ не выявлялось статистически значимых различий с группой здоровых добровольцев [104, 158]. Однако существенное повышение содержания ТФ отмечалось у JAK2 V617F-позитивных пациентов с ЭТ относительно носителей аллеля дикого типа, при этом плазменный уровень ТФ значимо коррелировал с аллельной нагрузкой JAK2 V617F [158].

1.2.3.2.3 Маркеры нарушения адгезивной функции эндотелия при Ph-негативных МПН

Выявление и оценка нарушений адгезивной функции сосудистой стенки возможны путем определения концентрации в крови растворимых форм адгезивных молекул эндотелия [124]. На луминальной поверхности эндотелиоцитов представлены P- и E-селектины, межклеточные и сосудистые клеточные молекулы адгезии (Inter-Cellular Adhesion Molecule-1, ICAM-1, и Vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1). Экспрессия молекул адгезии происходит под влиянием медиаторов воспаления, противовоспалительных цитокинов, окисленных ЛПНП, тромбина и других стимулов. При участии P- и E-селектинов осуществляется задержка и роллинг лейкоцитов, а ICAM-1 и VCAM-1, взаимодействуя с соответствующими лигандами лейкоцитов, обеспечивают полную остановку (адгезию) лейкоцитов. Повышение адгезивности эндотелия и неконтролируемая адгезия лейкоцитов в результате изменения количества и распределения адгезивных молекул на поверхности эндотелиальных клеток имеют большое значение в патогенезе эндотелиальной дисфункции и воспаления при различных заболеваниях, в том числе сердечно-сосудистой системы, а также онкологических процессах [7, 8, 9, 11, 181]. Наиболее часто в качестве маркера для выявления эндотелиальной дисфункции используют определение концентрации E-селектина, ICAM-1 и VCAM-1 [7, 181].

Значительное повышение уровня растворимых молекул адгезии растворимого E-селектина (sE-селектина) и растворимого P-селектина (sP-селектина) у пациентов с ИП и ЭТ относительно здоровых добровольцев описано в ранних работах исследовательской группы Musolino C. et al. [131]. По данным Belotti A. et al. уровень sE-селектина у больных ЭТ также значимо превышал показатели здоровых добровольцев [46]. Существенное увеличение P-селектина плазмы выявлялось у пациентов с ЭТ и ИП в сравнении с параметрами здоровых лиц в работе Cella G. et al., в то время как уровень E-селектина значимо превышал значения контрольной группы лишь при ИП [147]. Уровень sP-селектина был значительно повышен в крупной когорте пациентов с Ph-негативными МПН в сравнении с гипертензивной контрольной группой в исследовании Robertson B. et al., в то время как по уровню sE-селектина значимых различий не наблюдалось [154].

Более высокие значения плазменной концентрации sE-селектина отмечались у больных хроническими МПН, имевшими тромбозы в анамнезе, относительно пациентов без тромботических осложнений, повышенный уровень sP-селектина в зависимости от наличия тромбозов в анамнезе выявлялся лишь среди больных ЭТ [100, 131].

Значительное повышение содержания sP-селектина отмечалось у JAK2 V617F-позитивных пациентов с Ph(-)МПН в сравнении с носителями аллелей дикого типа и гипертензивной контрольной группой [154]. Однако по уровню sE-селектина не обнаруживалось различий в зависимости от мутационного статуса JAK2 V617F пациентов с ЭТ [46].

Результаты представленных работ по оценке уровня растворимых адгезивных молекул, продуцируемых эндотелием, в целом свидетельствуют о том, что пациенты с Ph-негативными МПН характеризуются нарушением паттерна растворимых селектинов, что отражает изменения активационного статуса сосудистых клеток [147]. Имеющиеся данные о повышении уровня растворимых E- и P-селектинов указывают на то, что у пациентов с ЭТ и ИП присутствует непрерывная активация тромбоцитов и эндотелия, а также повреждение эндотелия, которые могут вносить вклад в патогенез тромбоэмболических событий у этих пациентов [131].

Данные литературных источников по оценке изменений эндотелия у больных Ph-негативными МПН позволяют утверждать, что патогенез Ph(-)МПН сопровождается развитием эндотелиальной дисфункции. Активация тромбоцитов и лейкоцитов при Ph(-)МПН способствуют активации и повреждению эндотелия за счет вовлечения рецепторов адгезии, а также высвобождения протеаз, цитокинов и активных форм кислорода. Активные формы кислорода и протеазы активированных лейкоцитов могут вызывать прямой цитолиз и гибель клеток эндотелия. Дисфункция эндотелия у пациентов с Ph-негативными МПН в свою очередь способствует прогрессированию протромботического состояния при данных патологиях.

Таким образом, по данным литературы для всех компонентов системы гемостаза при Ph-негативных МПН характерны патологические особенности, в совокупности обуславливающие развитие тромботических осложнений. На настоящий момент трудно сказать, какое звено является ведущим в развитии гиперкоагуляции. Значимым фактором увеличения прокоагулянтного потенциала у пациентов с Ph(-)МПН выступает развитие АПС-резистентности, снижение чувствительности к тромбомодулину и активности естественных антикоагулянтов. Существенный вклад в усиление тромбообразования вносит состояние гиперактивации тромбоцитов, развивающееся в кровеносном русле больных Ph(-)МПН за счет взаимодействия с поврежденным эндотелием сосудов и активированными лейкоцитами, а также вследствие конститутивной активации механизмов передачи сигнала при наличии драйверных мутаций и повышенного оборота кровяных пластинок. Несомненна роль дисфункции эндотелия, подвергающегося патологическим изменениям вследствие активного воспалительного процесса при Ph-негативных МПН. В связи с многофакторным характером гемостатических изменений при Ph(-)МПН результаты исследований различных авторов часто противоречивы, что затрудняет выработку однозначных подходов к оценке протромботической

направленности системы гемостаза, применимых в клинической практике при обследовании больных.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Характеристика обследованной группы пациентов

В исследование было включено 124 пациента с Ph-негативными МПН (ЭТ, ИП, ПМФ), которые наблюдались и получали лечение в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России в 2017-2020 гг. Там же осуществлялась постановка диагноза в соответствии с критериями классификации ВОЗ 2016 г. [194]. Диагноз ЭТ имели 36 обследованных, ИП – 47 и ПМФ - 41 больной. Возраст пациентов колебался от 21 до 86 лет, медиана составила 55 лет. Группа контроля включала 68 практически здоровых добровольцев (возраст 30-73, медиана – 46 лет). Все пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Из 124 обследованных больных тромботические осложнения в анамнезе имел 31 человек (25,0%), в том числе 12 из 36 пациентов с ЭТ (33,3%), 14 из 47 пациентов с ИП (29,8%) и 5 из 41 - с ПМФ (12,2%). Из обследованных пациентов с Ph(-)МПН мутация JAK2 V617F была обнаружена у 92 человек (74,2%), в том числе у 25 (69,4%) больных ЭТ, 43 (91,5%) пациентов с ИП и 24 (58,5%) больных ПМФ. На момент включения в исследование 49 больных Ph(-)МПН получали только антиагрегантную терапию, 39 человек находились на циторедуктивной терапии (в том числе 29 пациентов в сочетании с антиагрегантной терапией), 14 человек получали таргетную терапию ингибитором янус-киназ руксолитинибом (в том числе 6 пациентов в сочетании с циторедуктивной терапией и 5 больных в сочетании с антиагрегантной терапией). Антиагрегантная терапия включала аспирин- и/или клопидогрел-содержащие препараты, а также тиклопидин. Циторедуктивная терапия была представлена гидроксикарбамидом, препаратами интерферона-альфа и анагрелидом. 22 пациента не получали специфического лечения как минимум в течение 10 дней до включения в исследование. Характеристика обследованных больных Ph-негативными МПН в соответствии с распределением по нозологическим группам и получаемой терапии представлена в таблице 1.

Таблица 1 - Состав обследованной группы пациентов с Ph-негативными МПН в соответствии с получаемой терапией

Диагноз / Терапия	ЭТ n=36	ИП n=47	ПМФ n=41	МПН n=124
Без терапии	5 (13,9%)	6 (12,8%)	11 (26,8%)	22 (17,7%)
Антиагрегантная терапия	21 (58,3%)	18 (38,3%)	10 (24,4%)	49 (39,5%)
Циторедуктивная терапия	3 (8,3%)	5 (10,6%)	2 (4,9%)	10 (8,1%)
Циторедуктивная терапия + антиагреганты	7 (19,4%)	17 (36,2%)	5 (12,2%)	29 (23,4%)
Руксолитиниб			7 (17,1%)	7 (5,6%)
Руксолитиниб+ антиагреганты			1 (2,4%)	1 (0,8%)
Руксолитиниб+ циторедуктивная терапия			2 (4,9%)	2 (1,6%)
Руксолитиниб+ циторедуктивная терапия + антиагреганты		1 (2,1%)	3 (7,3%)	4 (3,2%)

2.2 Преаналитическая подготовка

Взятие образцов периферической крови осуществляли путём пункции локтевой вены иглой диаметром 0,9 мм с широким просветом, самотёком. Полученные образцы для исследования плазменного звена гемостаза стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия (3,2% раствором цитрата натрия при взятии образцов крови для проведения теста генерации тромбина) в соотношении 9:1. Для выполнения скрининговых тестов коагулограммы и определения активности коагуляционных факторов и антитромбина получали обеднённую тромбоцитами плазму путём центрифугирования при 150 g в течение 15 мин при комнатной температуре. Бедную тромбоцитами плазму (platelet-poor plasma, PPP), необходимую для определения активности протеина С, уровня свободного протеина S, содержания и активности фактора Виллебранда, концентрации свободного тромбомодулина, а также для выполнения ТГТ, получали при помощи двойного центрифугирования при комнатной температуре: в течение 10 минут при 120 g и затем в течение 30 мин при 2500 g. Полученные образцы PPP использовали для анализа или аликвотировали и хранили при температуре -70°С до момента проведения исследования. Для исследования агрегации тромбоцитов образцы крови стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 4:1 и далее центрифугировали в течение 10 минут при 120 g, получая богатую тромбоцитами плазму (platelet-rich plasma, PRP). Часть отобранной PRP центрифугировали повторно в течение 30 минут при 2500 g,

аутологичные образцы полученной PPP использовали для калибровки уровня 100% светопропускания при агрегатометрии.

2.3 Методы исследования

Определение параметров скрининговой коагулограммы, таких как индекс активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ), протромбиновый тест по Квику (ПТ) и концентрация фибриногена, а также активности фактора VIII (фVIII), антитромбина (АТ), протеина С (РС), уровня свободного протеина S (PS) и фактора Виллебранда (фВ) осуществляли на автоматических коагулометрах серии ACL: ACL Top 300 CTS и ACL Elite Pro (Automated Coagulation Laboratory, Instrumentation Laboratory, США) с использованием реактивов HemosIL (Instrumentation Laboratory, США) согласно рекомендациям производителя. АПТВ, ПТ, концентрацию фибриногена, а также активность фVIII определяли при помощи клоттинговых методов, основанных на измерении времени, необходимого для образования сгустка при добавлении соответствующих реагентов. Для оценки активности фVIII использовали модифицированный тест АПТВ, в котором к разведённой плазме пациента добавляется плазма, дефицитная по анализируемому фактору, при этом коррекция удлинения времени свёртывания АПТВ пропорциональна активности фактора в плазме пациента. Определение активности АТ и РС проводили с помощью хромогенных методов, основанных на уменьшении концентрации хромогенного субстрата в результате его расщепления комплексом антитромбина плазмы с реагентом фактора Ха в первом случае или при активации протеина С in vitro во втором, при этом поглощение света пропорционально активности определяемого маркера в тестируемом образце. Уровень свободного PS и фВ оценивали при помощи иммунотурбидиметрических методов, основанных на агглютинации латексных частиц, степень которой прямо пропорциональна концентрации определяемого маркера в образце и измеряется по уменьшению светопропускания.

Тест генерации тромбина (ТГТ) выполняли в бедной тромбоцитами плазме (PPP) методом калиброванной автоматизированной тромбинографии по Hemker H.C. et al. [40, 203] при помощи планшетного флюориметра (Fluoroskan Ascent, ThermoFisher Scientific, Финляндия), оборудованного диспенсером. Постановку теста производили в 96-луночных круглодонных планшетах (Immulon 2HB, ThermoFisherScientific, Финляндия). Исследование основано на активации коагуляции в плазме в присутствии триггерного реагента (PPP-Reagent-TM, Thrombinoscope BV, Нидерланды), представляющего собой смесь рекомбинантного человеческого тканевого фактора и отрицательно заряженных прокоагулянтных фосфолипидов (фосфатидилсерина 20%, фосфатидилэтаноламина 20% и фосфатидилхолина 60%) в конечной

концентрации 5 pM и 4 μM соответственно. Проводили параллельную постановку ТГТ без тромбомодулина и с добавлением рекомбинантного человеческого тромбомодулина (ТМ) (PPP-Reagent+TM, Thrombinoscope BV, Нидерланды). Для калибровки результатов генерации тромбина использовали тромбиновый калибратор (Thrombin Calibrator, Thrombinoscope BV, Нидерланды), представляющий собой синтетический аналог тромбина с заведомо известной активностью. Анализ всех экспериментальных точек (в отсутствии и присутствии ТМ), а также калибратора, проводили в дублях. После автоматического внесения в каждую лунку планшета специфичного низко-аффинного флюорогенного субстрата тромбина (Fluo-Substrate, Thrombinoscope BV, Нидерланды) в смеси с содержащим хлорид кальция буфером (Fluo-Buffer, Thrombinoscope BV, Нидерланды) немедленно запускалось измерение флюоресценции, продолжавшееся через 20-секундные интервалы на протяжении всего процесса генерации тромбина. Измерение флюоресценции осуществлялось при 37°C при длинах волн возбуждения и эмиссии 390 нм и 460 нм соответственно. На основе данных изменения флюоресценции при помощи программного обеспечения Thrombinoscope (Thrombinoscope BV, Нидерланды) осуществлялось построение и расчет показателей кривых генерации тромбина. Для оценки результатов, отражающих количественные и динамические характеристики генерации тромбина, использовали такие параметры, как эндогенный тромбиновый потенциал (Endogenous thrombin potential, ETP, нМ×мин), пиковое количество тромбина (Peak thrombin, нМ) и скорость генерации тромбина (нМ/мин). ETP соответствует площади под кривой генерации тромбина и отражает общее количество образованного фермента. Peak thrombin – максимальное количество тромбина, образующееся в процессе его генерации в образце плазмы. Чувствительность к антикоагулянтному действию ТМ (STM), которая характеризует эффективность работы системы протеина С, рассчитывали как процент падения показателей ETP (STM_{ETP}) и Peak thrombin ($STM_{Peak\ thrombin}$) после добавления ТМ.

Определение ристоцетин-кофакторной активности фактора Виллебранда (VWF:RCO) проводили в PPP пациентов с помощью анализатора агрегации тромбоцитов AP 2110 (SOLAR, Белоруссия) с использованием ристоцетина (CHRONO-PAR RISTOCETIN, CHRONO-LOG Corporation, США) с концентрацией 50 мг/мл в трис-солевом буфере (Tris 0,01M, NaCl 0,15M, pH 7,4) и реагента «Тромбоциты человека» («Технология-Стандарт», Россия), представляющего собой стандартную взвесь формалинизированных тромбоцитов. Пул донорской бедной тромбоцитами плазмы, состоящий из плазмы 15–20 доноров, смешенной в равных объемах, использовали для построения калибровочной кривой. Серию разведений пула донорской плазмы, а также плазмы больных готовили в трис-солевом буфере. Также трис-солевой буфер использовали для установки 100% светопропускания. В пластиковые кюветы, предназначенные для работы на агрегометре, размещали подготовленную взвесь тромбоцитов с ристоцетином,

опускали в кюветы магнитные мешалки и устанавливали их в блок предварительного нагрева (37°С) на 3–5 минут, после чего добавляли исследуемую плазму. Конечная концентрация ристоцетина составляла 1 мг/мл. Запись процесса производили в течение 1 мин, после чего регистрацию останавливали и определяли амплитуду агрегации (%). Если зарегистрированное значение выходило за пределы показателей стандартной кривой, измерение проводили в другом разведении плазмы. В соответствии с результатом измерения амплитуды агрегации при определенном разведении исследуемой плазмы отмечали уровень активности фВ, который умножали на соответствующий фактор разведения. Рассчитанная величина являлась окончательным результатом, отражающим уровень активности фВ (VWF:RCO) в исследуемой пробе.

Оценку функциональной активности тромбоцитов проводили в PRP пациентов с помощью индуцированной агрегации по методу Борна на 4-канальном анализаторе агрегации тромбоцитов АТ-02 (НПФ «Медицина-Техника», Россия). Метод основан на непрерывной регистрации изменений светопропускания перемешиваемой и термостатируемой суспензии тромбоцитов, происходящих под действием агрегирующих агентов. Для индукции агрегации использовали следующие реагенты: АДФ (CHRONO-PAR ADP, CHRONO-LOG Corporation, США) в конечной концентрации 1 и 5 мкМ, коллаген (CHRONO-PAR COLLAGEN, CHRONO-LOG Corporation, США) в конечной концентрации 2 мкг/мл и ристоцетин (CHRONO-PAR RISTOCETIN, CHRONO-LOG Corporation, США) в конечной концентрации 1,1 мг/мл. Исследование выполнялось в термостатируемой ячейке при температуре 37°С, скорость вращения магнитной мешалки составляла 750 об/мин, длина волны 540 нм. Для установки 0% светопропускания на агрегометре использовалась PRP пациента, аутологичная PPP - для установки 100% светопропускания. Адекватная оценка агрегационных характеристик с использованием данного метода возможна при количестве тромбоцитов в плазме от $150x10^9$/л до $600x10^9$/л. При числе тромбоцитов в PRP ниже $150x10^9$/л образцы не включали в анализ. Если количество кровяных пластинок в исследуемой плазме было выше $600x10^9$/л, её разбавляли путём добавления аутологичной PPP до достижения необходимой концентрации. В остальных случаях число тромбоцитов в PRP не приводили к стандартизованным значениям. Для количественной оценки агрегации тромбоцитов определяли значение начальной скорости (V, %/мин.) и максимальной амплитуды (MA, %) кривой агрегации.

Определение уровня растворимого тромбомодулина (sTM) проводили в PPP пациентов при помощи набора для твёрдофазного фермент-связанного иммуносорбентного анализа по принципу «сэндвич» (Human sThrombomodulin ELISA, Hycult Biotech, Нидерланды). Исследуемые пробы и стандартные образцы с известной концентрацией рекомбинантного тромбомодулина инкубировали в течение 60 мин. при температуре 20-25°С в ячейках

микропланшета, покрытых антителами к sTM человека. После 4-кратного промывания в ячейки добавляли меченые биотинилированные антитела, связывающиеся с зафиксированным sTM, и инкубировали в течение 60 мин. в тех же условиях. После аналогичной процедуры отмывки проводили инкубацию в течение 60 мин. с конъюгатом стрептавидина и пероксидазы, связывающимся с мечеными биотинилированными антителами. После очередной 4-кратной промывки в ячейки вносили раствор субстрата пероксидазы тетраметилбензидина. Ферментативную реакцию останавливали приблизительно через 30 мин. путем добавления щавелевой кислоты. Оптическую плотность измеряли с помощью планшетного фотометра Sunrise (Tecan Austria GmbH, Австрия) при длине волны 450 нм. На основе полученных значений стандартных образцов с известной концентрацией sTM строили калибровочную кривую, по которой затем определяли уровень sTM в исследуемых пробах.

Неинвазивное исследование эндотелиальной функции осуществляли методом периферической артериальной тонометрии (peripheral arterial tonometry, PAT) с помощью аппарата EndoPAT 2000 (Itamar Medical, Израиль). Метод PAT служит для оценки вазомоторной функции эндотелия микрососудистого русла и основан на регистрации изменений пульсового объёма пальца при реактивной гиперемии с помощью пальцевых плетизмографических датчиков. Развитие реактивной гиперемии достигается в результате 5-минутной артериальной окклюзии предплечья при помощи манжеты сфингоманометра [149]. Обследование проводили натощак с требованием воздержаться от курения как минимум в течение 2 ч. до теста, а также с ограничением приема вазоактивных препаратов за 24 ч. до исследования. При проведении тестирования пациенты комфортно располагались в расслабленном положении в тихой комнате с температурой воздуха 22-24°C. Пальцевые датчики располагали на указательные пальцы обеих рук. Манжету размещали на предплечье одной из конечностей, сигнал с противоположной конечности служил в качестве референтного. Регистрация сигнала осуществлялась непрерывно в течение 6 мин покоя, 5 мин окклюзии и 5 мин после декомпрессии манжеты. Реактивный гиперемический ответ артерий пальцев, характеризующий способность эндотелия к NO-зависимой вазодилатации, оценивали по индексу реактивной гиперемии (reactive hyperemia index, RHI) [37], рассчитываемому при помощи программного обеспечения EndoPAT 2000 (Itamar Medical, Израиль) по формуле: RHI = (A/B) / (C/D), где

A - амплитуда постоккюзионной пульсовой волны (pulse wave amplitude, PWA) окклюзированной руки,

B - исходная PWA окклюзированной руки,

C - постокклюзионная PWA противоположной руки,

D - исходная PWA противоположной руки.

Пациентам с Ph-негативными МПН, включенным в исследование, определяли наличие и аллельную нагрузку мутации JAK2V617F методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции с помощью «Набора реагентов для обнаружения мутации JAK2V617F» (Синтол, Россия). Определение проводилось в лаборатории молекулярной генетики ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России.

Статистическую обработку данных осуществляли при помощи программ Microsoft Excel 2007 и STATISTICA 6.0. Исследуемые выборки не удовлетворяли критериям нормального распределения, что обусловило применение непараметрических методов статистического анализа. Для представления результатов использовали медиану (Me) и интерквартильный интервал (Q1-Q3). Для сравнения 2-х групп применяли U-тест Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при $p<0,05$. При сравнении 3-х и более выборок использовали H-тест Краскела-Уоллиса, на наличие значимых различий между группами указывали значения $p<0,05$. При выявлении значимости по результатам применения теста Краскела-Уоллиса для определения различий между конкретными группами проводили попарные апостериорные сравнения групп с помощью теста Манна-Уитни. При этом для устранения проблемы множественных сравнений применяли поправку Бонферрони, скорректированный критический уровень статистической значимости составлял $p'=1–0,95^{1/n}$, где n – количество производимых попарных сравнений. Для выявления взаимосвязей между исследуемыми параметрами использовали ранговый коэффициент корреляции Спирмена, корреляционную связь считали статистически значимой при $p<0,05$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Исследование плазменного звена гемостаза у пациентов с Ph-негативными МПН

3.1.1. Особенности плазменного звена гемостаза, характеризующие пациентов с Ph-негативными МПН

Для выявления особенностей гемостаза, характерных для пациентов с Ph-негативными МПН, на первом этапе исследования оценивали изменения показателей плазменного звена в общей группе больных в сравнении с данными контрольной группы здоровых добровольцев. Результаты сравнения параметров скрининговой коагулограммы и активности ряда коагуляционных факторов представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Показатели скрининговой коагулограммы и активность коагуляционных факторов у пациентов с Ph-негативными МПН и в контрольной группе (Медиана, Q1-Q3)

Показатели	Контрольная группа	Ph(-)МПН (n=124)	p
Индекс АПТВ	1,02 (0,98-1,07) (n=29)	1,09 (0,99-1,15)	0,011
ПТ, %	93,4 (91,2-105,4) (n=30)	86,3 (76,8-94,9)	0,00005
Фибриноген, г/л	2,7 (2,5-2,9) (n=33)	3,34 (2,81-4,13)	0,00001
Активность фVIII, %	104,0 (85,0-130,0) (n=37)	130,5 (102,8-159,0)	0,0002
Активность фВ, %	97,0 (84,8-110,0) (n=68)	99,0 (75,0-130,0)	0,708

Примечание: p – уровень статистической значимости при сравнении с контрольной группой

В общей группе обследованных больных практически все показатели коагулограммы, кроме активности фактора Виллебранда (фВ), значимо отличались от таковых у здоровых лиц (таблица 2). Обращала на себя внимание направленность выявленных изменений. Так, если временные показатели (индекс АПТВ и ПТ) указывали на наличие гипокоагуляционных сдвигов, то концентрация фибриногена и активность фактора VIII, наоборот, свидетельствовали о развитии гиперкоагуляции. Отмечено наличие прямой корреляции между активностью фVIII и уровнем фибриногена (R=0,37 p=0,00002). Известно, что увеличение данных показателей отражает степень выраженности воспалительного процесса и является независимым фактором риска развития тромботических осложнений. Представляет интерес, что, несмотря на

отсутствие значимых отличий по активности фВ у пациентов с Ph(-)МПН и здоровых добровольцев, в группе больных отмечалась прямая корреляция этого показателя с уровнем фибриногена (R=0,25 p=0,006). О влиянии воспалительного процесса на состояние плазменного гемостаза свидетельствовало также наличие обратной корреляционной зависимости между ПТ и числом лейкоцитов крови (R=-0,22 p=0,03).

Состояние гемостаза непосредственно зависит от действия естественных антикоагулянтов, таких как антитромбин (АТ) и система протеина С, плазменными составляющими которой являются протеин С (РС) и свободный протеин S (PS). Результаты сравнительного анализа активности АТ, РС и уровня свободного PS у больных Ph-негативными МПН и контрольной группы представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Активность/уровень естественных антикоагулянтов у пациентов с Ph-негативными МПН и в контрольной группе (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа	Ph(-)МПН (n=124)	p
Активность АТ, %	91,0 (85,0-99,0) (n=43)	102,0 (94,4-114,0)	0,00002
Активность РС, %	102,0 (89,5-114,3) (n=32)	92,5 (77,3-106,8)	0,007
Уровень свободного PS, %	123,6 (117,0-130,7) (n=14)	80,0 (69,3-92,0)	<0,000001

Примечание: p – уровень статистической значимости при сравнении с контрольной группой

Значимые отличия между пациентами с Ph-негативными МПН и здоровыми людьми отмечены для всех исследованных показателей (таблица 3). На фоне увеличения активности АТ у больных Ph(-)МПН выявлялась низкая активность РС и ещё более существенное падение уровня свободного PS, что может свидетельствовать о сниженной активности антикоагулянтной системы протеина С в целом. Активность РС напрямую коррелировала с уровнем свободного PS (R=0,37 p=0,00002). Отмечено влияние воспалительного процесса на уровень свободного PS, которое выражалось в наличии обратной корреляционной связи между данным показателем и числом лейкоцитов крови (R=-0,29 p=0,005).

Для оценки суммарного действия про- и антикоагулянтных факторов на состояние плазменного звена гемостаза использовали интегральный тест генерации тромбина (ТГТ) в постановке без ТМ и с добавлением такового. Параметры ТГТ у пациентов с Ph-негативными МПН и в контрольной группе представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Показатели теста генерации тромбина у пациентов с Ph-негативными МПН и в контрольной группе (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа	Ph(-)МПН (n=124)	p
Скорость, нМ/мин	95,4 (83,8-113,2) (n=32)	51,8 (36,7-76,9)	<0,000001
ETP, нМ*мин	1642,3 (1489,9-1777,0) (n=34)	1449,9 (1233,6-1712,6)	0,007
Peak thrombin, нМ	285,6 (265,5-311,8) (n=34)	207,5 (166,0-253,7)	<0,000001
STM_{ETP}, %	52,9 (47,8-57,7) (n=34)	31,1 (19,7-46,0)	<0,000001
$STM_{Peak\ thrombin}$, %	42,1 (36,2-47,0) (n=33)	17,2 (7,3-26,5)	<0,000001

Примечание: p – уровень статистической значимости при сравнении с контрольной группой

У обследованных больных по всем параметрам ТГТ обнаружены существенные отличия от показателей контрольной группы. Выявленные изменения носили разнонаправленный характер. Падение скорости генерации тромбина, низкие значения эндогенного потенциала (ETP) и пиковой концентрации тромбина (Peak thrombin) у больных Ph(-)МПН свидетельствуют о снижении уровня и замедлении процесса генерации тромбина у пациентов при стандартных условиях проведения ТГТ. В то же время при добавлении ТМ в реакционную смесь отмечено выраженное уменьшение чувствительности к ТМ как по падению ETP (STM_{ETP}), так и по падению Peak thrombin ($STM_{Peak\ thrombin}$), что указывает на нарушение работы естественных антикоагулянтов системы протеина С и является общепризнанным фактором риска тромботических осложнений.

Отмечена прямая корреляция значений чувствительности к ТМ с показателями активности PC (R=0,34 p=0,0002 для STM_{ETP} и R=0,29 p=0,002 для $STM_{Peak\ thrombin}$) и уровня свободного PS (R=0,37 p=0,00005 и R=0,32 p=0,0005 соответственно). Также обнаружена обратная корреляция между чувствительностью к ТМ по обоим показателям и активностью фVIII (R=-0,28 p=0,002 в обоих случаях). Кроме того, наблюдалась прямая зависимость между величиной ETP и уровнем свободного протеина S, а также активностью протеина С (R=0,454 p<0,000001 и R=0,217 p=0,019 соответственно). Необходимо отметить, что выявлена обратная корреляционная связь скорости генерации тромбина с уровнем гемоглобина (R=-0,26 p=0,016) и числом эритроцитов крови (R=-0,25 p=0,034).

Таким образом, при оценке общей группы обследованных больных Ph-негативными МПН в тестах скрининговой коагулограммы наблюдались разнонаправленные изменения изучаемых параметров плазменного звена гемостаза. В то же время результаты ТГТ свидетельствуют о снижении как протромботического потенциала (ETP), так и эффективности

антикоагулянтной системы PC (падение ETP и Peak thrombin после добавления TM), что может быть направлено на поддержание баланса между про- и антикоагулянтными влияниями. При этом как протромботические, так и гипокоагуляционные изменения связаны с особенностями, характерными для данной группы заболеваний, - повышением числа лейкоцитов, а также уровня гемоглобина и эритроцитов соответственно.

3.1.2. Особенности плазменного звена гемостаза, характерные для пациентов с различными нозологическими формами Ph-негативных МПН

Для выявления особенностей плазменного звена гемостаза, характерных для пациентов с различными нозологиями Ph-негативных МПН, следующим этапом провели сравнительный анализ исследуемых параметров между здоровыми лицами и больными ЭТ, ИП и ПМФ, а также между показателями отдельных нозологических групп. Результаты определения основных показателей коагулограммы и активности некоторых коагуляционных факторов представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Показатели скрининговой коагулограммы и активность коагуляционных факторов в отдельных нозологических группах пациентов с Ph-негативными МПН и контрольной группе (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа	ЭТ (n=36)	ИП (n=47)	ПМФ (n=41)	Сравнение нозологических групп пациентов (Критерий Краскела-Уоллиса)
Индекс АПТВ	1,02 (0,98-1,07) (n=29)	1,10 * (1,01-1,14)	1,05 (1,00-1,10)	1,10 * (0,97-1,25)	H=3,195 p=0,203
ПТ, %	93,4 (91,2-105,4) (n=30)	90,5 (83,8-102,0)	86,3 * (75,4-92,7)	84,0 * (73,1-91,7)	H=8,882 p=0,012
Фибриноген, г/л	2,7 (2,5-2,9) (n=33)	3,2 * (2,8-3,8)	3,3 * (2,9-3,9)	3,8 * (2,8-4,5)	H=2,590 p=0,274
Активность фVIII, %	104,0 (85,0-130,0) (n=37)	116,0 (100,3-138,8)	132,0 * (102,5-157,5)	141,0 * (115,0-161,0)	H=3,981 p=0,137
Активность фВ, %	97,0 (84,8-110,0) (n=68)	97,0 (74,0-130,0)	105,0 (75,5-127,5)	98,0 (75,0-135,0)	H=0,248 p=0,883

Примечание: * p<0,017 при сравнении с контрольной группой (скорректированный критический уровень статистической значимости при проведении 3-х сравнений)

Сравнение показателей трёх независимых выборок с контрольной группой требовало корректировки критического уровня статистической значимости, который составил p´=0,017.

У пациентов, принадлежащих к разным нозологиям Ph(-)МПН, наблюдались сходные с общей группой особенности, выраженные в разной степени (таблица 5). У больных ЭТ по сравнению с контрольными значениями обнаружено наименьшее количество патологических показателей (индекс АПТВ и концентрация фибриногена). Проведение корреляционного анализа выявило прямую зависимость уровня фибриногена у пациентов с ЭТ с числом тромбоцитов крови (R=0,39, p=0,042). У пациентов с ИП изменения встречались чаще. От контрольных параметров значимо отличались ПТ, концентрация фибриногена и активность фVIII. Ещё большие расхождения между нормальными значениями и направленностью выявленных изменений были обнаружены у больных ПМФ. Резкое снижение показателя ПТ и повышение индекса АПТВ сопровождалось как увеличением концентрации фибриногена, так и ростом активности фVIII. При этом активность фВ значимо не отличалась от показателей контрольной группы у пациентов всех 3-х нозологий.

Различия между группами больных по отдельным показателям определяли с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса (H), который используется для сравнения 3-х и более независимых выборок. Значения H и уровня значимости (p) для каждого исследуемого показателя приведены в таблице 5, отличия между группами значимы при p<0,05. В результате были выявлены значимые различия между нозологическими группами пациентов с Ph(-)МПН лишь по показателям ПТ (H=8,882; p=0,012). Далее для определения различий между конкретными группами больных проводили попарные апостериорные сравнения. Для устранения проблемы множественных сравнений применяли поправку Бонферрони, скорректированный критический уровень статистической значимости при проведении 3-х попарных сравнений составлял p´=0,017. Проведённый анализ показал значимое снижение ПТ у пациентов с ИП и ПМФ относительно больных ЭТ (p=0,013 и p=0,007 соответственно). Показатели ПТ в группах больных ИП и ПМФ между собой существенно не отличались (p=0,613).

Данные по сравнению активности/уровня естественных антикоагулянтов в отдельных нозологических группах пациентов с Ph-негативными МПН и у здоровых добровольцев представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Активность/уровень естественных антикоагулянтов в отдельных нозологических группах больных Ph-негативными МПН и контрольной группе (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа	ЭТ (n=36)	ИП (n=47)	ПМФ (n=41)	Сравнение нозологических групп пациентов (Критерий Краскела-Уоллиса)
Активность АТ, %	91,0 (85,0-99,0) (n=43)	102,5 * (98,7-108,5)	97,3 * (92,2-108,5)	108,0 * (97,9-119,0)	H=6,530 p=0,038
Активность РС, %	102,0 (89,5–114,3) (n=32)	97,5 (82,8-108,0)	89,5 * (78,0-106,8)	90,0 * (69,3-105,3)	H=2,302 p=0,316
Уровень свободного PS, %	123,6 (117,0-130,7) (n=14)	80,0 * (75,8-96,3)	85,0 * (70,3-93,5)	72,5 * (59,8-88,5)	H=5,817 p=0,055

Примечание: * p<0,017 при сравнении с контрольной группой (скорректированный критический уровень статистической значимости при проведении 3-х сравнений)

У обследованных пациентов с Ph(-)МПН во всех нозологических группах активность АТ была выше контрольных значений. При этом наиболее высокий уровень отмечен у больных ПМФ (таблица 6). Сравнение нозологических групп между собой при помощи критерия Краскела-Уоллиса указало на значимые различия по данному показателю (H=6,530 p=0,038). Однако при попарном сравнении групп наблюдавшееся повышение активности АТ у больных ЭТ и особенно ПМФ относительно пациентов с ИП не достигало статистической значимости (p=0,078 и p=0,023 соответственно, скорректированный критический уровень значимости с учетом поправки Бонферрони p′=0,017). Значения активности АТ между группами пациентов с ЭТ и ПМФ также существенно не отличались (p=0,218). Повышенной активности АТ сопутствовала низкая активность РС, которая достигала значимых различий с контрольными показателями у пациентов с ИП и ПМФ. Сравнение нозологических групп между собой не выявило значимых отличий по активности РС (таблица 6). Уровень свободного PS был существенно снижен относительно нормальных величин во всех обследованных группах. У пациентов с ПМФ отмечались наиболее низкие значения данного параметра. Сравнение нозологических групп между собой с использованием критерия Краскела-Уоллиса подтверждало существенные отличия по уровню свободного PS (H=5,817 p=0,055). Наиболее выраженное снижение уровня свободного PS при ПМФ было значимо при попарном сравнении относительно показателей пациентов с ЭТ (p=0,015), но не достигало статистической значимости относительно больных ИП (p=0,094). Группы пациентов с ЭТ и ИП существенно не отличались между собой по данному параметру (p=0,620).

Результаты сравнения параметров ТГТ по отдельным нозологическим группам обследованных пациентов с Ph-негативными МПН представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Показатели теста генерации тромбина в отдельных нозологических группах Ph-негативных МПН и контрольной группе (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа	ЭТ (n=36)	ИП (n=47)	ПМФ (n=41)	Сравнение нозологических групп пациентов (Критерий Краскела-Уоллиса)
Скорость, нМ/мин	95,4 (83,8-113,2) (n=32)	53,0 * (38,4-67,0)	49,5 * (35,8-66,6)	57,0 * (38,5-87,7)	H=1,937 p=0,380
ETP, нМ*мин	1642,3 (1489,9-1777,0) (n=34)	1529,6 (1374,6-1738,5)	1407,8 (1268,5-1778,0)	1261,5 * (1154,5-1577,7)	H=8,541 p=0,014
Peak thrombin, нМ	285,6 (265,5-311,8) (n=34)	206,2 * (177,5-238,9)	211,8 * (167,3-252,5)	207,3 * (157,3-269,2)	H=0,143 p=0,931
STM $_{ETP}$, %	52,9 (47,8-57,7) (n=34)	35,9 * (18,4-50,4)	34,5 * (25,4-47,7)	28,6 * (13,4-41,8)	H=4,960 p=0,084
STM $_{Peak\ thrombin}$, %	42,1 (36,2-47,0) (n=33)	17,9 * (8,0-29,0)	17,8 * (10,9-26,4)	14,5 * (4,3-26,0)	H=2,628 p=0,269

Примечание: * p<0,017 при сравнении с контрольной группой (скорректированный критический уровень статистической значимости при проведении 3-х сравнений)

Отмеченные выше для пациентов с Ph(-)МПН в целом изменения параметров ТГТ сохранялись для отдельных нозологических групп, но отличались различной степенью выраженности (таблица 7). При сравнении с контрольной группой все исследованные показатели, кроме ETP у пациентов с ЭТ и ИП, претерпевали существенные отклонения, указывая на падение скорости и количества образованного тромбина, а также на снижение чувствительности к ТМ.

Сравнение показателей отдельных нозологий между собой при помощи критерия Краскела-Уоллиса подтвердило статистическую значимость различий между группами только по значениям ETP (H=8,541 p=0,014). При попарном сравнении групп данный параметр у пациентов с ПМФ был значимо снижен относительно больных ЭТ (p=0,006), но изменения не достигали статистической значимости относительно пациентов с ИП (p=0,031, скорректированный критический уровень значимости с учетом поправки Бонферрони p´=0,017). Значения ETP при ЭТ и ИП не обнаруживали между собой существенных отличий (p=0,446).

Проведение корреляционного анализа обнаружило достаточно тесную взаимосвязь между отдельными показателями клинического анализа крови и ТГТ у пациентов с ИП. Так, обратная корреляция была выявлена между уровнем гемоглобина, гематокритом, числом эритроцитов и скоростью генерации тромбина (R=-0,38 p=0,048, R=-0,43 p=0,019, R=-0,43 p=0,028 соответственно), а также показателем Peak thrombin (R=-0,40 p=0,039, R=-0,50 p=0,005 и R=-0,48 p=0,013, соответственно). Кроме того, в той же группе больных отмечена обратная корреляция между параметрами ETP и уровнем гематокрита (R=-0,45 p=0,015). У пациентов других обследованных групп (ЭТ и ПМФ) подобные взаимосвязт выявлены не были.

Таким образом, при анализе показателей плазменного звена гемостаза в отдельных нозологических группах пациентов с Ph-негативными МПН выявлены особенности, в целом сходные с отмеченными выше в общей группе обследованных больных, но отличавшиеся по степени выраженности в различных нозологиях. Наиболее существенные отличия от показателей контрольной группы были обнаружены у пациентов с ПМФ. Больные этой же группы демонстрировали наибольшее расхождение между направленностью выявленных изменений. Значимое снижение таких параметров как ПТ, ETP и уровень свободного PS отличали больных ПМФ от пациентов с ЭТ. Разница, отмеченная между исследованными показателями при ПМФ и ИП, как правило, не достигала статистической значимости, но обнаруживала тенденцию к менее выраженным изменениям у больных ИП. Наименьшие, по сравнению с пациентами с ИП и ПМФ, отклонения от нормальных значений были характерны для группы больных ЭТ.

3.1.3. Особенности плазменного звена гемостаза пациентов с Ph-негативными МПН в зависимости от наличия тромбозов в анамнезе

Наличие тромбозов в анамнезе является одним из факторов риска развития тромботических осложнений у пациентов с Ph-негативными МПН, данный показатель включён в международные прогностические шкалы риска развития тромбозов у больных ИП [215] и ЭТ (IPSET-thrombosis) [62]. В связи с этим была проведена оценка влияния тромботического анамнеза на показатели плазменного звена гемостаза среди обследованных больных Ph(-)МПН (таблицы 8-10).

Таблица 8 - Показатели плазменного гемостаза у пациентов с ЭТ в зависимости от наличия тромбозов в анамнезе (Медиана, Q1-Q3)

Показатели		ЭТ (n=36)		p
		без тромбозов в анамнезе (n=24)	с тромбозами в анамнезе (n=12)	
Показатели скрининговой коагулограммы и активность коагуляционных факторов	Индекс АПТВ	1,10 (1,01-1,15)	1,10 (1,03-1,11)	0,674
	ПТ, %	92,0 (85,7-102,5)	90,5 (80,3-96,9)	0,247
	Фибриноген, г/л	3,0 (2,8-3,4)	3,7 (3,2-4,4)	0,042
	Активность фVIII, %	112,5 (101,8-133,0)	124,0 (87,0-162,8)	0,663
	Активность фВ, %	93,0 (74,0-130,0)	106,5 (80,5-133,8)	0,662
Активность/ уровень естественных антикоагулянтов	Активность АТ, %	103,5 (100,0-111,0)	100,2 (97,3-107,3)	0,322
	Активность РС, %	99,0 (84,5-112,0)	93,5 (76,8-102,8)	0,169
	Уровень свободного PS, %	80,0 (74,8-95,5)	82,0 (77,5-96,3)	0,906
ТГТ	Скорость, нМ/мин	53,1 (39,9-67,0)	48,5 (36,0-67,3)	0,885
	ETP, нМ*мин	1517,6 (1374,6-1786,0)	1568,6 (1386,3-1736,7)	0,857
	Peak thrombin, нМ	211,7 (179,2-238,9)	198,2 (174,8-245,4)	0,914
	STM_{ETP}, %	36,8 (24,4-48,2)	23,0 (16,5-51,3)	0,428
	$STM_{Peak\ thrombin}$, %	19,3 (12,7-28,7)	9,8 (4,4-28,4)	0,387

Примечание: p – уровень статистической значимости при сравнении 2-х групп пациентов

Среди пациентов с ЭТ значимые отличия в зависимости от тромботического анамнеза были выявлены только по уровню фибриногена, показатели которого у больных с тромбозами превышали значения пациентов без тромботических осложнений (p=0,042, таблица 8).

В таблице 9 приведены данные сравнительного анализа параметров плазменного звена гемостаза у больных ИП в зависимости от тромботического анамнеза.

Таблица 9 - Показатели плазменного гемостаза у пациентов с ИП в зависимости от наличия тромбозов в анамнезе (Медиана, Q1-Q3)

Показатели		ИП (n=47)		p
		без тромбозов в анамнезе (n=33)	с тромбозами в анамнезе (n=14)	
Показатели скрининговой коагулограммы и активность коагуляционных факторов	Индекс АПТВ	1,07 (1,00-1,10)	1,02 (0,98-1,10)	0,683
	ПТ, %	86,3 (76,0-91,9)	86,1 (76,2-92,3)	0,954
	Фибриноген, г/л	3,2 (2,8-3,6)	3,7 (3,3-4,0)	0,053
	Активность фVIII, %	125,0 (97,0-152,0)	147,5 (123,0-167,3)	0,021
	Активность фВ, %	105,0 (74,0-125,0)	110,0 (84,3-135,0)	0,221
Активность/ уровень естественных антикоагулянтов	Активность АТ, %	97,0 (90,3-109,0)	98,0 (93,4-102,5)	0,789
	Активность РС, %	89,5 (77,5-106,3)	94,0 (79,3-107,8)	0,667
	Уровень свободного PS, %	84,0 (67,8-92,5)	85,5 (78,5-94,8)	0,650
ТГТ	Скорость, нМ/мин	52,6 (41,2-66,6)	37,5 (33,9-67,5)	0,270
	ETP, нМ*мин	1575,8 (1288,4-1791,2)	1362,8 (1268,0-1546,8)	0,305
	Peak thrombin, нМ	214,3 (170,2-257,8)	181,5 (157,0-218,4)	0,199
	STM_{ETP}, %	31,1 (25,4-47,1)	42,8 (26,7-50,6)	0,521
	$STM_{Peak\ thrombin}$, %	17,2 (11,3-24,7)	23,5 (8,2-32,5)	0,590

Примечание: p – уровень статистической значимости при сравнении 2-х групп пациентов

У больных ИП при наличии тромбозов в анамнезе было обнаружено увеличение концентрации фибриногена с уровнем статистической значимости, близким к критическому (p=0,053, таблица 9). Кроме того, у пациентов данной нозологической группы, имевших тромботические осложнения, отмечалось существенное повышение активности фVIII относительно больных без тромбозов (p=0,021). По остальным показателям плазменного гемостаза у пациентов с ИП, так же, как и у больных ЭТ, значимых отличий в зависимости от тромботического анамнеза не было выявлено (таблица 8,9).

Результаты сравнения показателей плазменного звена гемостаза у пациентов с ПМФ с тромбозами в анамнезе и не имевших таковых представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Показатели плазменного гемостаза у пациентов с ПМФ в зависимости от наличия тромбозов в анамнезе (Медиана, Q1-Q3)

Показатели		ПМФ (n=41)		p
		без тромбозов в анамнезе (n=36)	с тромбозами в анамнезе (n=5)	
Показатели скрининговой коагулограммы и активность коагуляционных факторов	Индекс АПТВ	1,11 (1,00-1,25)	0,95 (0,92-1,23)	0,359
	ПТ по Квику, %	84,0 (75,3-92,5)	79,8 (55,9-81,4)	0,195
	Фибриноген, г/л	3,8 (3,1-4,5)	2,8 (2,3-3,4)	0,061
	Активность фVIII, %	139,5 (114,0-164,3)	150,0 (146,0-159,0)	0,647
	Активность фВ, %	94,0 (73,5-135,0)	140,0 (98,0-185,0)	0,056
Активность/ уровень естественных антикоагулянтов	Активность АТ, %	108,0 (100,0-118,3)	91,1 (75,2-130,0)	0,461
	Активность РС, %	89,0 (70,5-103,0)	94,0 (67,0-125,0)	0,728
	Уровень свободного PS, %	72,0 (59,5-88,0)	82,0 (60,0-90,0)	0,838
ТГТ	Скорость, нМ/мин	62,3 (39,6-87,9)	51,8 (36,1-80,9)	0,951
	ETP, нМ*мин	1244,5 (1150,1-1559,0)	1479,0 (1212,7-1684,6)	0,698
	Peak thrombin, нМ	207,5 (161,6-270,2)	198,2 (155,7-227,3)	0,886
	STM $_{ETP}$, %	27,9 (14,7-41,8)	34,7 (10,1-41,6)	0,984
	STM $_{Peak\ thrombin}$, %	14,4 (4,8-25,1)	19,4 (3,2-26,4)	0,984

Примечание: p – уровень статистической значимости при сравнении 2-х групп пациентов

У пациентов с ПМФ при наличии тромбозов в анамнезе отмечалось повышение активности фактора Виллебранда (фВ) с уровнем статистической значимости, близким к критическому (p=0,056). По остальным показателям существенных отличий не наблюдалось (таблица 10). Однако необходимо отметить малое количество обследованных больных данной нозологической формой с тромботическими осложнениями (n=5), что может препятствовать выявлению статистических закономерностей.

Таким образом, особенности плазменного звена гемостаза различных нозологических групп обследованных пациентов с Ph-негативными МПН при наличии тромботического анамнеза включают повышение уровня фибриногена (при ЭТ), активности фVIII (при ИП) и фВ (при ПМФ). Увеличение каждого из данных показателей является признанным фактором риска

развития тромботических осложнений и может определять повышенный риск ретромбозов у больных Ph-негативными МПН с тромбозами в анамнезе.

3.1.4. Особенности плазменного звена гемостаза пациентов с Ph-негативными МПН в зависимости от мутационного статуса и аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F.

Наличие мутации JAK2 V617F входит в большие диагностические критерии ВОЗ 2016 при ИП, ЭТ и ПМФ [194] и является одним из факторов риска развития тромботических осложнений у пациентов с Ph-негативными МПН. Данный признак включён в Международную прогностическую шкалу риска развития тромбозов ВОЗ 2012 при ЭТ [62]. Накоплена информация о влиянии величины аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F на частоту развития тромбозов у больных ИП [165]. В связи с этим в настоящем исследовании мы провели оценку влияния мутационного статуса и аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F на показатели плазменного гемостаза (таблицы 11-12).

Пациенты с Ph(-)МПН, позитивные по мутации JAK2 V617F, характеризовались увеличением уровня гемоглобина (p=0,001), гематокрита (p=0,00003) и числа эритроцитов (p=0,0002) по сравнению с больными, не имевшими данную мутацию. Больные ЭТ при наличии мутации JAK2 V617F имели более высокие гематокрит (p=0,030) и число лейкоцитов (p=0,031), пациенты с ПМФ – повышенный гематокрит (p=0,005) и число эритроцитов (p=0,018). Указанные изменения свидетельствуют о существенном влиянии мутации JAK2 V617F на клеточный состав крови больных и, соответственно, течение заболевания.

В таблице 11 представлены результаты сравнения показателей, характеризующих плазменное звено гемостаза, у пациентов с Ph-негативными МПН в зависимости от наличия мутации JAK2 V617F.

Таблица 11 - Показатели плазменного гемостаза у пациентов с Ph-негативными МПН в зависимости от наличия мутации JAK2 V617F (Медиана, Q1-Q3)

Показатели		JAK2 V617F+ (n=92)	JAK2 V617F- (n=32)	p
Показатели скрининговой коагулограммы и активность коагуляционных факторов	Индекс АПТВ	1,09 (0,98-1,15)	1,08 (1,00-1,15)	0,920
	ПТ, %	86,3 (76,8-94,9)	87,6 (77,3-95,2)	0,702
	Фибриноген, г/л	3,34 (2,79-4,07)	3,35 (2,98-4,19)	0,642
	Активность фVIII, %	124,0 (99,8-159,3)	140,5 (115,8-152,3)	0,233
	Активность фВ, %	101,5 (75,0-130,0)	99,0 (74,8-148,8)	0,898
Активность/ уровень естественных антикоагулянтов	Активность АТ, %	101,0 (93,5-109,0)	109,5 (99,8-119,0)	0,015
	Активность РС, %	91,0 (76,5-105,5)	97,0 (81,5-112,5)	0,382
	Уровень свободного PS, %	80,0 (70,5-89,0)	78,0 (61,0-97,5)	0,809
ТГТ	Скорость, нМ/мин	52,7 (37,9-73,9)	47,4 (32,6-77,4)	0,728
	ETP, нМ*мин	1472,1 (1236,8-1736,7)	1414,1 (1233,6-1570,0)	0,424
	Peak thrombin, нМ	210,0 (170,3-255,1)	203,9 (162,4-237,7)	0,598
	STM $_{ETP}$, %	32,6 (22,4-43,6)	31,1 (14,8-56,6)	0,851
	STM $_{Peak\ thrombin}$, %	17,8 (9,4-26,4)	14,4 (4,0-30,9)	0,553

p – уровень статистической значимости при сравнении 2-х групп пациентов

При анализе показателей плазменного гемостаза значимые различия в зависимости от мутационного статуса JAK2 V617F отмечались лишь по активности АТ, значения которой в общей группе обследованных больных Ph(-)МПН при наличии мутации были ниже, чем у пациентов с аллелем дикого типа (p=0,015, таблица 11).

При оценке влияния мутации JAK2 V617F на показатели, характерные для отдельных нозологических групп, сходные изменения отмечались у пациентов с ЭТ и ПМФ, однако у последних различия не достигали статистической значимости. Медианы активности АТ в группах больных ЭТ и ПМФ в зависимости от мутационного статуса JAK2 V617F представлены на рисунке 3.

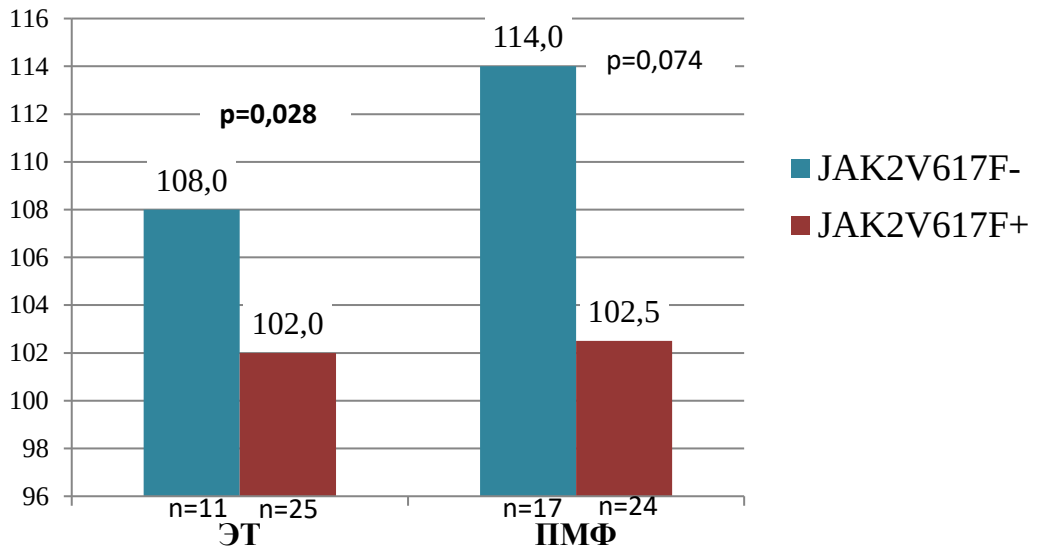

Рисунок 3 – Активность антитромбина (%, Медиана) у пациентов с ЭТ и ПМФ в зависимости от наличия мутации JAK2 V617F

Примечание: p - уровень значимости при сравнении JAK2V617F-позитивных и JAK2V617F-негативных пациентов

Учитывая общее повышение активности АТ у больных МПН относительно здоровых лиц (таблица 3), более низкие её значения при наличии мутации JAK2 V617F могут указывать на ограничение компенсаторной роли этого естественного антикоагулянта. По остальным параметрам плазменного гемостаза при ЭТ и ПМФ не было выявлено отличий в зависимости от мутационного статуса JAK2 V617F.

Влияние мутации JAK2 V617F на коагуляционные показатели при ИП сложно оценить в связи с наличием её у большинства (43 из 47, 91,5%) обследованных пациентов с данной нозологией.

Среди обследованных больных Ph(-)МПН результаты определения аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F имелись у 45 пациентов, медиана данного показателя составила 12,34%, интерквартильный интервал 6,64-25,70%. В таблице 12 приведены результаты корреляционного анализа влияния аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F на показатели плазменного гемостаза у пациентов с Ph-негативными МПН.

Таблица 12 - Взаимосвязь аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F и показателей плазменного гемостаза у пациентов с Ph-негативными МПН (Корреляционный анализ Спирмена)

Показатели плазменного гемостаза		Spearman R	p
Скрининговая коагулограмма и активность коагуляционных факторов	Индекс АПТВ	-0,034	0,823
	ПТ, %	-0,195	0,199
	Фибриноген, г/л	-0,166	0,275
	Активность фVIII, %	0,251	0,096
	Активность фВ, %	0,077	0,617
Активность/ уровень естественных антикоагулянтов	Активность АТ, %	-0,047	0,761
	Активность РС, %	-0,390	0,008
	Уровень свободного PS, %	-0,400	0,006
ТГТ	Скорость, нМ/мин	-0,197	0,200
	ETP, нМ*мин	-0,504	0,0005
	Peak thrombin, нМ	-0,353	0,019
	STM_{ETP}, %	-0,023	0,884
	$STM_{Peak\ thrombin}$, %	0,058	0,708

Оценка взаимосвязи аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F с показателями плазменного гемостаза у больных Ph(-)МПН позволила выявить обратную её корреляцию с активностью РС и уровнем свободного PS, а также с количественными показателями ТГТ (таблица 12). Кроме того, величина аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F была ассоциирована с числом лейкоцитов крови пациентов с Ph(-)МПН (R=0,540 p=0,001), подтверждая взаимосвязь данной мутации с провоспалительным статусом. Ассоциация аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F со снижением активности системы естественных антикоагулянтов протеина С может обуславливать влияние величины данного параметра на частоту развития тромбозов.

При анализе влияния аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F на исследуемые параметры плазменного гемостаза у пациентов отдельных нозологических групп Ph(-)МПН отмечена её обратная связь с активностью РС у больных ЭТ (R=-0,786 p=0,021), ETP у пациентов с ИП (R=-0,455 p=0,038), скоростью генерации тромбина, ETP и Peak thrombin у больных ПМФ (R=-0,621 p=0,013, R=-0,518 p=0,048 и R=-0,700 p=0,004 соответственно), а также прямая корреляция с активностью фVIII у пациентов с ИП (R=0,541 p=0,011).

Таким образом, наличие мутации JAK2 V617F у обследованных пациентов с Ph-негативными МПН сопровождалось более низкой активностью АТ, в то время как более высокие значения аллельной нагрузки JAK2 V617F были ассоциированы со снижением активности антикоагулянтной системы РС. Нарушение эффективности работы естественных антикоагулянтов может определять повышенный тромботический риск, обусловленный наличием и нагрузкой мутации JAK2 V617F.

3.1.5. Особенности плазменного звена гемостаза пациентов с Ph-негативными МПН в зависимости от получаемой терапии

Учитывая, что подавляющее большинство обследованных пациентов с Ph-негативными МПН находились на той или иной терапии, а часть больных на момент обследования не получала никакого лечения, следующим этапом оценки особенностей плазменного звена гемостаза стало сравнение исследованных показателей в зависимости от получаемой больными терапии.

Среди больных ЭТ 5 человек не получали лечения на момент обследования, часть пациентов (21 человек) находились только на антиагрегантной терапии, 3 больных получали циторедуктивные препараты и 7 человек – циторедуктивные препараты в сочетании с антиагрегантами. Группы пациентов на циторедуктивной терапии и комбинированной терапии циторедуктивными и антиагрегантными препаратами не обнаруживали статистически значимых различий по показателям плазменного звена гемостаза и были объединены в общую группу. Распределение обследованных больных ЭТ по получаемой терапии представлено в таблице 13.

Таблица 13 - Распределение обследованных пациентов с ЭТ по виду получаемой терапии

Наличие и вид получаемой терапии	Количество пациентов с ЭТ	Группы пациентов с ЭТ для сравнения показателей плазменного гемостаза	
Без терапии	5	Без терапии	(n=5)
Антиагрегантная терапия	21	Антиагрегантная терапия	(n=21)
Циторедуктивные препараты	3	Циторедуктивная +/- антиагрегантная терапия	(n=10)
Циторедуктивные препараты + антиагреганты	7		

Показатели скрининговой коагулограммы и активность коагуляционных факторов пациентов с ЭТ в зависимости от вида и наличия терапии представлены в таблице 14.

Таблица 14 - Показатели скрининговой коагулограммы и активность коагуляционных факторов у пациентов с ЭТ в зависимости от терапии (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа	ЭТ (n=36)			Сравнение групп пациентов по терапии (Критерий Краскела-Уоллиса)
		без терапии (n=5)	а/а (n=21)	циторедук-тивные препараты +/-а/а (n=10)	
Индекс АПТВ	1,02 (0,98-1,07) (n=29)	1,10 * (1,09-1,14)	1,10 (0,98-1,15)	1,10 (1,06-1,13)	H=0,761 p=0,684
ПТ, %	93,4 (91,2-105,4) (n=30)	80,2 (77,0-94,9)	90,4 (86,3-102,0)	92,8 (87,3-97,8)	H=1,208 p=0,547
Фибриноген, г/л	2,7 (2,5-2,9) (n=33)	2,8 (1,9-3,0)	3,3 * (2,9-3,5)	3,6 * (2,8-4,3)	H=4,406 p=0,111
Активность фVIII, %	104,0 (85,0-130,0) (n=37)	102,0 (101,0-116,0)	123,0 (108,0-144,0)	111,5 (88,0-130,0)	H=0,897 p=0,639
Активность фВ, %	97,0 (84,8-110,0) (n=68)	90,0 (70,0-105,0)	100,0 (80,0-130,0)	89,0 (61,0-136,3)	H=0,485 p=0,785

Примечания: ***** $p<0,017$ при сравнении с контрольной группой (скорректированный критический уровень статистической значимости при проведении 3-х сравнений);
а/а – антиагрегантная терапия

Результаты анализа, представленные в таблице 14, показывают, что отличия от контрольных показателей, выявленные при обследовании общей группы больных ЭТ (таблица 5), обусловлены значимым ростом индекса АПТВ у пациентов, не получавших терапии, а также увеличением концентрации фибриногена в группах пациентов, лечение которых включало циторедуктивные и/или антиагрегантные препараты. Использование критерия Краскела-Уоллиса при сравнении параметров скрининговой коагулограммы и активности отдельных факторов свёртывания не обнаружило значимых различий между группами больных ЭТ независимо от наличия и вида терапии (значения критерия и уровни статистической значимости указаны в таблице 14).

Данные активности/уровня естественных антикоагулянтов у пациентов с ЭТ на фоне различных видов терапии или её отсутствия на момент обследования представлены в таблице 15.

Таблица 15 - Активность/уровень естественных антикоагулянтов у пациентов с ЭТ в зависимости от терапии (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа	ЭТ (n=36)			Сравнение групп пациентов по терапии (Критерий Краскела-Уоллиса)
		без терапии (n=5)	а/а (n=21)	циторедук-тивные препараты +/-а/а (n=10)	
Активность АТ, %	91,0 (85,0-99,0) (n=43)	105,0 (104,0-108,0)	102,0 * (98,8-110,0)	100,5 * (97,4-107,0)	H=0,666 p=0,717
Активность РС, %	102,0 (89,5-114,3) (n=32)	99,0 (83,0-124,0)	98,0 (78,0-111,0)	97,0 (92,3-103,5)	H=0,505 p=0,777
Уровень свободного PS, %	123,6 (117,0-130,7) (n=14)	79,0 * (77,0-106,0)	80,0 * (76,0-94,0)	82,5 * (75,0-94,0)	H=0,031 p=0,985

Примечания: * p<0,017 при сравнении с контрольной группой (скорректированный критический уровень статистической значимости при проведении 3-х сравнений);
а/а – антиагрегантная терапия

Представленные в таблице 15 результаты свидетельствуют о значимом снижении уровня свободного PS относительно контрольных показателей во всех группах больных ЭТ независимо от терапии. При сравнении обследованных пациентов с ЭТ при помощи критерия Краскела-Уоллиса не было выявлено значимых различий активности/уровня естественных антикоагулянтов в зависимости от получаемого лечения (таблица 15).

Результаты ТГТ больных ЭТ, получавших различные виды терапии или не принимавших медикаментозных препаратов, приведены в таблице 16.

Таблица 16 - Показатели теста генерации тромбина у пациентов с ЭТ в зависимости от терапии (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа	ЭТ (n=36)			Сравнение групп пациентов по терапии (Критерий Краскела-Уоллиса)
		без терапии (n=5)	а/а (n=21)	циторедук-тивные препараты +/-а/а (n=10)	
Скорость, нМ/мин	95,4 (83,8-113,2) (n=32)	57,0 (51,1-71,1)	47,2 * (35,2-65,9)	52,1 * (41,2-66,9)	H=1,435 p=0,488
ETP, нМ*мин	1642,3 (1489,9-1777,0) (n=34)	1561,9 (1407,1-1775,3)	1517,6 (1388,3-1836,8)	1568,6 (1376,4-1680,9)	H=0,020 p=0,990
Peak thrombin, нМ	285,6 (265,5-311,8) (n=34)	206,3 (200,0-244,6)	200,5 * (172,9-243,7)	212,6 * (174,9-231,1)	H=0,526 p=0,769
STM_{ETP}, %	52,9 (47,8-57,7) (n=34)	27,7 * (25,4-31,0)	39,2 * (22,1-55,4)	29,1 * (16,1-42,3)	H=1,181 p=0,554
$STM_{Peak\ thrombin}$, %	42,1 (36,2-47,0) (n=33)	13,6 * (13,0-16,9)	21,5 * (9,9-35,1)	12,1 * (4,7-22,1)	H=1,494 p=0,474

Примечания: * p<0,017 при сравнении с контрольной группой (скорректированный критический уровень статистической значимости при проведении 3-х сравнений);

а/а – антиагрегантная терапия

Параметры ТГТ у больных ЭТ, представленные в таблице 16, дают возможность оценить вклад различных видов лечения на состояние плазменного звена гемостаза. Для пациентов, получавших циторедуктивные и/или антиагрегантные препараты, характерно значимое снижение скорости генерации тромбина и его максимальной концентрации относительно контроля. При этом уровень ETP не отличался от нормы ни в одной группе больных. Существенное снижение чувствительности к ТМ в сравнении с контрольной группой отмечалось во всех группах обследованных пациентов с ЭТ, свидетельствуя о нарушении работы антикоагулянтной системы РС и, соответственно, склонности к гиперкоагуляции независимо от наличия и вида получаемой терапии. При однофакторном анализе показателей ТГТ больных ЭТ, который проводили при помощи критерия Краскела-Уоллиса, не было обнаружено значимых отличий между группами пациентов, принимавших различные препараты или не получавших медикаментозного лечения на момент обследования (таблица 16).

Тем самым, сравнительный анализ показателей, характеризующих состояние плазменного звена гемостаза, у пациентов с ЭТ в зависимости от наличия и вида терапии не

обнаружил значимых различий между отдельными группами. Однако отмечены существенные отклонения от контрольных параметров, которые чаще встречались у больных, получавших какой-либо из двух видов лечения, что прослеживается по повышению уровня фибриногена и активности АТ, а также снижению скорости генерации и максимальной концентрации тромбина у таких пациентов. В то же время значимые относительно нормы снижение уровня свободного PS и чувствительности к ТМ выявлены в каждой обследованной группе.

Среди пациентов с ИП 18 человек получали антиагрегантную терапию, 5 – циторедуктивные препараты, 17 - комбинированную терапию циторедуктивными препаратами и антиагрегантами. 6 больных не получали указанных видов медикаментозной терапии. Группы пациентов на циторедуктивной и комбинированной терапии не обнаруживали статистически значимых различий по показателям плазменного звена гемостаза и были объединены в общую группу (таблица 17).

Таблица 17 - Распределение обследованных пациентов с ИП по виду получаемой терапии

Наличие и вид получаемой терапии	Количество пациентов с ИП	Группы пациентов с ИП для сравнения показателей плазменного гемостаза
Без терапии	6	Без терапии (n=6)
Антиагрегантная терапия	18	Антиагрегантная терапия (n=18)
Циторедуктивные препараты	5	Циторедуктивная +/- антиагрегантная терапия (n=22)
Циторедуктивные препараты + антиагреганты	17	
Руксолитиниб + циторедуктивные препараты + антиагреганты	1	-

В таблице 18 представлены показатели скрининговой коагулограммы и активность коагуляционных факторов пациентов с ИП на фоне различных видов терапии или её отсутствия на момент обследования.

Таблица 18 - Показатели скрининговой коагулограммы и активность коагуляционных факторов у пациентов с ИП в зависимости от терапии (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа	ИП			Сравнение групп пациентов по терапии (Критерий Краскела-Уоллиса)
		без терапии (n=6)	а/а (n=18)	циторедук-тивные препараты +/-а/а (n=22)	
Индекс АПТВ	1,02 (0,98-1,07) (n=29)	1,09 (1,01-1,11)	1,03 (0,99-1,09)	1,07 (1,00-1,10)	H=0,862 p=0,650
ПТ, %	93,4 (91,2-105,4) (n=30)	80,9 (74,3-92,2)	86,3 * (77,1-89,0)	86,3 * (75,1-94,6)	H=0,229 p=0,892
Фибриноген, г/л	2,7 (2,5-2,9) (n=33)	3,8 (2,8-4,3)	3,1 * (2,8-4,0)	3,3 * (2,9-3,6)	H=0,173 p=0,917
Активность фVIII, %	104,0 (85,0-130,0) (n=37)	107,0 (95,3-157,0)	130,0 * (102,5-154,3)	133,5 * (107,3-162,5)	H=0,585 p=0,747
Активность фВ, %	97,0 (84,8-110,0) (n=68)	117,5 (73,8-127,5)	80,0 (74,3-108,8)	115,0 (79,5-136,3)	H=3,623 p=0,163

Примечания: * p<0,017 при сравнении с контрольной группой (скорректированный критический уровень статистической значимости при проведении 3-х сравнений);
а/а – антиагрегантная терапия

Обращает на себя внимание то, что у пациентов с ИП, не получавших лечения на момент обследования, ни один исследованный показатель не отличался от контрольных значений (таблица 18). Все значимые отклонения от нормы, которые прослеживались по снижению показателя ПТ, увеличению концентрации фибриногена и активности фVIII, были обнаружены у больных, лечение которых включало приём циторедуктивных и/или антиагрегантных препаратов. Перечисленные изменения полностью соответствуют особенностям, отмеченным для общей группы больных ИП (таблица 5). Сравнение показателей пациентов с ИП при помощи непараметрического критерия Краскела-Уоллиса, применяемого для сравнения 3-х и более независимых выборок, не выявило значимых отличий параметров скрининговой коагулограммы и активности коагуляционных факторов между отдельными группами в зависимости от получаемой терапии (значения критерия и уровни статистической значимости указаны в таблице 18).

В таблице 19 представлены данные по сравнению активности/уровня естественных антикоагулянтов у пациентов с ИП, получавших различные виды терапии или не принимавших медикаментозных препаратов на момент обследования.

Таблица 19 - Активность естественных антикоагулянтов у пациентов с ИП в зависимости от терапии (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа	ИП			Сравнение групп больных по терапии (Критерий Краскела-Уоллиса)
		без терапии (n=6)	а/а (n=18)	циторедук-тивные препараты +/-а/а (n=22)	
Активность АТ, %	91,0 (85,0-99,0) (n=43)	95,2 (86,0-102,3)	99,9 * (94,3-117,3)	96,8 (92,0-101,0)	H=2,343 p=0,310
Активность РС, %	102,0 (89,5-114,3) (n=32)	93,5 (89,0-113,0)	87,5 (75,8-105,5)	88,0 * (78,0-100,0)	H=1,151 p=0,562
Уровень свободного PS, %	123,6 (117,0-130,7) (n=14)	100,0 * (91,0-103,0)	87,5 * (80,0-94,8)	75,0 * (59,0-85,0)	H=12,422 p=0,002

Примечания: ***** p<0,017 при сравнении с контрольной группой (скорректированный критический уровень статистической значимости при проведении 3-х сравнений);
а/а – антиагрегантная терапия

Результаты выполненного анализа показывают, что независимо от терапии во всех группах пациентов был значимо снижен уровень свободного PS по сравнению с контрольной группой (таблица 19). При этом активность АТ и РС оставалась в пределах нормы у больных без терапии. Повышение активности АТ и падение активности РС отмечены только у тех, кто принимал антиагрегантные или циторедуктивные препараты соответственно.

Сравнение показателей между отдельными группами пациентов с использованием однофакторного анализа и расчётом критерия Краскела-Уоллиса не обнаружило различий по активности АТ и РС (таблица 19). Однако были выявлены значимые отличия по показателю уровня свободного PS между группами пациентов с ИП в зависимости от терапии (H=12,422 p=0,002). Апостериорное попарное сравнение групп обнаружило статистически значимое снижение уровня свободного PS у пациентов, получавших циторедуктивные препараты, относительно больных без терапии (p=0,002). Различия по данному показателю между пациентами, находившимися на антиагрегантной или циторедуктивной терапии, не достигали статистической значимости (p=0,025, скорректированный критический уровень значимости с

учетом поправки Бонферрони при проведении 3-х сравнений p′=0,017). Также не отмечено значимых отличий по уровню свободного PS между группами больных без медикаментозной терапии и получавших антиагреганты (p=0,053).

Результаты сравнения показателей ТГТ обследованных пациентов с ИП в зависимости от вида и наличия терапии представлены в таблице 20.

Таблица 20 - Показатели теста генерации тромбина у пациентов с ИП в зависимости от терапии (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа	ИП			Сравнение групп больных по терапии (Критерий Краскела-Уоллиса)
		без терапии (n=6)	а/а (n=17)	циторедуктивные препараты +/-а/а (n=21)	
Скорость, нМ/мин	95,4 (83,8-113,2) (n=32)	56,0 (44,9-73,4)	48,3 * (35,6-54,8)	49,5 * (35,8-66,6)	H=0,952 p=0,621
ETP, нМ*мин	1642,3 (1489,9-1777,0) (n=34)	1617,8 (1581,9-2216,6)	1702,3 (1249,5-1884,9)	1338,0 * (1266,6-1607,9)	H=3,863 p=0,145
Peak thrombin, нМ	285,6 (265,5-311,8) (n=34)	240,9 (190,4-302,0)	206,8 * (164,8-236,8)	196,1 * (167,3-238,0)	H=2,303 p=0,316
STM_{ETP}, %	52,9 (47,8-57,7) (n=34)	35,9 (17,5-53,3)	43,8 * (31,0-48,8)	30,5 * (25,4-40,2)	H=2,948 p=0,229
$STM_{Peak\ thrombin}$, %	42,1 (36,2-47,0) (n=33)	21,9 * (10,6-35,3)	20,7 * (17,2-31,9)	15,2 * (10,9-23,5)	H=2,285 p=0,319

Примечания: * p<0,017 при сравнении с контрольной группой (скорректированный критический уровень статистической значимости при проведении 3-х сравнений);
а/а – антиагрегантная терапия.

Судя по данным, представленным в Таблице 20, наибольшие изменения относительно контроля претерпевали показатели ТГТ тех пациентов, лечение которых включало циторедуктивные препараты. Именно у них отмечалось значимое снижение всех параметров, характеризующих скорость и уровень генерации тромбина. У больных без терапии, а также у тех, кто не получал циторедуктивные препараты, ETP оставался в пределах нормальных значений. Для всех сравниваемых групп пациентов обнаружено снижение чувствительности к ТМ, что также было характерно для больных ЭТ. Сравнение отдельных групп пациентов с ИП, выделенных по наличию и виду терапии, с использованием непараметрического критерия

Краскела-Уоллиса не обнаружило между ними значимой разницы по рассматриваемым показателям (таблица 20).

Тем самым, у пациентов с ИП влияние терапии на показатели, характеризующие состояние плазменного звена гемостаза, выражалось в значимом снижении уровня свободного PS у пациентов, получавших циторедуктивные препараты, как относительно контроля, так и по сравнению с больными, которые на момент обследования не получали лечения. Результатом данной особенности явилось выраженное падение чувствительности к ТМ, которое, однако, не достигало статистической значимости при сравнении показателей отдельных групп между собой. Значимые отличия от контрольных параметров затрагивали большее количество показателей у пациентов, лечение которых включало циторедуктивные и/или антиагрегантные препараты, свидетельствуя о влиянии терапии на состояние плазменного звена гемостаза.

Распределение обследованных больных ПМФ по получаемой терапии представлено в таблице 21. Пациенты, получавшие только циторедуктивную терапию либо сочетание циторедуктивных и антиагрегантных препаратов, не обнаруживали значимых различий по показателям плазменного звена гемостаза и были объединены в общую группу. Также в одну группу были объединены больные, принимавшие руксолитиниб как отдельно, так и в сочетании с циторедуктивными и/или антиагрегантными препаратами.

Таблица 21 - Распределение обследованной группы пациентов с ПМФ по виду получаемой терапии

Наличие и вид получаемой терапии	Количество пациентов с ПМФ	Группы пациентов с ПМФ для сравнения показателей плазменного гемостаза
Без терапии	11	Без терапии (n=11)
Антиагрегантная терапия (АСК)	10	Антиагрегантная терапия (n=10)
Циторедуктивные препараты	2	Циторедуктивная +/- антиагрегантная терапия (n=7)
Циторедуктивные препараты + антиагреганты	5	
Руксолитиниб	7	Руксолитиниб +/- циторедуктивная терапия +/- антиагреганты (n=13)
Руксолитиниб + антиагреганты (АСК)	1	
Руксолитиниб + циторедуктивные препараты	2	
Руксолитиниб + циторедуктивные препараты + антиагреганты (АСК)	3	

Показатели скрининговой коагулограммы и активность коагуляционных факторов у пациентов с ПМФ, получавших различные виды терапии или не принимавших медикаментозных препаратов, представлены в таблице 22.

Таблица 22 - Показатели скрининговой коагулограммы и активность коагуляционных факторов у пациентов с ПМФ в зависимости от терапии (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	контроль-ная группа	ПМФ (n=41)				Сравнение групп больных по терапии (Критерий Краскела-Уоллиса)
		без терапии (n=11)	а/а (n=10)	циторедук-тивные препараты +/-а/а (n=7)	руксо литиниб +/-циторедук-тивные препараты +/- а/а (n=13)	
Индекс АПТВ	1,02 (0,98-1,07) (n=29)	1,12 * (1,04-1,17)	1,11 (1,02-1,27)	1,23 (1,05-1,29)	1,02 (0,95-1,23)	H=2,505 p=0,474
ПТ по Квику, %	93,4 (91,2-105,4) (n=30)	82,0 * (66,0-92,0)	86,0 * (78,0-93,5)	86,3 * (72,6-90,1)	81,4 * (73,1-91,7)	H=0,635 p=0,888
Фибриноген, г/л	2,7 (2,5-2,9) (n=33)	2,5 (2,3-3,3)	3,9 * (2,9-4,4)	4,1 * (3,8-4,7)	4,0 * (3,3-4,9)	H=11,312 p=0,010
Активность фVIII, %	104,0 (85,0-130,0) (n=37)	131,0 (91,5-145,5)	123,5 (99,8-142,0)	161,0 * (142,0-161,5)	171,0 * (139,0-186,0)	H=9,763 p=0,021
Активность фВ, %	97,0 (84,8-110,0) (n=68)	82,0 (75,0-147,5)	105,0 (68,0-122,5)	96,0 (80,0-119,0)	125,0 (74,0-175,0)	H=0,815 p=0,846

Примечания: ***** p<0,0127 при сравнении с контрольной группой;

а/а – антиагрегантная терапия

Как видно из данных, приведённых в таблице 22, сравнение с группой здоровых добровольцев обнаружило значимое снижение показателей ПТ во всех группах обследованных больных ПМФ независимо от вида и наличия терапии. В то же время значительное повышение уровня фибриногена относительно контрольных показателей было выявлено в группах пациентов, которые принимали те или иные медикаментозные препараты, тогда как у больных, которые на момент обследования не получали лечения, данный показатель оставался в пределах нормальных значений. Активность фVIII превышала референтные показатели только у тех пациентов, которые принимали циторедуктивные препараты и/или руксолитиниб.

Сравнение групп больных ПМФ по наличию и виду терапии с помощью непараметрического дисперсионного анализа с расчётом критерия Краскела-Уоллиса обнаружило значимые отличия лишь по показателям уровня фибриногена и активности фVIII (H=11,312 p=0,010 и H=9,763 p=0,021 соответственно, таблица 22). При апостериорном

попарном сравнении отдельных групп статистически значимое повышение концентрации фибриногена относительно больных без терапии было отмечено у пациентов, лечение которых включало циторедуктивные препараты или руксолитиниб (p=0,004 и p=0,008, соответственно). Увеличение концентрации фибриногена у пациентов, принимавших только антиагреганты, не достигало статистической значимости относительно больных, не получавших медикаментозной терапии (p=0,017, скорректированный критический уровень статистической значимости с учетом поправки Бонферрони при проведении 6 сравнений p´=0,0085). Также незначимы были различия по уровню фибриногена между пациентами, находившимися на лечении антиагрегантными и циторедуктивными препаратами (p=0,405), антиагрегантными препаратами и руксолитинибом (p=0,576), циторедуктивными препаратами и руксолитинибом (p=0,750).

Повышение активности фVIII, наблюдавшееся у больных, принимавших циторедуктивные препараты или руксолитиниб, относительно как пациентов без терапии (p=0,021 и p=0,0127 соответственно), так и получавших только антиагреганты (p=0,057 и p=0,051 соответственно), при попарном сравнении групп не достигало статистической значимости с учетом поправки Бонферрони (p´=0,0085), что может быть связано с малым числом пациентов в их составе. Незначимы были различия по активности фVIII между группами пациентов без терапии и принимавших антиагрегантные препараты (p=0,972) и между больными, получавшими циторедуктивные препараты или руксолитиниб (p=0,721).

Рост уровня фибриногена и некоторое увеличение активности фVIII у пациентов, получавших циторедуктивные препараты или руксолитиниб, может указывать на усиление гиперкоагуляционных изменений при данных видах терапии.

Результаты сравнения активности/уровня естественных антикоагулянтов у пациентов с ПМФ в зависимости от вида и наличия терапии представлены в таблице 23.

Таблица 23 - Активность/уровень естественных антикоагулянтов у пациентов с ПМФ в зависимости от терапии (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	контрольная группа	ПМФ (n=41)				Сравнение групп больных по терапии (Критерий Краскела-Уоллиса)
		без терапии (n=11)	а/а (n=10)	циторедук-тивные препараты +/-а/а (n=7)	руксо литиниб +/-циторедук-тивные препараты +/-а/а (n=13)	
Активность АТ, %	91,0 (85,0-99,0) (n=43)	103,0 (101,0-113,0)	100,5 (97,1-103,0)	113,0 (88,9-121,0)	114,0 * (111,0-131,0)	H=4,483 p=0,214
Активность РС, %	102,0 (89,5-114,3) (n=32)	84,5 * (78,3-92,5)	95,5 (76,3-104,3)	71,0 (50,5-103,0)	93,0 (64,0-122,0)	H=1,995 p=0,573
Уровень свободного PS, %	123,6 (117,0-130,7) (n=14)	71,0 * (61,8-80,0)	85,0 * (74,8-93,3)	72,0 * (60,5-77,5)	62,0 * (49,0-90,0)	H=2,481 p=0,479

Примечания: ***** p<0,0127 при сравнении с контрольной группой;

а/а – антиагрегантная терапия

В соответствии с данными, приведенными в таблице 23, для всех пациентов независимо от наличия и вида получаемой терапии было характерно существенное снижение уровня свободного PS в сравнении с контрольной группой. В то же время по показателям активности АТ все обследованные группы больных ПМФ имели достаточно выраженные отличия от контрольных значений здоровых лиц, однако статистической значимости они достигали только при лечении руксолитинибом. Снижение активности РС относительно нормальных показателей, отмечавшееся во всех группах пациентов с ПМФ, было значимо только у больных, не получавших медикаментозной терапии. При сравнении отдельных групп пациентов с ПМФ по наличию и виду терапии при помощи непараметрического критерия Краскела-Уоллиса показатели активности АТ, РС и уровня PS не обнаружили значимых отличий (таблица 23).

Данные по сравнению показателей ТГТ обследованных пациентов с ПМФ на фоне различной терапии или её отсутствия на момент обследования представлены в таблице 24.

Таблица 24 - Показатели теста генерации тромбина у пациентов с ПМФ в зависимости от терапии (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	контроль-ная группа	ПМФ (n=41)				Сравнение групп больных по терапии (Критерий Краскела-Уоллиса)
		без терапии (n=11)	а/а (n=10)	циторедуктивные препараты +/-а/а (n=7)	руксолитиниб +/-циторедуктивные препараты +/-а/а (n=13)	
Скорость, нМ/мин	95,4 (83,8-113,2) (n=32)	62,3 (36,3-111,7)	68,7 * (42,7-76,7)	43,7 * (34,7-57,4)	77,2 (46,7-95,2)	H=2,110 p=0,550
ETP, нМ*мин	1642,3 (1489,9-1777,0) (n=34)	1224,4 * (1199,3-1572,7)	1508,1 (1280,4-1808,8)	1189,7 * (1118,2-1432,0)	1190,8 * (972,5-1558,4)	H=5,133 p=0,162
Peak thrombin, нМ	285,6 (265,5-311,8) (n=34)	207,5 (156,1-275,1)	231,6 * (177,1-272,2)	174,8 * (156,4-214,8)	207,6 * (165,6-275,1)	H=1,351 p=0,717
STM_{ETP}, %	52,9 (47,8-57,7) (n=34)	27,9 * (11,9-35,0)	40,2 * (22,0-44,4)	24,6 * (21,4-42,0)	21,6 * (9,3-34,7)	H=2,152 p=0,542
$STM_{Peak\ thrombin}$, %	42,1 (36,2-47,0) (n=33)	13,5 * (4,8-19,2)	25,9 * (14,4-30,3)	16,0 * (5,0-23,3)	5,6 * (2,0-24,4)	H=5,505 p=0,138

Примечания: ***** p<0,0127 при сравнении с контрольной группой; а/а – антиагрегантная терапия

Как показывает анализ результатов, представленных в таблице 24, для всех групп обследованных пациентов с ПМФ были характерны существенные отличия от контрольных показателей. Значимое снижение всех параметров, характеризующих скорость и уровень генерации тромбина, отмечалось у больных, получавших циторедуктивные препараты. Наиболее выраженные изменения, отмеченные во всех группах пациентов, обнаружены по чувствительности к ТМ (STM_{ETP} и $STM_{Peak\ thrombin}$). Значимое падение данных показателей относительно нормальных параметров свидетельствует о развитии гиперкоагуляции независимо от получаемой терапии. Сравнение групп пациентов с ПМФ, различающихся по наличию и виду терапии, выполненное с использованием критерия Краскела-Уоллиса, не обнаружило между ними значимых отличий ни по одному параметру ТГТ (таблица 24).

Тем самым, проведённый анализ параметров плазменного звена гемостаза у больных ПМФ выявил существенное влияние терапии на показатели уровня фибриногена и активности фVIII. У пациентов, получавших циторедуктивную терапию или руксолитиниб, был отмечен значимый рост концентрации фибриногена как относительно контроля, так и по сравнению с больными, не получавшими лечения на момент обследования. Увеличение активности фVIII в тех же группах, значимое относительно нормальных значений, несколько не достигало

статистической значимости относительно пациентов, не получавших терапии. Указанные особенности отражают влияние циторедуктивных препаратов и руксолитиниба на состояние плазменного звена гемостаза и могут свидетельствовать об усилении гиперкоагуляционных изменений, сопутствующих данной терапии. Характерной для пациентов с ПМФ особенностью независимо от наличия и вида терапии является значимое снижение уровня свободного PS и чувствительности к ТМ.

Таким образом, во всех обследованных группах пациентов с Ph-негативными МПН независимо от наличия и вида терапии прослеживается снижение уровня свободного протеина S и чувствительности к ТМ относительно контрольных значений, что отражается на низкой эффективности антикоагулянтной системы протеина С. Значимые отличия от нормальных показателей таких параметров, как концентрация фибриногена, активность фVIII и антитромбина, скорость и уровень образуемого тромбина, ассоциируются с наличием терапии, включающей циторедуктивные и/или антиагрегантные препараты, а также – руксолитиниб. Как правило, отдельные группы пациентов, которые не принимали никаких препаратов или получали различные виды терапии, не имеют существенных различий между собой по показателям, оценивающим плазменное звено гемостаза. Исключением является значимое по сравнению с больными ИП, не получавшими лечения, падение уровня свободного протеина S у тех, кто принимал циторедуктивные препараты, а также выраженный рост уровня фибриногена у пациентов с ПМФ, которые принимали циторедуктивные и/или таргетные препараты, относительно больных без терапии.

Анализ результатов обследования пациентов с Ph-негативными МПН позволяет утверждать, что состояние плазменного звена гемостаза при данном заболевании претерпевает существенные изменения по сравнению со здоровыми людьми, выраженные в разной степени в зависимости от конкретной нозологии. Так, для пациентов с ЭТ наряду с удлинением времени свёртывания крови в тесте АПТВ характерно значимое увеличение концентрации фибриногена, которое ассоциируется с ростом числа тромбоцитов. Наличие тромботического анамнеза приводит к дальнейшему повышению данного показателя. На фоне снижения уровня свободного PS падает эффективность антикоагулянтной системы РС, что выражается в падении чувствительности к ТМ в ТГТ. В то же время растёт активность АТ, компенсируя в некоторой степени недостаточность влияния системы РС. Скорость генерации и максимальная концентрация тромбина не достигают нормальных значений. Наличие мутации JAK2 V617F сопровождается более низкой активностью АТ, которая, однако, остается значимо выше показателей контрольной группы. При этом рост аллельной нагрузки ассоциируется с более выраженными нарушениями в системе РС. У пациентов с ИП характер изменения показателей,

оценивающих состояние плазменного звена гемостаза, сохраняется. Однако добавляются новые признаки, которые указывают на более выраженные нарушения по сравнению с больными ЭТ. Так, показатель протромбинового теста по Квику значимо ниже, чем у пациентов с ЭТ. Отмечается повышение не только концентрации фибриногена, но и активности фVIII. Наличие тромбозов в анамнезе больных является причиной ещё большего роста данных показателей. К снижению уровня свободного PS присоединяется значимое, по сравнению с нормой, падение активности PC. Подобные изменения приводят к нарушению деятельности антикоагулянтной системы PC и проявляются низкими значениями чувствительности к TM в ТГТ. Также необходимо учитывать, что наличие мутации JAK2 V617F, которое отмечается у подавляющего числа пациентов с ИП, ассоциируется с более низкой активностью AT, что сказывается на снижении эффективности естественных антикоагулянтов. При этом увеличение аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F связано с ростом активности фVIII и снижением эндогенного тромбинового потенциала в ТГТ. В группе больных ИП отмечена обратная корреляционная связь скорости генерации и максимальной концентрации тромбина в ТГТ с уровнем гемоглобина, гематокрита, числом эритроцитов, а также между уровнем гематокрита и ETP. Состояние плазменного звена гемостаза у пациентов с ПМФ не только претерпевает перечисленные выше изменения, но и подвергается ещё более выраженным нарушениям, что отражается на удлинении обоих временных показателей (АПТВ, ПТ), а также значимым по сравнению с больными ЭТ падением уровня как свободного PS, так и ETP. При этом снижение ETP, наряду с уменьшением скорости образования и максимальной концентрации тромбина в ТГТ, ассоциировано с ростом аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F.

Наличие обратной корреляционной зависимости между числом лейкоцитов и показателем ПТ, а также уровнем свободного протеина S свидетельствуют о непосредственном влиянии воспалительного статуса на состояние плазменного звена гемостаза. Необходимо отметить, что между уровнем свободного протеина S, а также активностью протеина C и величиной эндогенного потенциала тромбина отмечена прямая корреляция. Данная особенность говорит о том, что снижение антикоагулянтного действия системы протеина C сопровождается уменьшением прокоагулянтного потенциала.

3.1.6. Оценка гемостатического баланса у пациентов с Ph-негативными МПН

Результаты, полученные при обследовании пациентов с Ph-негативными МПН, не дают возможности однозначно оценить состояние плазменного звена гемостаза. Сохранение гемостатического баланса, необходимого для нормального функционирования системы гемостаза, обеспечивается за счёт определённого взаимодействия про- и антикоагулянтных

влияний. Увеличение действия про- или антикоагулянтов приводит к нарушению баланса и развитию гипер- или гипокоагуляции соответственно. Для пациентов с Ph(-)МПН характерной особенностью является снижение относительно значений здоровых лиц показателя ETP, который оценивает потенциал тромбина, образуемого при проведении ТГТ. Данная особенность может указывать на уменьшение прокоагулянтных воздействий и наличие гипокоагуляционных изменений у больных Ph-негативных МПН. Однако наряду с низкими значениями ETP у пациентов отмечено выраженное снижение чувствительности к ТМ, показателя, который характеризует эффективность системы естественных антикоагулянтов – системы протеина С. Параллельное уменьшение как про-, так и антикоагулянтных влияний может быть направлено на сохранение гемостатического баланса у обследованных пациентов. Выявленная прямая корреляция между уровнем свободного PS, а также активностью PC и величиной эндогенного потенциала тромбина у пациентов с Ph(-)МПН свидетельствует о том, что снижение антикоагулянтного действия системы протеина С сопровождается уменьшением прокоагулянтного потенциала, подтверждая вышеуказанную возможность. Вычисление отношения про- и антикоагулянтов у больных Ph-негативными МПН и сравнение полученных значений с соответствующими параметрами группы здоровых людей даёт возможность оценить наличие, направленность и степень изменений гемостатического баланса, отражающегося на состоянии плазменного звена гемостаза. Для подобной оценки предложен расчетный показатель индекс коагуляции (coagulation index, CI), определяемый по формуле:

$$\mathrm{CI} = \frac{\mathrm{ETP}^{\mathrm{N}}{}_{\mathrm{TM-}}}{\mathrm{STM}_{\mathrm{ETP}}}$$

где $\mathrm{ETP}^{\mathrm{N}}{}_{\mathrm{TM-}}$ – эндогенный тромбиновый потенциал пациента в постановке ТГТ без добавления ТМ, выраженный в процентах относительно нормальных значений (медианы $\mathrm{ETP}_{\mathrm{TM-}}$ группы здоровых доноров), оценивает прокоагулянтный потенциал;

$\mathrm{STM}_{\mathrm{ETP}}$ – чувствительность к ТМ, вычисленная как процент падения ETP пациента после добавления ТМ при постановке ТГТ, оценивает антикоагулянтный потенциал:

$$\mathrm{STM}_{ETP} = \frac{\mathrm{ETP}_{\mathrm{TM-}} - \mathrm{ETP}_{\mathrm{TM+}}}{\mathrm{ETP}_{\mathrm{TM-}}} \times 100\%$$

где $\mathrm{ETP}_{\mathrm{TM-}}$ – эндогенный потенциал тромбина пациента в постановке ТГТ без добавления ТМ;

$\mathrm{ETP}_{\mathrm{TM+}}$ – эндогенный потенциал тромбина пациента в постановке ТГТ с добавлением ТМ.

Влияние плазменных антикоагулянтов, основным среди которых является антитромбин, автоматически учитывается в показателе ETP. Таким образом, с помощью предлагаемой

формулы рассчитывается отношение про- и антикоагулянтов, которое может характеризовать сохранность гемостатического баланса обследуемого. Увеличение индекса коагуляции свидетельствует о сдвиге гемостатического баланса в сторону гиперкоагуляции, снижение - указывает на гипокоагуляционные изменения.

Результаты определения индекса коагуляции у пациентов с различными нозологиями Ph-негативных МПН представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Индекс коагуляции у пациентов отдельных нозологий Ph-негативных МПН

Характеристики	Контрольная группа (n=34)	ЭТ (n=27)	ИП (n=36)	ПМФ (n=39)
Me (Q1 - Q3) Min Max	1,91 (1,57–2,17) 1,31 2,57	2,25 * (1,61–4,76) 1,16 30,71	2,62 ** (1,92–3,94) 0,93 26,33	2,90 *** (1,71-7,28) 1,21 51,39

Примечания: * уровень значимости при сравнении с контрольной группой p=0,017

** уровень значимости при сравнении с контрольной группой p=0,00036

*** уровень значимости при сравнении с контрольной группой p=0,00042

Как следует из результатов вычисления индекса коагуляции, представленных в таблице 25, параметры CI обследованных пациентов с ЭТ, ИП и ПМФ значимо превышали показатели здоровых лиц, свидетельствуя о сдвиге гемостатического баланса в сторону гиперкоагуляции, характерной для каждой группы в целом. Вместе с тем для всех нозологических групп был характерен широкий размах полученных значений. Среди пациентов каждой нозологии встречались как очень низкие показатели, указывающие на риск кровоточивости, так и высокие, соответствующие развитию выраженной в разной степени гиперкоагуляции.

Показана прямая связь значений индекса коагуляции у пациентов с ЭТ, получавших антиагрегантную терапию препаратами ацетилсалициловой кислоты, с повышением активности и уровня фактора Виллебранда, а также активности фVIII, являющихся маркерами гиперкоагуляции (R=0,471 p=0,036, R=0,63 p=0,0029 и R=0,592 p=0,005 соответственно). В той же группе больных ЭТ обратная корреляционная зависимость связывала величину индекса коагуляции с параметрами, характеризующими активность и уровень протеинов С и S (R=-0,609 p=0,034 и R=-0,481 p=0,027 соответственно), снижение которых свидетельствует о несостоятельности системы протеина С и является фактором риска тромботических осложнений. Отмеченные взаимосвязи указывают на то, что индекс коагуляции отражает гиперкоагуляционные особенности, характерные для пациентов с Ph-негативными МПН. У больных ПМФ, не получавших лечение на момент обследования, отмечена тесная корреляционная связь между значениями индекса коагуляции и показателями активности и

уровня фактора Виллебранда (R=0,866 p=0,0006 и R=0,821 p=0,023 соответственно), подтверждая значимость определения данного индекса для выявления гиперкоагуляционных изменений в плазменном звене гемостаза. Наличие обратной корреляции между индексом коагуляции и показателем протромбинового теста по Квику (R=-0,700, p=0,016) позволяет утверждать, что снижение значений последнего сопровождается развитием гиперкоагуляционного состояния плазменного звена гемостаза. Пациентов с ИП отличала сильная обратная связь индекса коагуляции с уровнем гематокрита (R=-0,697, p=0,025) в том случае, если их терапия ограничивалась препаратами ацетилсалициловой кислоты. При добавлении в схему лечения циторедуктивных препаратов подобная корреляция прослеживалась не только с уровнем гематокрита, но и с числом эритроцитов (R=-0,548 p=0,028 и R=-0,729 p=0,002 соответственно). Ассоциация индекса коагуляции с особенностями клеточного состава плазмы крови больных подчеркивает связь данного показателя, отражающего направленность и степень изменений гемостатического баланса и характеризующего состояние плазменного звена гемостаза, с процессом миелопролиферации.

Таким образом, определение индекса коагуляции у пациентов с Ph-негативными МПН позволяет осуществить персонализированный подход к выявлению разнонаправленных нарушений гемостатического баланса, результатом которых может быть развитие гипер- или гипокоагуляционного состояния плазменного звена гемостаза.

3.2. Исследование тромбоцитарного звена гемостаза у пациентов с Ph-негативными МПН

Тромбоциты играют важную роль в реакциях гемостаза и тромбоза. В интактном состоянии тромбоциты не взаимодействуют с другими форменными элементами крови и неповрежденным эндотелием стенки сосудов. Осуществление тромбоцитарных функциональных реакций in vivo происходит вследствие активации кровяных пластинок при действии на их специфические рецепторы агонистов - стимулирующих субстанций зоны повреждения и субэндотелиальных структур. У пациентов с Ph-негативными МПН активации кровяных пластинок способствует не только наличие патологического клона, но и влияние медиаторов воспаления, взаимодействие с активированными лейкоцитами и клетками эндотелия, образование тромбина. Все перечисленные эффекты многократно усиливаются за счёт действия обратной положительной связи, вовлекая всё новые тромбоциты, которые в результате приобретают протромботический фенотип.

Оценку функциональной активности тромбоцитов у пациентов с Ph(-) МПН осуществляли методом оптической индуцированной агрегатометрии по Борну с добавлением таких агонистов, как АДФ (в концентрациях 1 мкМ и 5мкМ), коллаген (2 мкг/мл) и ристоцетин (1,2 мг/мл). Для характеристики агрегационной активности тромбоцитов учитывали параметры начальной скорости (V) и максимальной амплитуды (МА) агрегации.

Результаты оценки агрегационной функции тромбоцитов пациентов с Ph-негативными МПН, не получавших медикаментозного лечения на момент обследования, в сравнении с показателями агрегации тромбоцитов контрольной группы представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Сравнение показателей агрегации тромбоцитов у пациентов с Ph-негативными МПН, не получавших медикаментозного лечения (Медиана, Q1—Q3)

Показатели		Контроль (n=30)	ЭТ (n=5)	ИП (n=6)	ПМФ (n=11)	Сравнение групп пациентов между собой (Критерий Краскела-Уоллиса)
Число тромбоцитов, $\times 10^9$		250,0 (240,0-264,8)	570,0 (551,8-643,5)	237,0 (169,3-430,5)	246,0 (187,0-573,0)	H=1,931 p=0,381
АДФ 1мкМ	V, %/мин	23,7 (19,6-26,3)	9,5* (8,5-14,7)	11,6* (5,4-13,3)	16,9* (9,1-18,7)	H=0,938 p=0,626
	МА, %	19,6 (16,5-22,6)	5,2* (4,6-7,4)	6,2* (4,8-7,6)	9,5* (5,9-10,9)	H=2,095 p=0,351
АДФ 5мкМ	V, %/мин	46,2 (38,8-51,7)	60,5* (58,4-60,6)	50,2 (48,2-53,4)	39,8 (28,1-46,1)	H=11,330 p=0,004
	МА, %	54,1 (47,6-62,3)	57,4 (50,6-83,4)	56,2 (45,9-66,1)	44,8 (39,2-56,1)	H=4,130 p=0,127
коллаген 2 мкг/мл	V, %/мин	26,6 (20,8-34,6)	49,2* (48,0-58,4)	33,2 (20,3-42,2)	13,0* (6,9-16,2)	H=12,525 p=0,002
	МА, %	53,3 (44,9-69,8)	82,0* (80,0-86,2)	62,7 (56,7-76,4)	50,7 (20,8-69,8)	H=9,214 p=0,010
ристоцетин 1,2 мг/мл	V, %/мин	51,3 (44,0-62,1)	61,8 (54,1-67,7)	44,5 (41,1-57,9)	47,7 (39,7-56,4)	H=1,341 p=0,511
	МА, %	73,7 (66,3-80,0)	86,4* (86,1-88,7)	79,6 (71,8-89,3)	81,9 (75,7-94,6)	H=0,807 p=0,668

Примечания: * $p<0,017$ при сравнении с контрольной группой (критический уровень статистической значимости при проведении 3-х сравнений с контрольной группой $p'=0,017$)

В соответствии с данными, представленными в таблице 26, группы не получавших лечения больных имели весьма ограниченный размер, обусловленный частым назначением медикаментозной терапии, в том числе антиагрегантов, ещё на этапе диагностики заболевания. Несмотря на указанное обстоятельство, имеющиеся результаты позволяют выявить

определенные особенности. Так, по сравнению с контрольными значениями во всех нозологических группах пациентов отмечалось существенное и практически одинаковое снижение показателей агрегации тромбоцитов под действием низких доз АДФ (1 мкМ). При этом у обследованных больных Ph(-)МПН, не получавших терапии, скорость и МА агрегации тромбоцитов при добавлении АДФ в низкой концентрации обнаруживали обратную зависимость с такими гематологическими показателями, как уровень гемоглобина (R=-0,597 p=0,019 и R=-0,580 p=0,023 соответственно), число эритроцитов (R=-0,853 p=0,0004 и R=-0,732 p=0,007 соответственно), гематокрит (значимая корреляция только с МА, R=-0,569 p=0,034) и число тромбоцитов (R=-0,720 p=0,002 и R=-0,679 p=0,004 соответственно). Указанные корреляции свидетельствуют о тесной взаимосвязи агрегационных характеристик при индукции низкими дозами АДФ с миелопролиферативными изменениями.

Влияние других индукторов агрегации, включая высокие концентрации АДФ, не было таким однообразным. Наиболее выраженные изменения были характерны для больных ЭТ, у которых практически все параметры агрегации под действием используемых агонистов значимо превышали нормальные показатели. Так, более чем в 1,5 раза по сравнению с нормой были увеличены скорость и МА агрегации тромбоцитов при добавлении коллагена. В меньшей степени, но также значимо были повышены показатели скорости агрегации под действием высоких доз АДФ (5 мкМ) и МА агрегации при индукции ристоцетином. У пациентов с ИП, не получавших терапии на момент обследования, не отмечено значимых изменений агрегационной активности тромбоцитов относительно контроля, можно говорить только о тенденции к росту таких показателей как скорость агрегации при действии АДФ (5 мкМ) (p=0,329), а также МА под влиянием коллагена и ристоцетина (p=0,329 и p=0,161 соответственно). В то же время, по сравнению с больными ЭТ обнаружена выраженная тенденция к замедлению агрегации при использовании в качестве индуктора АДФ (5 мкМ) и коллагена (p=0,018 и p=0,028 соответственно, при критическом уровне статистической значимости с учётом поправки Бонферрони p′=0,017). Группа больных ПМФ отличалась существенным снижением скорости агрегации, вызванной коллагеном, как относительно референтных значений, так и по сравнению с одноимённым показателем, полученным у пациентов с ЭТ (p<0,017 в обоих случаях). При сопоставлении с больными ИП данный параметр обнаружил только тенденцию к уменьшению (p=0,044). Кроме того, отмечена тенденция к снижению относительно значений здоровых лиц V и МА при индукции АДФ (5 мкМ) (p=0,126 и p=0,078 соответственно), а также МА при добавлении коллагена (p=0,317). По сравнению с пациентами из группы ЭТ значимо меньшие величины имели также такие параметры, как скорость агрегации под действием АДФ (5 мкМ) (p=0,004) и МА, вызванная добавлением коллагена (p=0,003). Наряду с указанными отклонениями, свидетельствующими о снижении функциональной активности тромбоцитов, у

пациентов с ПМФ, не получавших терапии, при сравнении с контрольными показателями отмечался некоторый рост МА агрегации под действием ристоцетина (p=0,055).

Таким образом, исследование функциональной активности тромбоцитов у пациентов с Ph-негативными МПН, не получавших медикаментозного лечения на момент обследования, позволило выявить ряд закономерностей. Наряду с общей для всех нозологий особенностью, которая заключалась в значимом снижении показателей агрегации под действием АДФ в низких дозах (1 мкМ), обнаружены различные изменения, характерные для каждой из обследованных групп. Наиболее высокая агрегационная активность кровяных пластинок выявлена у пациентов с ЭТ, что особенно наглядно демонстрируют параметры агрегации, вызванной коллагеном. У больных ИП сохраняется тенденция к росту показателей агрегации тромбоцитов под действием коллагена, которые, тем не менее, не достигают значений, обнаруженных в группе пациентов с ЭТ. Противоположная направленность изменений функциональной активности тромбоцитов характерна для больных ПМФ, у которых отмечено резкое падение скорости агрегации и тенденция к снижению МА под действием коллагена. Выявленные различия между агрегационными характеристиками тромбоцитов пациентов с отдельными нозологиями Ph(-)МПН можно было бы объяснить зависимостью от числа кровяных пластинок в крови обследованных больных. Однако, как представлено в таблице 26, несмотря на более высокое число тромбоцитов крови пациентов с ЭТ, значимых отличий по данному показателю между нозологическими группами обследованных пациентов, не получавших терапии, не было обнаружено. Учитывая отмеченные особенности, дальнейший сравнительный анализ агрегационной активности кровяных пластинок у пациентов с Ph-негативными МПН был проведён совместно в группах больных ЭТ и ИП и отдельно у пациентов с ПМФ.

Подавляющее большинство обследованных нами пациентов находилось на той или иной терапии, причём значительная часть больных получала антиагрегантные препараты (в основном ацетилсалициловой кислоты, АСК) в сочетании или без циторедуктивной или таргетной терапии, что оказывало выраженное влияние на агрегационные характеристики тромбоцитов. Результаты сравнительного анализа показателей пациентов с ЭТ и ИП, получавших препараты АСК в качестве основного терапевтического средства, и контрольной группы приведены в таблице 27.

Таблица 27 - Показатели агрегации тромбоцитов у пациентов с ЭТ и ИП, получавших терапию препаратами АСК, и в контрольной группе (Медиана, Q1—Q3)

Показатели		Контроль (n=30)	ЭТ (n=19)	ИП (n=17)	p
Число тромбоцитов, $\times 10^9$		250,0 (240,0-264,8)	789,0 (703,0-890,0)	632,5 (502,8-795,3)	0,084
АДФ 1мкМ	V, %/мин	23,7 (19,6-26,3)	4,7 (3,2-16,5) *	4,0 (2,5-17,5) *	0,601
	МА, %	19,6 (16,5-22,6)	3,7 (2,7-9,7) *	4,8 (4,0-8,9) *	0,342
АДФ 5мкМ	V, %/мин	46,2 (38,8-51,7)	61,9 (51,1-67,3) *	52,0 (43,9-59,4)	0,064
	МА, %	54,1 (47,6-62,3)	42,4 (37,1-50,4) *	42,1 (31,1-51,2) *	0,912
коллаген 2 мкг/мл	V, %/мин	26,6 (20,8-34,6)	2,3 (1,5-3,3) *	3,7 (1,6-4,4) *	0,149
	МА, %	53,3 (44,9-69,8)	4,9 (3,8-6,0) *	4,4 (3,5-5,4) *	0,568
ристоцетин 1,2 мг/мл	V, %/мин	51,3 (44,0-62,1)	41,6 (34,5-53,4)	44,6 (28,6-56,7)	0,975
	МА, %	73,7 (66,3-80,0)	80,4 (42,0-89,0)	80,7 (25,8-91,1)	0,812

Примечания: * $p<0,025$ при сравнении с контрольной группой (критический уровень статистической значимости при проведении 2-х сравнений с контрольной группой $p'=0,025$);
p- уровень значимости при сравнении двух групп пациентов

Как видно из данных, представленных в таблице 27, у пациентов с ЭТ и ИП, лечение которых заключалось в приёме препаратов АСК, сохранялось характерное для больных Ph(-)МПН, не получающих терапию, снижение агрегационных характеристик тромбоцитов, обусловленных действием малых доз АДФ (1 мкМ). Обращает на себя внимание отсутствие значимых различий между параметрами агрегации тромбоцитов у пациентов обеих обследованных групп. Так, резкое падение скорости и МА агрегации, вызванной коллагеном, отмечено как у больных ЭТ, так и у пациентов с ИП.

Как известно, в основе механизма антиагрегантного действия АСК лежит необратимое ингибирование циклооксигеназы, в результате чего блокируется синтез тромбоксана А2 ($ТХА_2$) и подавляется агрегация тромбоцитов. Простагландин-тромбоксановый путь передачи сигнала активации с образованием $ТХА_2$ из арахидоновой кислоты участвует во взаимодействии слабых агонистов, в том числе малых доз коллагена, с рецепторами тромбоцитарной мембраны. Тем самым, приём препаратов АСК приводит к существенному нарушению агрегации тромбоцитов, индуцированной данным агентом в применяемой концентрации (2 мкг/мл).

Приём препаратов АСК не влиял на скорость агрегации под действием АДФ (5 мкМ). Данные показатели, как и у пациентов без терапии, превышали контрольные значения. При этом МА агрегации, вызванной действием АДФ (5 мкМ), у пациентов обеих групп была значимо ниже нормы. Такая особенность может быть обусловлена нарушением передачи сигнала активации в результате действия АСК и вторичным дефицитом пула хранения.

Показатели агрегации под влиянием ристоцетина в группах пациентов с Ph(-)МПН всех нозологий не обнаруживали значимых отличий от контрольной группы или между собой.

У пациентов с ЭТ, принимавших препараты АСК, отмечены более высокие значения числа тромбоцитов крови, однако при сравнении с группой больных ИП, получавших аналогичную терапию, различия по данному показателю не достигали статистической значимости.

Широко применяемой терапевтической стратегией при лечении больных Ph(-)МПН является назначение циторедуктивных средств в сочетании с антиагрегантами, в том числе препаратами АСК. Показатели агрегации тромбоцитов пациентов, получавших на момент обследования подобную комбинированную терапию, представлены в таблице 28.

Таблица 28 - Показатели агрегации тромбоцитов у пациентов с ЭТ и ИП, получавших комбинированную терапию циторедуктивными препаратами и АСК, и в контрольной группе (Медиана, Q1—Q3)

Показатели		Контроль (n=30)	ЭТ (n=7)	ИП (n=16)	p
Число тромбоцитов, $\times 10^9$		250,0 (240,0-264,8)	496,0 (480,0-548,5)	434,0 (380,5-595,3)	0,386
АДФ 1мкМ	V, %/мин	23,7 (19,6-26,3)	13,7 (3,3-27,6)	11,3 (5,0-19,8) *	0,894
	МА, %	19,6 (16,5-22,6)	7,6 (2,0-14,2) *	7,3 (5,6-11,4) *	0,738
АДФ 5мкМ	V, %/мин	46,2 (38,8-51,7)	52,2 (48,6-59,7)	61,9 (42,2-67,3) *	0,688
	МА, %	54,1 (47,6-62,3)	40,7 (34,2-50,5) *	48,2 (40,0-52,5)	0,423
коллаген 2 мкг/мл	V, %/мин	26,6 (20,8-34,6)	3,0 (2,8-4,7) *	3,5 (2,2-6,3) *	0,738
	МА, %	53,3 (44,9-69,8)	3,8 (3,5-5,8) *	5,7 (4,7-7,0) *	0,204
ристоцетин 1,2 мг/мл	V, %/мин	51,3 (44,0-62,1)	48,8 (45,7-54,9)	53,9 (36,3-73,4)	0,916
	МА, %	73,7 (66,3-80,0)	81,5 (79,0-95,9)	85,7 (79,9-90,7) *	0,916

Примечания: * $p<0,025$ при сравнении с контрольной группой (критический уровень статистической значимости при проведении 2-х сравнений с контрольной группой $p'=0,025$);
p- уровень значимости при сравнении двух групп пациентов

Анализ данных таблицы 28 обнаружил, как и следовало ожидать, существенное снижение показателей агрегации под действием коллагена в обеих группах пациентов относительно нормы, а также уменьшение МА агрегации при индукции АДФ (5 мкМ). Данные изменения отражают ингибирующее влияние АСК на агрегацию тромбоцитов и аналогичны результатам больных, принимавших препараты АСК без циторедуктивного лечения (таблица 27). Больные ИП, принимавшие АСК и циторедуктивные препараты, отличались значимым повышением МА агрегации, вызванной ристоцетином, относительно нормальных значений, что указывало на рост функциональной активности тромбоцитов. Также было отмечено снижение агрегации тромбоцитов при индукции АДФ в низких дозах (1мкМ), наиболее выраженное по

показателям МА. По числу тромбоцитов крови группы пациентов с ЭТ и ИП, получавших комбинированную терапию циторедуктивными препаратами и АСК, существенно не отличались.

В связи с отсутствием значимых различий между группами больных ЭТ и ИП, принимавших только препараты АСК (таблица 27), а также между пациентами тех же групп, получавших комбинированную терапию АСК и циторедуктивными препаратами (таблица 28), для более взвешенной оценки влияния циторедуктивной терапии на показатели агрегации указанные нозологические группы объединили и провели сравнительный анализ, результаты которого представлены в таблице 29.

Таблица 29 - Показатели агрегации тромбоцитов у пациентов с ЭТ и ИП в зависимости от получаемой терапии и в контрольной группе (Медиана, Q1—Q3)

Показатели		Контроль (n=30)	ЭТ+ИП		
			АСК (n=36)	циторедуктивные препараты + АСК (n=23)	p
Число тромбоцитов, $\times 10^9$		250,0 (240,0-264,8)	746,0 (598,0-862,0)	464,0 (392,5-589,5)	0,0005
АДФ 1мкМ	V, %/мин	23,7 (19,6-26,3)	4,7 (2,5-17,6) *	12,9 (3,9-22,3) *	0,080
	МА, %	19,6 (16,5-22,6)	4,7 (3,1-9,0) *	7,6 (4,8-11,5) *	0,160
АДФ 5мкМ	V, %/мин	46,2 (38,8-51,7)	56,8 (48,0-64,4) *	57,1 (46,3-66,6) *	0,932
	МА, %	54,1 (47,6-62,3)	42,3 (34,7-51,4) *	47,3 (39,7-52,2) *	0,475
коллаген 2 мкг/мл	V, %/мин	26,6 (20,8-34,6)	3,1 (1,5-3,7) *	3,0 (2,4-5,6) *	0,120
	МА, %	53,3 (44,9-69,8)	4,9 (3,5-5,7) *	5,2 (3,9-6,7) *	0,144
ристоцетин 1,2 мг/мл	V, %/мин	51,3 (44,0-62,1)	42,7 (31,9-56,0) *	50,1 (41,2-66,5)	0,081
	МА, %	73,7 (66,3-80,0)	80,6 (25,6-90,8)	84,9 (79,8-90,8) *	0,134

Примечания: * $p<0,025$ при сравнении с контрольной группой (критический уровень статистической значимости при проведении 2-х сравнений с контрольной группой $p'=0,025$);
p- уровень значимости при сравнении двух групп пациентов

Как показывает анализ данных, представленных в таблице 29, у больных ЭТ и ИП, получавших циторедуктивные препараты, количество тромбоцитов крови было значительно ниже, чем у принимавших только препараты АСК. При этом параметры агрегации тромбоцитов под действием всех использованных индуцирующих агентов не обнаруживали значимых различий между двумя группами пациентов. В то же время выявлена выраженная тенденция к увеличению большинства агрегационных показателей у больных, находившихся на комбинированной терапии АСК с циторедуктивными средствами. Данная особенность свидетельствует о влиянии приёма циторедуктивных препаратов на повышение функциональной активности кровяных пластинок у пациентов с Ph(-)МПН, однако подобный эффект может быть также обусловлен падением числа тромбоцитов на фоне циторедуктивной терапии.

Для оценки влияния терапии на функциональную активность тромбоцитов у пациентов с ПМФ был проведён сравнительный анализ показателей агрегации в зависимости от получаемого лечения. Больные, принимавшие руксолитиниб в качестве основного терапевтического средства (7 пациентов), совместно с препаратами АСК (1 пациент), циторедуктивными препаратами (1 пациент) или комбинацией указанных препаратов (3 пациента), были объединены в одну группу. Пациенты, получавшие только циторедуктивную терапию либо сочетание циторедуктивных препаратов и АСК, не обнаруживали значимых различий по показателям агрегации тромбоцитов и также были объединены в общую группу. Распределение обследованных больных ПМФ по получаемой терапии представлено в таблице 30.

Таблица 30 - Распределение обследованной группы пациентов с ПМФ по терапии

Наличие и вид получаемой терапии	Количество пациентов с ПМФ	Группы пациентов с ПМФ для сравнения показателей агрегации тромбоцитов
Антиагрегантная терапия (АСК)	10	Антиагрегантная терапия (АСК) (n=10)
Циторедуктивные препараты	2	Циторедуктивные препараты +/- антиагрегантная терапия (АСК) (n=6)
Циторедуктивные препараты + антиагреганты (АСК)	4	
Руксолитиниб	7	Руксолитиниб +/- циторедуктивные препараты +/- антиагреганты (АСК) (n=12)
Руксолитиниб + антиагреганты (АСК)	1	
Руксолитиниб + циторедуктивные препараты	1	
Руксолитиниб + циторедуктивные препараты + антиагреганты (АСК)	3	

Результаты исследования агрегационной функции тромбоцитов у пациентов с ПМФ в зависимости от терапии и в сравнении с контрольной группой представлены в таблице 31.

Таблица 31 - Показатели агрегации тромбоцитов при индукции различными агонистами у пациентов с ПМФ и в контрольной группе (Медиана, Q1—Q3)

Показатели		контроль (n=30)	АСК (n=10)	циторедуктивные препараты +/- АСК (n=6)	руксолитиниб +/- циторедуктивные препараты +/- АСК (n=12)	Сравнение групп пациентов между собой (Критерий Краскела-Уоллиса)
Число тромбоцитов, $\times 10^9$		250,0 (240,0-264,8)	705,0 (584,5-992,8)	363,5 (256,5-421,8)	150,0 (116,6-213,6)	H=14,529 p=0,0007
АДФ 1мкМ	V, %/мин	23,7 (19,6-26,3)	5,8* (3,4-12,6)	14,7 (9,3-19,4)	14,1* (9,9-22,4)	H=4,655 p=0,098
	МА, %	19,6 (16,5-22,6)	5,1* (3,6-7,4)	9,8* (5,3-11,7)	11,6* (5,9-16,3)	H=4,160 p=0,125
АДФ 5мкМ	V, %/мин	46,2 (38,8-51,7)	46,3 (41,9-55,8)	31,6 (25,0-50,5)	26,3* (17,2-30,3)	H=11,262 p=0,004
	МА, %	54,1 (47,6-62,3)	36,0* (29,9-44,0)	40,2 (35,1-45,5)	34,6* (30,4-45,4)	H=0,382 p=0,826
Коллаген 2 мкг/мл	V, %/мин	26,6 (20,8-34,6)	2,5* (1,8-6,0)	4,6* (2,0-4,6)	3,1* (1,7-4,8)	H=0,070 p=0,966
	МА, %	53,3 (44,9-69,8)	3,8* (3,4-5,0)	5,3* (4,0-15,9)	3,6* (1,8-8,1)	H=1,134 p=0,567
Ристоцетин 1,2 мг/мл	V, %/мин	51,3 (44,0-62,1)	43,1 (34,4-62,2)	46,0 (31,8-53,0)	23,7* (17,6-32,5)	H=9,023 p=0,011
	МА, %	73,7 (66,3-80,0)	88,1 (56,6-92,7)	81,6 (77,6-85,9)	65,4 (57,5-76,8)	H=3,616 p=0,164

Примечания: * p<0,017 при сравнении с контрольной группой (критический уровень статистической значимости при проведении 3-х сравнений с контрольной группой p´=0,017)

Как видно из данных таблицы 31, у пациентов с ПМФ обнаружено последовательное снижение числа тромбоцитов крови в зависимости от вида терапии. Наиболее высокие значения были характерны для группы больных, принимавших только АСК. Показатели получавших циторедуктивные препараты были практически в 2 раза ниже. Наименьшее количество тромбоцитов отмечено у пациентов, терапия которых включала руксолитиниб. Однако статистическая значимость различий по данному параметру была подтверждена только между группами больных, лечение которых заключалось в приёме АСК, и принимавших таргетные препараты (p=0,0004). Сравнение указанных групп с пациентами на циторедуктивной терапии не обнаружило значимых изменений (p=0,023 и p=0,096 соответственно, скорректированный критический уровень статистической значимости при проведении 3-х попарных сравнений p´=0,017). На фоне отмеченных особенностей для пациентов с ПМФ, получавших терапию антиагрегантными и/или циторедуктивными препаратами, было характерно выраженное падение параметров агрегации под действием коллагена, а также снижение МА агрегации,

обусловленной АДФ (5 мкМ), в сравнении с контрольными показателями. У пациентов с ПМФ, терапия которых включала руксолитиниб, отмечалось наибольшее число сниженных относительно нормы показателей агрегации тромбоцитов. Так, только в этой группе больных почти все исследованные параметры агрегации, включая скорость агрегации при индукции АДФ (5 мкМ) и ристоцетином, не достигали контрольных значений. Указанные показатели были также существенно ниже аналогичных параметров больных, получавших только препараты АСК (p=0,0006 и p=0,0056 соответственно). Оба показателя агрегации под действием ристоцетина в группе пациентов, получавших руксолитиниб, имели тенденцию к снижению относительно больных, принимавших циторедуктивные препараты (p=0,039 в обоих случаях, критический уровень статистической значимости при попарном сравнении 3-х групп p´=0,017). Тем самым, по-видимому, приём руксолитиниба способствует ослаблению агрегационной активности тромбоцитов, проявляющемуся in vitro снижением агрегации под действием различных индукторов. Отмеченная особенность указывает на положительную роль терапии ингибиторами тирозинкиназ в тромбопрофилактике за счёт влияния на тромбоцитарное звено гемостаза.

Оценка функциональных особенностей тромбоцитов, проведённая в настоящем исследовании, обнаружила значимое снижение агрегационных параметров при использовании в качестве индуктора агрегации малых доз АДФ (1 мкМ), которое было характерно для пациентов всех обследованных нозологических групп независимо от наличия и вида терапии. Данная особенность может свидетельствовать о неполноценности рецепторного аппарата тромбоцитов у больных Ph(-)МПН. Пациенты разных нозологических групп, не получавшие терапию на момент обследования, характеризовались различным уровнем функциональной активности тромбоцитов. Наиболее высокие показатели агрегации под действием практически всех индукторов (кроме АДФ, 1 мкМ) были отмечены в группе ЭТ. Для пациентов с ИП была характерна тенденция к росту агрегационных характеристик относительно нормальных значений. У больных ПМФ наблюдались разнонаправленные изменения: значимое по сравнению с контрольными параметрами замедление агрегации, вызванной коллагеном, и тенденция к уменьшению показателей агрегации под действием АДФ (5 мкМ), отмечались наравне с некоторым усилением агрегации при индукции ристоцетином. Пациенты с ЭТ и ИП, получавшие препараты АСК в качестве основного терапевтического средства, демонстрировали значительное падение параметров агрегации, обусловленной коллагеном, относительно нормальных величин. Также относительно контрольных параметров были значимо снижены показатели МА под действием АДФ (5 мкМ), несмотря на сохраняющиеся высокие значения скорости агрегации, вызванной данным индуктором. У пациентов с ЭТ и ИП, получавших

комбинированную терапию, отмечена тенденция к увеличению агрегационных параметров по сравнению с больными, лечение которых включало только препараты АСК. Для пациентов с ПМФ, получавших терапию антиагрегантными и/или циторедуктивными препаратами, было характерно выраженное падение показателей агрегации под действием коллагена и снижение МА агрегации, обусловленной АДФ (5 мкМ). Таргетная терапия, направленная на ингибицию тирозинкиназ, приводила к значимому снижению практически всех агрегационных характеристик, включая агрегацию под действием ристоцетина, что свидетельствовало об ослаблении функциональной активности тромбоцитов.

3.3 Оценка эндотелиальной дисфункции у пациентов с Ph-негативными МПН

Важная роль в регуляции гемостаза принадлежит эндотелию сосудов. В физиологических условиях интактный эндотелий способствует кровотоку, обеспечивая антитромботическую поверхность, которая подавляет адгезию тромбоцитов и активацию коагуляции, поддерживая жидкое состояние крови. Продукция эндотелием атромбогенных факторов способствует тромборезистентности сосудистой стенки. В ответ на повреждение или воспаление происходит стимуляция и активация эндотелия с повышением экспрессии тромбогенных факторов и поверхностных адгезивных молекул, что увеличивает гемостатический потенциал в месте повреждения. В настоящем исследовании мы проводили оценку уровня фактора Виллебранда (АгфВ), высвобождаемого эндотелиальными клетками в процессе активации в результате экзоцитоза телец Вайбеля-Паладе. ФВ представляет собой крупный мультимерный гликопротеин, который обеспечивает адгезию и последующую агрегацию тромбоцитов в месте повреждения сосуда, а также является носителем и стабилизатором коагуляционного фактора VIII. Повышенный уровень фВ в плазме крови отражает повреждение эндотелия и представляет собой общепризнанный растворимый маркер эндотелиальной дисфункции (ЭД). Результаты определения уровня фВ в плазме обследованных пациентов с Ph-негативными МПН представлены в таблице 32.

Таблица 32 - Показатели уровня фактора Виллебранда у пациентов с Ph-негативными МПН и в контрольной группе (Медиана, Q1-Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=67)	Ph(-)МПН (n=121)	p
АгфВ, %	107,0 (91,0-134,5)	129,5 * (103,2-149,5)	0,0002

Примечание: p – уровень значимости при сравнении с контрольной группой

Представленные в таблице 32 данные свидетельствуют о существенном росте уровня фВ у пациентов с Ph(-)МПН относительно контрольной группы. Корреляционный анализ выявил взаимосвязь увеличения АгфВ у обследованных больных с протромботическими изменениями плазменного звена гемостаза, такими как повышение уровня фибриногена (R=0,270 p=0,003), активности фVIII (R=0,646 p<0,000001) и фВ (R=0,751 p<0,000001), а также снижение активности РС (R=-0,210 p=0,021) и чувствительности к ТМ (R=-0,331 p=0,0003 по падению ETP и R=-0,299 p=0,001 по падению Peak thrombin). Кроме того, была обнаружена прямая корреляция слабой силы между АгфВ и скоростью генерации тромбина в ТГТ (R=0,201 p=0,029). Наличие указанных взаимосвязей свидетельствует о параллельном развитии активации эндотелия и гиперкоагуляционных изменений у обследованных больных Ph-негативных МПН.

Результаты оценки АгфВ у больных отдельных нозологий приведены в таблице 33.

Таблица 33 - Показатели уровня фактора Виллебранда в отдельных нозологических группах пациентов с Ph-негативными МПН и контрольной группе (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=67)	ЭТ (n=34)	ИП (n=47)	ПМФ (n=40)	Сравнение нозологических групп пациентов (Критерий Краскела-Уоллиса)
АгфВ, %	107,0 (91,0-134,5)	124,4 (93,6-137,1)	135,3 * (109,5-153,0)	134,5 * (114,7-198,1)	H=4,162 p=0,125

Примечание: * p<0,017 при сравнении с контрольной группой (скорректированный критический уровень статистической значимости при проведении 3-х сравнений)

В соответствии с данными, представленными в таблице 33, уровень фВ был существенно выше нормы у пациентов с ИП и ПМФ. У больных ЭТ обнаруживалась лишь некоторая тенденция к увеличению данного параметра. В то же время, между нозологическими группами значимых различий не выявлено. Тем самым, для пациентов с Ph(-)МПН было характерно существенное повышение АгфВ, наиболее выраженное при ИП и ПМФ, что предполагает высокий уровень активации и повреждения эндотелия и указывает на развитие ЭД. Корреляционный анализ взаимосвязи содержания фВ с другими исследованными параметрами в отдельных нозологических группах Ph(-)МПН выявил особенности, в основном сходные с описанными выше для общей группы обследованных пациентов. В наибольшей степени это было характерно для пациентов с ЭТ и ПМФ. В то же время у больных ИП не обнаружено зависимости между АгфВ и активностью естественных антикоагулянтов, а также чувствительностью к ТМ.

Далее проводили анализ показателей уровня фВ в зависимости от наличия тромбозов в анамнезе, являющегося известным фактором риска развития тромботических осложнений у пациентов с Ph-негативными МПН. Результаты оценки влияния тромботического анамнеза на содержание фВ в плазме крови у обследованных больных Ph-негативными МПН представлены в таблице 34.

Таблица 34 - Уровень фактора Виллебранда у пациентов с Ph-негативными МПН в зависимости от наличия тромбозов в анамнезе (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=67)	Ph(-)МПН (n=121)		p
		без тромбозов в анамнезе (n=91)	с тромбозами в анамнезе (n=30)	
АгфВ, %	107,0 (91,0-134,5)	127,4 * (93,2-148,0)	140,0 * (121,0-163,2)	0,042

Примечание: * p<0,025 при сравнении с контрольной группой;

p – уровень статистической значимости при сравнении двух групп пациентов

Результаты, приведённые в таблице 34, свидетельствуют о более выраженном росте уровня фВ у пациентов с Ph-негативными МПН, имевших тромбозы в анамнезе. Наряду со значительным увеличением данного показателя в обеих группах больных относительно нормы, у пациентов с тромботическим анамнезом АгфВ существенно превышал значения больных, не имевших тромботических осложнений (таблица 34).

В таблицах 35-37 представлены данные определения уровня фВ в зависимости от тромботического анамнеза у больных отдельных нозологических групп.

Таблица 35 - Уровень фактора Виллебранда у пациентов с ЭТ в зависимости от наличия тромбозов в анамнезе (Медиана, Q1-Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=67)	ЭТ (n=34)		p
		без тромбозов в анамнезе (n=22)	с тромбозами в анамнезе (n=12)	
АгфВ, %	107,0 (91,0-134,5)	112,3 (92,8-128,9)	133,5 * (121,7-143,3)	0,033

Примечание: * p<0,025 при сравнении с контрольной группой;

p – уровень статистической значимости при сравнении двух групп пациентов

У пациентов с ЭТ, имевших тромбозы в анамнезе, отмечено значительное повышение уровня фВ относительно как контрольной группы, так и остальных обследованных больных данной нозологии (таблица 35).

Таблица 36 - Уровень фактора Виллебранда у пациентов с ИП в зависимости от наличия тромбозов в анамнезе (Медиана, Q1-Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=67)	ИП (n=47)		p
		без тромбозов в анамнезе (n=33)	с тромбозами в анамнезе (n=14)	
АгфВ, %	107,0 (91,0-134,5)	131,8 * (91,9-146,5)	142,5 * (115,1-163,2)	0,259

Примечание: ***** - p<0,025 при сравнении с контрольной группой;

p – уровень статистической значимости при сравнении двух групп пациентов

У пациентов с ИП значения АгфВ были существенно выше нормы вне зависимости от тромботического анамнеза, в группе больных с тромбозами данный показатель несколько превышал значения остальных пациентов с ИП, но различия не достигали статистической значимости (таблица 36).

Таблица 37 - Уровень фактора Виллебранда у пациентов с ПМФ в зависимости от наличия тромбозов в анамнезе (Медиана, Q1-Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=67)	ПМФ (n=40)		p
		без тромбозов в анамнезе (n=36)	с тромбозами в анамнезе (n=4)	
АгфВ, %	107,0 (91,0-134,5)	129,7 * (108,0-169,2)	196,3 * (148,4-293,5)	0,202

Примечание: ***** p<0,025 при сравнении с контрольной группой;

p – уровень статистической значимости при сравнении двух групп пациентов

У больных ПМФ отмечались сходные с ИП особенности рассматриваемого параметра. Независимо от тромботического анамнеза у обследованных пациентов с ПМФ содержание фВ значительно превышало показатели контрольной группы. Увеличение данного параметра было наиболее выражено у пациентов с тромбозами, однако из-за малого числа таких больных различия между группами пациентов не достигали статистической значимости (таблица 37).

Тем самым, по результатам проведённого анализа повышение уровня фВ было наиболее выражено у пациентов, имевших тромботические осложнения в анамнезе. Данная особенность в той или иной степени проявлялась как в общей группе обследованных больных Ph-негативными МПН, так и при рассмотрении отдельных нозологий.

Кроме тромботического анамнеза, признанным фактором риска развития тромботических осложнений у пациентов с Ph-негативными МПН является наличие мутации

JAK2 V617F. Результаты исследования уровня фВ в общей группе больных Ph(-)МПН в зависимости от мутационного статуса JAK2 V617F и в сравнении с контрольной группой приведены в таблице 38.

Таблица 38 - Уровень фактора Виллебранда у пациентов с Ph-негативными МПН в зависимости от наличия мутации JAK2 V617F (Медиана, Q1-Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=67)	МПН (n=121)		p
		JAK2V617F+ (n=90)	JAK2V617F- (n=31)	
АгфВ, %	107,0 (91,0-134,5)	128,6 * (98,6-149,2)	131,2 * (111,4-150,1)	0,731

Примечание: ***** p<0,025 при сравнении с контрольной группой;

p – уровень статистической значимости при сравнении двух групп пациентов

В соответствии с данными, представленными в таблице 38, содержание фВ было существенно выше нормы у обследованных больных Ph(-)МПН независимо от наличия мутации JAK2 V617F. Результаты оценки влияния мутационного статуса JAK2 V617F на уровень фВ в отдельных нозологических группах обследованных пациентов приведены в таблицах 39-40.

Таблица 39 - Уровень фактора Виллебранда у пациентов с ЭТ в зависимости от наличия мутации JAK2 V617F (Медиана, Q1-Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=67)	ЭТ (n=34)		p
		JAK2V617F+ (n=23)	JAK2V617F- (n=11)	
АгфВ, %	107,0 (91,0-134,5)	114,1 (93,0-132,8)	129,4 (108,6-142,9)	0,329

Примечание: p – уровень статистической значимости при сравнении двух групп пациентов

Как представлено в таблице 39, у больных ЭТ в зависимости от наличия мутации JAK2 V617F не выявлено значимых различий рассматриваемого параметра.

Таблица 40 - Уровень фактора Виллебранда у пациентов с ПМФ в зависимости от наличия мутации JAK2 V617F (Медиана, Q1-Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=67)	ПМФ (n=40)		p
		*JAK2*V617F+ (n=24)	*JAK2*V617F- (n=16)	
АгфВ, %	107,0 (91,0-134,5)	134,5 * (115,6-216,1)	133,7 (114,7-151,2)	0,634

Примечание: ***** p<0,025 при сравнении с контрольной группой;

p – уровень статистической значимости при сравнении двух групп пациентов

В соответствии с данными таблицы 40, у больных ПМФ, позитивных по мутации JAK2 V617F, уровень фВ был значимо выше нормы, но существенно не отличался от показателей JAK2 V617F-негативных пациентов.

Влияние мутации JAK2 V617F на параметры больных ИП сложно оценить в связи с наличием её у большинства (43 из 47, 91,5%) обследованных с этой нозологией.

Тем самым, значимого влияния мутационного статуса JAK2 V617F на показатели уровня фВ не было обнаружено. При рассмотрении общей группы обследованных пациентов с Ph-негативными МПН содержание фВ был существенно выше нормы независимо от наличия мутации, однако среди больных ПМФ значимое повышение данного показателя отмечалось только при наличии мутации JAK2 V617F.

Среди обследованных больных Ph(-)МПН данные аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F имелись у 45 пациентов, медиана составила 12,34%, интерквартильный интервал 6,64-25,70%. Результаты корреляционного анализа влияния аллельной нагрузки JAK2 V617F на содержание фВ в общей группе обследованных пациентов с Ph-негативных МПН и в отдельных нозологических группах приведены в таблице 41.

Таблица 41 - Взаимосвязь аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F и уровня фактора Виллебранда у пациентов с Ph-негативными МПН (Корреляционный анализ Спирмена)

Группы пациентов	Spearman R	p
МПН	0,119	0,376
ЭТ	0,011	0,974
ИП	0,485	0,019
ПМФ	-0,038	0,888

В соответствии с данными, представленными в таблице 41, в общей группе больных Ph(-)МПН не отмечено зависимости уровня фВ от аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F. Среди пациентов с ЭТ и ПМФ оценка результатов корреляционного анализа также не выявила взаимосвязи указанных параметров. В то же время, в группе больных ИП отмечалась прямая корреляционная связь аллельной нагрузки JAK2 V617F и АгфВ. Ассоциация данного маркера активации и повреждения эндотелия с величиной аллельной нагрузки JAK2 V617F может обуславливать её влияние на частоту развития тромбозов.

На следующем этапе проводили оценку влияния получаемой пациентами терапии на уровень фВ. Результаты анализа среди больных ЭТ приведены в таблице 42.

Таблица 42 - Уровень фактора Виллебранда у пациентов с ЭТ в зависимости от терапии (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=67)	ЭТ (n=34)			
		без терапии (n=4)	а/а (n=21)	циторедук-тивные препараты +/-а/а (n=9)	Сравнение групп пациентов по терапии (Критерий Краскела-Уоллиса)
АгфВ, %	107,0 (91,0-134,5)	103,6 (91,2-116,0)	127,4 (97,3-140,4)	127,9 (94,9-129,8)	H=1,767 p=0,413

Примечание: а/а – антиагрегантная терапия

При анализе данных, представленных в Таблице 42, не выявлено значимых отличий между содержанием фВ в контрольной группе и у пациентов с ЭТ независимо от наличия и вида получаемой терапии.

Результаты оценки влияния терапии на показатели пациентов с ИП представлены в таблице 43.

Таблица 43 - Уровень фактора Виллебранда у пациентов с ИП в зависимости от терапии (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	контрольная группа (n=67)	ИП (n=46)			
		без терапии (n=6)	а/а (n=18)	циторедук-тивные препараты +/-а/а (n=22)	Сравнение групп пациентов по терапии (Критерий Краскела-Уоллиса)
АгфВ, %	107,0 (91,0-134,5)	144,8 (98,7-183,8)	116,3 (95,8-139,8)	142,5 * (124,3-156,0)	H=4,620 p=0,099

Примечание: * p<0,017 при сравнении с контрольной группой (скорректированный критический уровень статистической значимости при проведении 3-х сравнений);
а/а – антиагрегантная терапия.

Как явствует из данных, представленных в таблице 43, повышение уровня фВ относительно нормальных значений, отмечавшееся во всех группах больных ИП, достигало статистической значимости только у пациентов, получавших циторедуктивные препараты. Однако сравнение групп больных между собой не выявило значимых отличий.

Результаты определения содержания фВ у пациентов с ПМФ в зависимости от получаемой терапии приведены в таблице 44.

Таблица 44 - Уровень фактора Виллебранда у пациентов с ПМФ в зависимости от терапии (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	контроль-ная группа (n=67)	ПМФ (n=40)				
		без терапии (n=11)	а/а (n=9)	циторедук-тивные препараты +/-а/а (n=7)	руксо-литиниб +/- циторедук-тивные препараты +/- а/а (n=13)	Сравнение групп больных по терапии (Критерий Краскела-Уоллиса)
АгфВ, %	107,0 (91,0-134,5)	118,9 (85,3-227,3)	130,7 (120,1-154,7)	149,5 * (132,5-172,7)	138,8 * (121,5-223,1)	H=2,425 p=0,489

Примечание: ***** p<0,0127 при сравнении с контрольной группой;

а/а – антиагрегантная терапия.

В соответствии с данными, представленными в таблице 44, повышение уровня фВ относительно контрольных показателей отмечалось у больных, получавших циторедуктивные препараты и/или руксолитиниб. Однако значимых различий между группами пациентов не наблюдалось.

Тем самым, результаты анализа свидетельствуют о наиболее выраженном увеличении АгфВ у пациентов с Ph(-)МПН, получавших циторедуктивные и/или таргетные препараты, что может указывать на повышение степени повреждения и активации эндотелия под влиянием данных медикаментозных средств.

Таким образом, повышение уровня фВ, указывающее на наличие ЭД, было наиболее выражено у больных ИП и ПМФ, принимавших циторедуктивные и/или таргетные препараты. У пациентов с ЭТ рост данного параметра был выявлен только при наличии тромботического анамнеза. Значимого влияния мутационного статуса JAK2 V617F больных ЭТ и ПМФ на содержание фВ обнаружено не было, в то время как у пациентов с ИП отмечалась прямая корреляция АгфВ с аллельной нагрузкой мутации JAK2 V617F.

В качестве биохимического маркера повреждения эндотелия определяли также растворимый тромбомодулин в плазме крови больных Ph-негативными МПН. Тромбомодулин (ТМ) представляет собой трансмембранный гликопротеин, экспрессируемый на люминальной поверхности эндотелиальных клеток большинства кровеносных сосудов, где он играет важную роль в поддержании антикоагулянтной активности сосудистой стенки. Связывание тромбина с ТМ на интактных эндотелиальных клетках способствует активации протеина С. Растворимые формы ТМ, включающие внеклеточные домены, обнаруживаются в плазме, сыворотке и моче,

повышенное содержание растворимого ТМ (sТМ) свидетельствует о повреждении эндотелиальных клеток. Результаты определения уровня sТМ у пациентов с Ph-негативными МПН в сравнении с контрольной группой здоровых добровольцев приведены в таблице 45.

Таблица 45 - Уровень растворимого тромбомодулина у пациентов с Ph-негативными МПН и в контрольной группе (Медиана, Q1-Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=15)	Ph(-)МПН (n=65)	p
Уровень sТМ, ng/ml	1,59 (1,45-1,82)	2,98 (2,36-3,64) *	<0,000001

Примечание: p – уровень значимости при сравнении с контрольной группой

Как видно из данных, представленных в таблице 45, уровень sТМ обследованных пациентов значительно превышал показатели здоровых лиц, указывая на выраженное повреждение эндотелия у больных Ph-негативными МПН. При этом рост концентрации sТМ коррелировал с такими прокоагулянтными характеристиками плазменного звена гемостаза, как повышение активности фVIII (R=0,388 p=0,001) и фВ (R=0,320 p=0,009), снижение активности РС (R=-0,312 p=0,013) и уровня свободного PS (R=-0,387 p=0,002), снижение чувствительности к ТМ (R=-0,264 p=0,044 по падению ETP и R=-0,282 p=0,030 по падению Peak thrombin). Кроме того, была выявлена прямая корреляция средней силы с высоким уровнем значимости между показателями концентрации sТМ и АгфВ (R=0,442 p=0,0003), что подтверждает выраженность эндотелиальных нарушений у обследованных пациентов.

Сравнительный анализ результатов определения уровня растворимого ТМ у пациентов отдельных нозологических групп Ph-негативных МПН представлен в таблице 46.

Таблица 46 - Уровень растворимого тромбомодулина у пациентов отдельных нозологических групп Ph-негативных МПН и в контрольной группе (Медиана, Q1-Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=15)	ЭТ (n=22)	ИП (n=24)	ПМФ (n=19)	Сравнение нозологических групп пациентов (Критерий Краскела-Уоллиса)
Уровень sТМ, ng/ml	1,59 (1,45-1,82)	2,63 * (2,29-3,17)	3,24 * (2,33-3,58)	3,13 * (2,40-4,12)	H=2,934 p=0,231

Примечание: ***** p<0,017 при сравнении с контрольной группой (скорректированный критический уровень статистической значимости при проведении 3-х сравнений).

В соответствии с результатами, приведёнными в таблице 46, уровень sТМ во всех нозологических группах обследованных пациентов был существенно выше контрольных

показателей. Повышение концентрации sTM было несколько более выражено у больных ИП и ПМФ, однако различия между группами пациентов не были значимы. Тем самым, повреждение эндотелия, по-видимому, свойственно больным всех нозологий Ph-негативных МПН. При этом у больных ЭТ отмечалась прямая корреляция уровня sTM с числом тромбоцитов крови (R=0,521 p=0,032). Анализ показателей пациентов с ПМФ выявил наличие прямой корреляционной связи концентрации sTM с активностью фVIII (R=0,747 p=0,0002) и фВ (R=0,603 p=0,006) и обратную взаимосвязь с уровнем свободного PS (R=-0,577 p=0,012) и $STM_{Peak\ thrombin}$ (R=-0,504 p=0,028). Содержание sTM и АгфВ у пациентов с ПМФ были связаны прямой корреляционной зависимостью высокой силы и высокого уровня значимости (R=0,730 p=0,0004).

Для выявления категорий пациентов, характеризующихся наиболее выраженными патологическими изменениями эндотелия, была проведена оценка влияния на уровень sTM такого фактора риска развития тромботических осложнений у больных Ph-негативными МПН, как наличие тромбозов в анамнезе. Результаты, полученные в общей группе обследованных пациентов, приведены в таблице 47.

Таблица 47 - Уровень sTM у пациентов с Ph-негативными МПН в зависимости от наличия тромбозов в анамнезе (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=15)	Ph(-)МПН (n=65)		p
		без тромбозов в анамнезе (n=45)	с тромбозами в анамнезе (n=20)	
Уровень sTM, ng/ml	1,59 (1,45-1,82)	2,90 * (2,33-3,56)	3,30 * (2,57-4,00)	0,118

Примечание: ***** p<0,025 при сравнении 2-х групп с контрольной группой;

p- уровень значимости при сравнении двух групп пациентов между собой

Анализ данных, представленных в таблице 47, обнаружил существенное повышение уровня sTM у пациентов с Ph-негативными МПН относительно нормы независимо от наличия тромбозов в анамнезе. Однако у больных с тромботическим анамнезом наблюдалась тенденция к более выраженному росту данного показателя и, соответственно, более высокой степени повреждения эндотелия. Сходные закономерности были выявлены и в отдельных нозологических группах пациентов с Ph(-)МПН, а именно у больных ЭТ и ИП (таблицы 48-49). Среди пациентов с ПМФ, для которых были получены данные уровня sTM, тромботические осложнения были установлены в анамнезе лишь 2-х лиц, что не позволило провести сравнительный анализ.

Таблица 48 - Уровень sTM у пациентов с ЭТ в зависимости от наличия тромбозов в анамнезе (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=15)	ЭТ (n=22)		p
		без тромбозов в анамнезе (n=13)	с тромбозами в анамнезе (n=9)	
Уровень sTM, ng/ml	1,59 (1,45-1,82)	2,60 * (2,19-3,14)	2,79 * (2,34-4,11)	0,316

Примечание: * p<0,025 при сравнении 2-х групп с контрольной группой;

p- уровень значимости при сравнении двух групп пациентов между собой

Таблица 49 - Уровень sTM у пациентов с ИП в зависимости от наличия тромбозов в анамнезе (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=15)	ИП (n=24)		p
		без тромбозов в анамнезе (n=15)	с тромбозами в анамнезе (n=9)	
Уровень sTM, ng/ml	1,59 (1,45-1,82)	2,97 * (2,14-3,49)	3,35 * (3,15-3,64)	0,257

Примечание: * p<0,025 при сравнении 2-х групп с контрольной группой;

p- уровень значимости при сравнении двух групп пациентов между собой

Кроме тромботического анамнеза, признанным фактором риска развития тромбозов у пациентов с Ph-негативными МПН является наличие мутации JAK2 V617F. Данные по оценке влияния данного параметра на уровень sTM представлены в таблицах 50-52.

Таблица 50 - Уровень sTM у пациентов с Ph-негативными МПН в зависимости от наличия мутации JAK2 V617F (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=15)	Ph(-)МПН (n=64)		p
		JAK2V617F+ (n=49)	JAK2V617F- (n=15)	
Уровень sTM, ng/ml	1,59 (1,45-1,82)	3,15 * (2,37-3,73)	2,49 * (2,34-3,38)	0,466

Примечание: * p<0,025 при сравнении 2-х групп с контрольной группой.

p- уровень значимости при сравнении двух групп пациентов между собой

Сравнительный анализ общей группы обследованных больных Ph-негативными МПН не выявил существенных различий в зависимости от мутационного статуса JAK2 V617F, значения уровня sTM в обеих группах значительно превышали контрольные показатели (таблица 50). Аналогичные результаты отмечались при оценке пациентов с ЭТ (таблица 51).

Таблица 51 - Уровень sTM у пациентов с ЭТ в зависимости от наличия мутации JAK2V617F (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=15)	ЭТ (n=22)		p
		JAK2V617F+ (n=15)	JAK2V617F- (n=7)	
Уровень sTM, ng/ml	1,59 (1,45-1,82)	2,66 * (2,36-3,16)	2,49 * (2,23-3,26)	0,724

Примечание: ***** p<0,025 при сравнении 2-х групп с контрольной группой;

p- уровень значимости при сравнении двух групп пациентов между собой

Среди пациентов с ИП все полученные показатели уровня sTM принадлежали больным, позитивным по мутации JAK2 V617, что не позволило провести сравнительную оценку. У пациентов с ПМФ повышение уровня sTM было несколько более выражено при наличии мутации JAK2 V617F, однако различия не достигали статистической значимости (таблица 52).

Таблица 52 - Уровень sTM у пациентов с ПМФ в зависимости от наличия мутации JAK2 V617F (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=15)	ПМФ (n=19)		p
		JAK2 V617F+ (n=11)	JAK2 V617F- (n=8)	
Уровень sTM, ng/ml	1,59 (1,45-1,82)	3,88 * (2,63-4,34)	2,71 * (2,39-3,33)	0,321

Примечание: ***** p<0,025 при сравнении 2-х групп с контрольной группой;

p- уровень значимости при сравнении двух групп пациентов между собой

Оценка влияния аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F на уровень sTM у обследованных пациентов с Ph-негативными МПН позволила выявить прямую корреляционную взаимосвязь средней силы с уровнем значимости, близким к критическому (R=0,365, p=0,052).

Результаты оценки изменений уровня sTM у обследованных больных ЭТ под влиянием получаемой терапии приведены в Таблице 53.

Таблица 53 - Уровень sTM у пациентов с ЭТ в зависимости от терапии (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=15)	ЭТ		
		а/а (n=12)	циторедуктивные препараты +/-а/а (n=8)	Сравнение 2-х групп пациентов по терапии, p
Уровень sTM, ng/ml	1,59 (1,45-1,82)	3,02 * (2,57-3,75)	2,30 * (2,19-2,64)	0,045

Примечание: * p<0,025 при сравнении с контрольной группой (скорректированный критический уровень статистической значимости при проведении 2-х сравнений);

а/а – антиагрегантная терапия;

p- уровень значимости при сравнении двух групп пациентов между собой

Как видно из данных, представленных в таблице 53, значения уровня sTM в обеих группах пациентов были существенно выше нормы. При этом показатели больных ЭТ, принимавших только антиагреганты, значимо превышали значения пациентов, лечение которых включало циторедуктивные препараты. Кроме описанных групп, показатели концентрации sTM были получены для 2 больных ЭТ, не получавших медикаментозного лечения (уровень sTM в плазме составил 2,38 и 3,40 нг/мл), однако малое количество пациентов не позволило включить означенную группу в сравнительный анализ.

Результаты определения концентрации sTM у пациентов с ИП в зависимости от терапии приведены в таблице 54.

Таблица 54 - Уровень sTM у пациентов с ИП в зависимости от терапии (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	Контрольная группа (n=15)	ИП		
		а/а (n=11)	циторедуктивные препараты +/-а/а (n=11)	Сравнение 2-х групп пациентов по терапии, p
Уровень sTM, ng/ml	1,59 (1,45-1,82)	3,23 * (2,56-3,45)	3,35 * (2,43-3,68)	0,694

Примечание: * p<0,025 при сравнении с контрольной группой (скорректированный критический уровень статистической значимости при проведении 2-х сравнений);

а/а – антиагрегантная терапия.

Как можно видеть по данным, представленным в таблице 54, у пациентов с ИП, которые получали только антиагреганты, а также у больных, лечение которых включало

циторедуктивные препараты отдельно или в сочетании с антиагрегантами, показатели уровня sTM были значительно выше нормы и не зависели от вида терапии. Также значения концентрации sTM были получены для 2-х пациентов с ИП, не принимавших медикаментозных средств (значения уровня sTM 1,94 и 3,42 нг/мл), указанную группу больных ИП не включали в анализ.

Результаты определения уровня sTM у пациентов с ПМФ в зависимости от терапии приведены в таблице 55.

Таблица 55 - Уровень sTM у пациентов с ПМФ в зависимости от терапии (Медиана, Q1—Q3)

Показатели	контроль-ная группа (n=15)	ПМФ			
		без терапии (n=6)	а/а (n=6)	циторедуктив-ные препараты +/-а/а (n=5)	Сравнение 3-х групп больных по терапии (Критерий Краскела-Уоллиса)
Уровень sTM, ng/ml	1,59 (1,45-1,82)	3,30 * (2,48-3,91)	2,68 * (2,16-3,11)	3,93 * (3,55-4,30)	H=2,920 p=0,232

Примечание: ***** p<0,017 при сравнении с контрольной группой;
а/а – антиагрегантная терапия.

Как демонстрируют данные, представленные в таблице 55, показатели уровня sTM в отдельных группах пациентов с ПМФ были существенно выше нормы и значимо не отличались между собой. Кроме представленных в таблице, результаты содержания sTM были получены для 2-х больных ПМФ, терапия которых включала руксолитиниб (концентрация sTM 2,53 и 5,13 нг/мл). Малое количество не позволило использовать эти данные для анализа.

Тем самым, во всех нозологических группах обследованных больных Ph-негативными МПН уровень sTM был значительно выше показателей здоровых лиц независимо от наличия и вида терапии. Влияние получаемого лечения на значения sTM было выявлено только у пациентов с ЭТ и проявлялось в более выраженном повышении его уровня в группе, получавшей в качестве основного терапевтического средства антиагреганты, относительно больных, лечение которых включало циторедуктивные препараты.

Проведённая в настоящем исследовании оценка содержания фВ и концентрации sTM выявила их значительное повышение у пациентов с Ph-негативными МПН, свидетельствующее о развитии эндотелиальной дисфункции. Однако рост уровня данных маркеров имел различную выраженность в зависимости от принадлежности больных к различным нозологиям, тромботического анамнеза и получаемой терапии. Так, увеличение АгфВ в большей степени

было характерно для больных ИП и ПМФ, в то время как повышение концентрации sTM наблюдалось во всех нозологических группах. Рост уровня фВ был значимо более выражен при наличии тромбозов в анамнезе обследованных пациентов, тогда как концентрация sTM имела лишь тенденцию к повышению у больных с предшествующими тромботическими осложнениями. Мутационный статус JAK2V617F значимо не влиял на содержание обоих маркеров. В то же время была выявлена прямая корреляция аллельной нагрузки мутации JAK2V617F с АгфВ у пациентов с ИП и с уровнем sTM в общей группе больных Ph(-)МПН. У пациентов с ИП и ПМФ, получавших циторедуктивные и/или таргетные препараты, отмечался наиболее выраженный рост АгфВ, в то время как в этих же нозологических группах терапия не оказывала существенного влияния на концентрацию sTM. Более того, у больных ЭТ, получавших антиагрегантную терапию, обнаруживалось значимое увеличение уровня sTM относительно пациентов, принимавших циторедуктивные препараты. Выраженная корреляционная зависимость АгфВ и концентрации sTM с прокоагулянтными изменениями показателей плазменного звена гемостаза свидетельствует о тесной взаимосвязи эндотелиальных нарушений с развитием гиперкоагуляции у пациентов с Ph(-)МПН. Особенно обращает на себя внимание взаимосвязь обоих исследованных эндотелиальных маркеров со снижением эффективности работы системы естественных антикоагулянтов протеина С, подчеркивающая определяющую роль эндотелиальной дисфункции в развитии протромботического состояния у пациентов с Ph-негативными МПН.

Кроме определения растворимых в плазме биохимических маркеров, продуцируемых эндотелием при активации и повреждении, для характеристики состояния эндотелия используется также оценка с помощью методов функциональной диагностики. В настоящем исследовании мы применяли неинвазивный метод периферической артериальной тонометрии (peripheral arterial tonometry, PAT), который позволяет оценить эндотелий-зависимую вазодилататорную реакцию микрососудистого русла при развитии реактивной гиперемии, вызванной проведением окклюзионной манжеточной пробы. Функциональную активность эндотелия при этом характеризовали величиной индекса реактивной гиперемии (reactive hyperemia index, RHI), значения которого ниже 1,67 свидетельствуют о развитии эндотелиальной дисфункции, параметры от 1,67 до 2,0 лежат в зоне риска и показатели, превышающие 2,0, соответствуют нормальному функционированию эндотелия. В таблице 56 приведены значения RHI пациентов различных нозологических групп Ph-негативных МПН.

Таблица 56 - Значения RHI в различных нозологических группах Ph-негативных МПН (медиана, Q1-Q3)

Показатели	ЭТ (n=22)	ИП (n=17)	ПМФ (n=10)	Сравнение нозологических групп пациентов (Критерий Краскела-Уоллиса)
RHI	1,79 (1,52-2,20)	1,73 (1,49-2,65)	1,85 (1,69-1,92)	H=0,269 p=0,874

Сравнение RHI обследованных пациентов не выявило значимых различий между нозологическими группами. Однако показатели больных ЭТ и ИП были в большей степени сдвинуты в область низких значений RHI≤1,67, указывая на большую выраженность дисфункции эндотелия. Распределение пациентов с Ph(-)МПН и отдельных нозологических групп по наличию/отсутствию эндотелиальной дисфункции в соответствии с полученными значениями RHI представлено на рисунках 4 и 5.

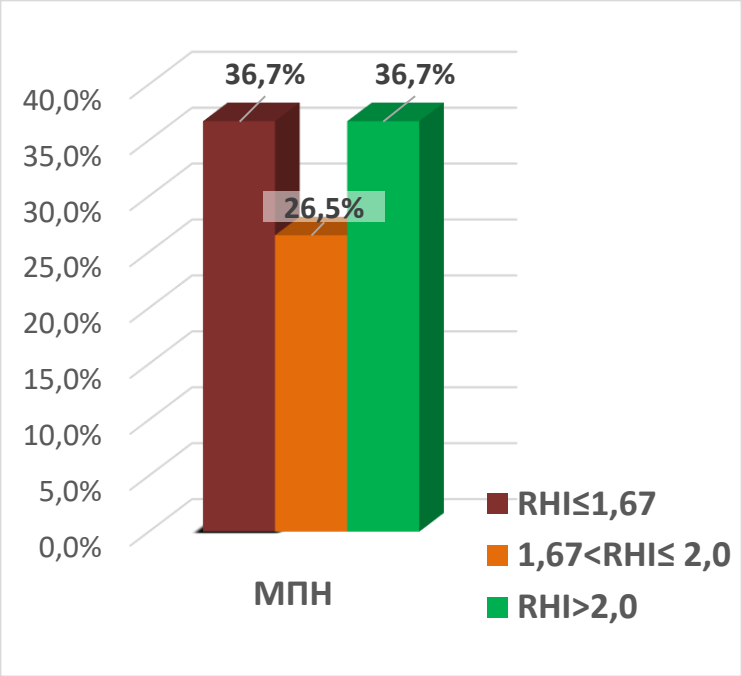

Рисунок 4 - Распределение пациентов с Ph-негативными МПН в соответствии с показателями RHI

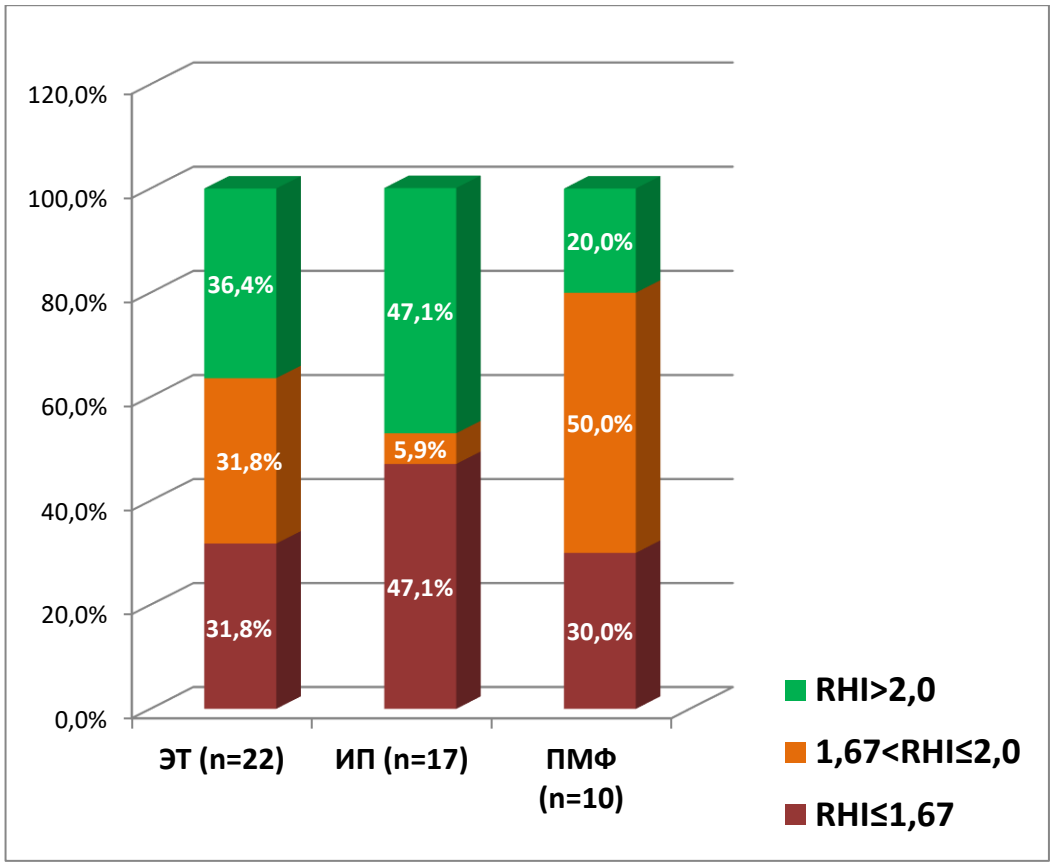

Рисунок 5 - Распределение пациентов отдельных нозологических групп Ph-негативных МПН в соответствии с показателями RHI

Как видно из рисунка 4, определение RHI позволило выявить наличие эндотелиальной дисфункции у 36,7% обследованных пациентов с Ph-негативными МПН. При рассмотрении отдельных нозологических групп дисфункция эндотелия была наиболее выражена у пациентов с ИП (47,1%) и в меньшей степени среди больных ЭТ (31,8%) и ПМФ (30,0%) (рисунок 5). Кроме того, существенная доля значений RHI обследованных пациентов соответствовала зоне риска (1,67<RHI≤2,0). В этом диапазоне лежали значения RHI 26,5% общей группы больных Ph(-)МПН, 31,8% больных ЭТ, 5,9% больных ИП и 50% больных ПМФ. В то время как выявленная высокая встречаемость значений RHI≤1,67 свидетельствует о наличии выраженной вазомоторной дисфункции эндотелия, результаты, лежащие в зоне риска, также предполагают определённое нарушение вазодилататорной функции эндотелия.

Проведение корреляционного анализа позволило выявить прямую зависимость между показателями RHI и уровнем свободного PS у обследованных пациентов с Ph(-)МПН (R=0,369 p=0,037). При оценке отдельных нозологических групп сходная корреляционная зависимость высокой силы отмечалась у больных ИП (R=0,709 p=0,015). В этой же группе пациентов RHI напрямую коррелировал с $STM_{Peak\ thrombin}$ в ТГТ (R=0,645 p=0,032). Отмеченные зависимости свидетельствовали о взаимосвязи эндотелиальной дисфункции, выявляемой при помощи метода PAT, с нарушением системы протеина С у больных Ph(-)МПН. На наличие связи

вазомоторной функции эндотелия с работой естественных антикоагулянтных систем также указывала прямая корреляция RHI с активностью АТ у пациентов с ИП (R=0,683 p=0,020). Взаимосвязь вазодилататорной функции эндотелия с уровнем исследованных растворимых маркеров ЭД обнаруживалась только при анализе группы больных ЭТ и заключалась в обратной зависимости средней силы с уровнем значимости, близким к критическому, между показателями RHI и концентрацией sTM (R=-0,650 p=0,058).

Применение неинвазивного метода PAT способствовало выявлению вазомоторной дисфункции эндотелия у 37% обследованных больных Ph-негативными МПН, наибольшая доля лиц с ЭД отмечалась среди пациентов с ИП (47%). В этой же группе больных была обнаружена корреляционная зависимость между нарушением вазодилататорной функции эндотелия и снижением уровня и эффективности работы системы естественных антикоагулянтов протеина С, подчеркивая взаимосвязь ЭД и гиперкоагуляционных изменений плазменного звена гемостаза.

Анализ состояния эндотелия, включающий определение растворимых маркеров, а также неинвазивный метод PAT, проведённый в настоящем исследовании, выявил развитие выраженной эндотелиальной дисфункции у пациентов с Ph-негативными МПН. Нарушение как гемостатической, так и вазомоторной функций эндотелия было ассоциировано со снижением эффективности системы естественных антикоагулянтов и развитием протромботических состояний. Использование различных методов в совокупности более полно характеризует состояние эндотелия и способствует многосторонней оценке эндотелиальной дисфункции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Миелопролиферативные новообразования (МПН) – группа редких заболеваний клональной природы, для которых характерна аномальная пролиферация гемопоэтических стволовых клеток миелоидного ростка кроветворения и соединительнотканных структур костного мозга, приводящая к увеличению количества зрелых клеток одной или нескольких линий дифференцировки [2, 175]. Классические Ph-негативные МПН включают истинную полицитемию (ИП), эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ) и первичный миелофиброз (ПМФ). Тромбозы составляют основную часть осложнений при Ph-негативных МПН, внося существенный вклад в заболеваемость и смертность при данных патологиях [63, 81, 191]. Общая частота тромбозов у пациентов с Ph-негативными МПН существенно выше популяционной и составляет 12-45% при ИП, 11-30% при ЭТ и 7,2-11,6% при ПМФ [28, 71, 81, 82, 130, 159, 170, 177, 191, 192, 208, 215]. Ключевую роль в патогенезе тромботических осложнений у пациентов с Ph-негативными МПН отводят изменениям количества и активационного статуса клеток крови. В ряде исследований продемонстрировано, что активация циркулирующих эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов сопутствует процессу миелопролиферации [70, 102, 103, 104, 119, 131, 144, 154, 158, 160]. Однако влияние миелопролиферативных изменений на показатели гемостаза не настолько однозначно, и в литературе имеются данные, свидетельствующие о разнонаправленных изменениях в системе гемостаза. Настоящее исследование имело целью провести комплексную оценку состояния системы гемостаза для выявления особенностей, характеризующих тромботическую направленность, у пациентов с Ph-негативными МПН. Исследование включало 124 больных, в том числе 36 пациентов с ЭТ, 47 пациентов с ИП и 41 пациент с ПМФ, у которых анализировали параметры, отражающие состояние плазменного звена гемостаза, оценивали особенности состояния тромбоцитарного звена гемостаза и определяли степень выраженности эндотелиальной дисфункции.

Для оценки состояния плазменного звена гемостаза проводили определение параметров скрининговой коагулограммы, активности коагуляционных факторов и естественных антикоагулянтов, а также выполняли интегральный тест генерации тромбина. Анализ показателей скрининговой коагулограммы у обследованных больных в сравнении с контрольной группой здоровых лиц выявил увеличение индекса АПТВ и снижение ПТ. Отмеченные изменения указывают на пролонгацию времени свертывания в соответствующих тестах и согласуются с результатами ряда авторов [83, 88, 92, 204], свидетельствуя о наличии у пациентов с Ph(-)МПН сдвига базовых коагуляционных параметров в сторону гипокоагуляционных значений. Обнаруженная нами обратная корреляционная зависимость

между ПТ и числом лейкоцитов крови больных Ph(-)МПН подтверждает влияние воспалительного процесса, ассоциированного с миелопролиферацией, на состояние плазменного гемостаза. При анализе показателей отдельных нозологических групп увеличение индекса АПТВ относительно контрольных значений было наиболее выражено у пациентов с ЭТ и ПМФ, в то время как снижение ПТ отмечалось только у больных с ИП и ПМФ. Значения ПТ у пациентов с ЭТ были близки к показателям контрольной группы и значимо превышали параметры больных ИП и ПМФ.

На этом фоне обследованные пациенты с Ph-негативными МПН характеризовались существенным ростом уровня фибриногена и активности фVIII относительно контрольных показателей, что свидетельствует о гиперкоагуляционных изменениях и выраженности воспалительного процесса. Отмечено наличие прямой корреляции между указанными параметрами. При анализе отдельных нозологий увеличение активности фVIII было наиболее характерно для больных ИП и ПМФ, у которых отмечались значимые отличия по данному показателю относительно контрольной группы. Концентрация фибриногена была значимо выше контрольных величин во всех обследованных нозологических группах. При этом у пациентов с ЭТ была выявлена прямая связь уровня фибриногена с числом тромбоцитов крови, подчеркивая влияние миелопролиферативных изменений на состояние плазменного гемостаза. Наличие тромботического анамнеза приводило к ещё большему увеличению концентрации фибриногена у пациентов с ЭТ и активности фVIII у пациентов с ИП, значимо превышавших соответствующие показатели больных, не имевших тромбозов в анамнезе. Полученные данные об увеличении активности фVIII согласуются с результатами Arellano-Rodrigo E. et al., отмечавших значительное повышение активности данного коагуляционного фактора в циркуляции у больных ЭТ с тромбозами в анамнезе относительно как контрольной группы, так и пациентов без тромбозов [158]. В то же время в работах Duchemin J. et al. и Tripodi A. et al. рост уровня и активности фVIII в плазме пациентов с Ph(-)МПН не был подтвержден: данные параметры не обнаруживали существенных отличий от референтных значений [88, 99], что может быть связано с вкладом особенностей, характерных для больных ЭТ, показатели активности фVIII которых по нашим данным значимо не отличались от контрольных величин. Отсутствие влияния мутационного статуса JAK2 V617F на активность коагуляционных факторов в плазме у пациентов с ЭТ, продемонстрированное Arellano-Rodrigo E. et al. [158], соответствует результатам настоящего исследования, не выявившим существенных отличий активности фVIII в обследованных нозологических группах пациентов в зависимости от наличия мутации JAK2 V617F. В то же время нами была обнаружена прямая корреляция аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F с активностью фVIII у пациентов с ИП, что может

определять повышенный тромботический риск, обусловленный увеличением нагрузки данной мутации.

В результате, при анализе показателей скрининговой коагулограммы и активности коагуляционных факторов в отдельных нозологических группах у больных ЭТ было обнаружено наименьшее количество патологических показателей по сравнению с контрольными значениями (индекс АПТВ и концентрация фибриногена). Проведение корреляционного анализа выявило прямую зависимость уровня фибриногена у пациентов с ЭТ с числом тромбоцитов крови. У пациентов с ИП изменения затрагивали большее число показателей. От контрольных параметров значимо отличались ПТ, концентрация фибриногена и активность фVIII. Ещё большие расхождения между нормальными значениями и направленностью выявленных изменений были обнаружены у больных ПМФ. Резкое снижение показателя ПТ и повышение индекса АПТВ сопровождалось как увеличением концентрации фибриногена, так и ростом активности фVIII.

Оценка состояния плазменных антикоагулянтов обследованных больных Ph-негативными МПН в сравнении с показателями здоровых лиц позволила выявить значительное падение уровня свободного протеина S (PS) и снижение активности протеина С (PC), между которыми наблюдалась прямая корреляция. Отмеченные особенности указывают на нарушение антикоагулянтной системы протеина С, характерное для больных Ph(-)МПН. Выявлено влияние воспалительного процесса на уровень свободного PS, которое выражалось в наличии обратной корреляционной связи между данным показателем и числом лейкоцитов крови. На фоне подобных изменений активность антитромбина обследованных больных Ph(-)МПН, напротив, значимо превышала показатели контрольной группы. Данная особенность сохранялась во всех нозологических группах обследованных пациентов. При этом наиболее высокие значения активности АТ были отмечены у больных ПМФ. Однако различия между нозологическими группами по данному показателю не достигали статистической значимости. Повышенной активности АТ сопутствовала низкая активность PC, которая достигала значимых различий с контрольными показателями у пациентов с ИП и ПМФ. Сравнение нозологических групп между собой не выявило значимых отличий по активности PC. Уровень свободного PS был существенно ниже нормальных величин во всех обследованных группах. У пациентов с ПМФ отмечались наиболее низкие значения данного параметра, значимо отличавшиеся также от показателей больных ЭТ. Анализ имеющихся исследований, посвящённых определению естественных антикоагулянтов у пациентов с Ph(-)МПН, демонстрирует противоречивые результаты. Значимое уменьшение активности/уровня PC при сравнении с контрольной группой было отмечено лишь в исследованиях Bucalossi A. et al. у больных ИП и ЭТ [167] и Tripodi A. et al. у пациентов с ИП [88], согласуясь с данными настоящей работы. В то же время

Duchemin J. et al. и Arellano-Rodrigo E. et al. не наблюдали существенного снижения уровня PC у больных ЭТ и ИП относительно контрольных значений [99, 158], что может объясняться существенным вкладом особенностей, характерных для пациентов с ЭТ, не имевших по нашим данным значимых отклонений указанного параметра от здоровых лиц. Изменения, касающиеся PS, отмечались в работах различных исследовательских групп чаще. Снижение уровня свободного PS относительно здоровых лиц обнаружено у пациентов с ЭТ, ИП и ПМФ в работах Duchemin J. et al., Tripodi A. et al., Marchetti M. et al., Arellano-Rodrigo E. et al. и соответствовало полученным нами результатам [88, 99, 158, 204]. В то же время показатели активности/уровня AT по данным Arellano-Rodrigo E. et al. и Tripodi A. et al. у пациентов с ЭТ не обнаруживали существенных отличий от нормальных значений [88, 158]. Повышение активности данного естественного антикоагулянта у пациентов с Ph-негативными МПН, по-видимому, имеющее компенсаторное значение, показано впервые в настоящем исследовании.

Проведённый нами анализ активности/уровня естественных антикоагулянтов у пациентов с Ph-негативными МПН не выявил существенного влияния тромботического анамнеза, что несколько противоречит имеющимся данным литературы. Так, в исследовании Bucalossi A. et al. у больных ИП и ЭТ с предшествующими тромбозами одиночный или множественный дефицит естественных антикоагулянтов выявлялся чаще, наблюдалось существенное снижение активности AT и уровня общего PS в сравнении с пациентами без тромбозов в анамнезе [167]. Аналогично нашим результатам, различий активности PC в зависимости от тромботического анамнеза авторы не обнаружили [167]. Однако связь активности PC с наличием тромбозов в анамнезе была продемонстрирована в исследовании Amitrano L. et al.: среди пациентов с ЭТ, ИП и ПМФ частота изолированного дефицита PC у больных с тромбозами вен брюшной полости превышала аналогичный параметр у пациентов без тромбозов в анамнезе и у здоровых лиц [206].

Оценка влияния мутационного статуса JAK2 V617F на показатели активности/уровня естественных антикоагулянтов выявила снижение активности AT у JAK2 V617F-позитивных пациентов с Ph-негативными МПН относительно больных с аллелем дикого типа. Данная особенность сохраняла значимость среди пациентов с ЭТ. Кроме того, учитывая наличие мутации JAK2 V617F у большинства (91,5%) обследованных пациентов с ИП, её влияние может определять наиболее низкие показатели активности AT в данной группе относительно больных других нозологий. В исследованиях других авторов по большей части продемонстрировано влияние мутации JAK2 V617F на плазменные компоненты антикоагулянтной системы PC, а именно, на протеин S. Так, по данным Marchetti M. et al. и Arellano-Rodrigo E. et al. более значительное снижение уровня свободного PS у больных ЭТ и ИП отмечалось при носительстве мутации JAK2 V617F [158, 204]. У пациентов с ИП наиболее выраженное падение

свободного PS наблюдалось у гомозигот по мутации JAK2 V617F [204]. При этом в исследовании Arellano-Rodrigo E. et al. у больных ЭТ была выявлена ассоциация аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F с падением уровня свободного PS плазмы [158]. Последняя особенность подтверждена результатами настоящей работы, указывающими на наличие обратной корреляции между аллельной нагрузкой мутации JAK2 V617F и уровнем свободного PS, а также активностью PC. Связь аллельной нагрузки JAK2 V617F со снижением активности PC, а также влияние данной мутации на снижение активности AT у пациентов с Ph-негативными МПН впервые отмечены в нашем исследовании. Нарушение эффективности работы естественных антикоагулянтов может определять повышенный тромботический риск, обусловленный наличием и нагрузкой мутации JAK2 V617F у пациентов с Ph(-)МПН.

При проведении интегрального теста генерации тромбина в стандартных условиях у пациентов с Ph-негативными МПН было выявлено падение скорости генерации тромбина, низкие значения эндогенного потенциала (ETP) и пиковой концентрации тромбина (Peak thrombin) относительно показателей здоровых лиц, свидетельствуя о снижении уровня и замедлении процесса генерации тромбина у обследованных больных. Отмеченные изменения сохранялись для отдельных нозологических групп, за исключением показателей ETP у пациентов с ЭТ и ИП, которые значимо не отличались от контрольных параметров. ETP у пациентов с ПМФ был значимо ниже не только относительно здоровых лиц, но и при сравнении с больными ЭТ. Данные о снижении количественных параметров ТГТ у больных Ph-негативными МПН также представлены в литературных источниках. По данным Marchetti M. et al. ETP в плазме пациентов с ЭТ и ИП был ниже, чем в контрольной группе, падение было наиболее выражено у больных ИП. Сходная тенденция наблюдалась для показателя Peak thrombin, но различия с контрольной группой не достигали статистической значимости [204]. Согласуясь с результатами Marchetti M. et al. [204], снижение ETP относительно показателей здоровых лиц показано также Duchemin J. et al. и Tripodi A. et al. в плазме пациентов с ЭТ, ИП и ПМФ [88, 99]. В нашем исследовании была выявлена прямая зависимость между величиной ETP и уровнем свободного протеина S, а также активностью протеина C у пациентов с Ph(-)МПН. Кроме того, у обследованных больных обнаружена обратная корреляция скорости генерации тромбина с уровнем гемоглобина и числом эритроцитов крови, подчеркивая связь отмеченных изменений параметров ТГТ с миелопролиферативными особенностями. Наиболее тесная обратная взаимосвязь между показателями клинического анализа крови (в том числе уровнем гемоглобина, гематокритом и числом эритроцитов) и ТГТ (скоростью генерации тромбина, ETP и Peak thrombin) продемонстрирована среди пациентов с ИП.

Значимого влияния тромботического анамнеза на показатели ТГТ в стандартной постановке у обследованных пациентов с Ph-негативными МПН выявлено не было. В то же

время в исследовании Marchetti M. et al. у больных с тромбозами в анамнезе значения Peak thrombin превышали показатели пациентов без тромбозов. Кроме того, у больных Ph(-)МПН, перенесших венозный тромбоз, отмечалось не только повышение концентрации тромбина, но и более высокие значения ETP [204].

Также нами не было обнаружено отличий по скорости и количественным показателям ТГТ у обследованных пациентов с Ph(-)МПН в зависимости от мутационного статуса JAK2 V617F. В то же время по данным Marchetti M. et al. среди больных ЭТ и ИП снижение ETP было наиболее выражено у носителей мутации JAK2 V617F [204]. Кроме того, в работе Tripodi A. et al. была показана обратная корреляция ETP и скорости генерации тромбина с аллельной нагрузкой JAK2 V617F у пациентов с ЭТ и ИП [99]. Влияние аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F на параметры ТГТ подтверждено в настоящем исследовании. У обследованных пациентов с Ph(-)МПН отмечена обратная взаимосвязь аллельной нагрузки данной мутации с обоими количественными показателями ТГТ. Указанная корреляция сохраняла значимость в отношении показателей ETP у больных ИП, а также ETP, Peak thrombin и скорости генерации тромбина у пациентов с ПМФ.

Проведение ТГТ с добавлением в реакционную смесь ТМ позволило выявить у обследованных пациентов снижение чувствительности к ТМ по падению как ETP, так и Peak thrombin, что указывает на нарушение работы естественных антикоагулянтов системы протеина С и является общепризнанным фактором риска тромботических осложнений. Уменьшение чувствительности к ТМ по сравнению с показателями здоровых лиц было характерно для всех нозологических групп. Полученные результаты подтверждают данные исследований Duchemin J. et al. и Tripodi A. et al. о снижении чувствительности к ТМ в плазме пациентов с ИП, ЭТ и ПМФ относительно показателей здоровых лиц при оценке параметров генерации тромбина в присутствии экзогенного ТМ [88, 99]. Падение чувствительности к ТМ у пациентов с Ph(-)МПН в указанных работах было ассоциировано с числом тромбоцитов, а также со снижением уровня свободного PS, активности PC и AT [88, 99]. В настоящей работе отмечена сходная зависимость между падением чувствительности к ТМ и снижением активности PC и уровня свободного PS, а также обнаружена обратная корреляция между чувствительностью к ТМ и активностью фVIII. Влияния тромботического анамнеза, а также мутационного статуса и аллельной нагрузки JAK2 V617F на показатели чувствительности к ТМ у обследованных пациентов выявлено не было. По данным Tripodi A. et al. чувствительность к ТМ у пациентов с ЭТ, ИП и ПМФ также не зависела от наличия мутации JAK2 V617F [88]. В то же время Duchemin J. et al. отмечали наибольшее снижение этого параметра у пациентов с ЭТ и ИП, гомозиготных по мутации JAK2 V617F [99]. Расхождение результатов различных исследований по оценке влияния тромботического анамнеза и мутации JAK2 V617F на коагуляционные параметры может быть связано с

особенностями состава обследованных групп больных, в том числе по частоте наличия данных факторов, а также виду предшествующих тромботических осложнений.

Выполнение ТГТ в плазме пациентов с Ph(-)МПН как по полученным нами результатам, так и по данным других авторов, обнаруживает, с одной стороны, снижение количественных показателей, характеризующих прокоагулянтный потенциал и уровень образования тромбина, а с другой — падение чувствительности к ТМ, свидетельствующее о снижении антикоагулянтного потенциала. В соответствии с данными настоящего исследования указанные изменения параметров ТГТ в основном сохранялись для отдельных нозологических групп, но отличались различной степенью выраженности.

Таким образом, при анализе показателей плазменного звена гемостаза в отдельных нозологических группах пациентов с Ph-негативными МПН выявлены особенности, в целом сходные с отмеченными в общей группе обследованных больных, но отличавшиеся по степени выраженности в различных нозологиях. Наиболее существенные отличия от показателей контрольной группы обнаружены у пациентов с ПМФ. Больные этой же группы демонстрировали наибольшее расхождение между направленностью выявленных изменений. Значимое снижение таких параметров как ПТ, ETP и уровень свободного PS отличали больных ПМФ от пациентов с ЭТ. Наименьшие, по сравнению с пациентами с ИП и ПМФ, отклонения от нормальных значений были характерны для группы больных ЭТ.

В настоящем исследовании также был проведен анализ влияния получаемой больными Ph(-)МПН терапии на показатели плазменного звена гемостаза. Среди пациентов с ИП было обнаружено значимое падение уровня свободного PS у лиц, принимавших циторедуктивные препараты, относительно больных, не получавших медикаментозных средств на момент обследования, и тенденция к снижению данного параметра относительно пациентов, находившихся на антиагрегантной терапии. В группе обследованных больных ПМФ принимавшие циторедуктивные препараты или руксолитиниб обнаруживали значимое повышение концентрации фибриногена относительно пациентов без терапии. Повышение активности фVIII, наблюдавшееся у пациентов с ПМФ, принимавших циторедуктивные препараты или руксолитиниб, относительно как больных без терапии, так и получавших только антиагреганты, не достигало статистической значимости. Снижение уровня свободного PS, рост уровня фибриногена и некоторое увеличение активности фVIII у пациентов с Ph(-)МПН, получавших циторедуктивные препараты или руксолитиниб, может указывать на усиление гиперкоагуляции, сопутствующее данным видам терапии. Влияния терапии на показатели ТГТ у обследованных больных не отмечено. Снижение уровня свободного протеина S и падение чувствительности к ТМ наблюдались независимо от наличия или вида терапии, что позволяет считать их характерными лабораторными признаками пациентов с Ph-негативными МПН.

Оценка влияния терапии на показатели плазменного гемостаза у пациентов с Ph-негативными МПН ранее не проводилась.

Результаты, полученные при обследовании пациентов с Ph-негативными МПН, не дают возможности однозначно оценить состояние плазменного звена гемостаза. Наряду с существенным ростом уровня фибриногена и активности фVIII, а также значительным снижением уровня PS и активности PC относительно показателей здоровых лиц, свидетельствующим о гиперкоагуляционных изменениях, у больных Ph(-)МПН отмечен сдвиг базовых коагуляционных параметров (АПТВ и ПТ) в сторону гипокоагуляционных значений. При проведении интегрального ТГТ для пациентов с Ph-негативными МПН характерной особенностью является снижение относительно величин здоровых лиц показателя ETP, что может указывать на уменьшение прокоагулянтных воздействий и наличие гипокоагуляционных изменений. В то же время наряду с низкими значениями ETP у больных Ph(-)МПН обнаружено выраженное падение чувствительности к TM, характеризующей эффективность естественных антикоагулянтов системы протеина С. Параллельное уменьшение про- и антикоагулянтных влияний может быть направлено на сохранение гемостатического баланса у обследованных пациентов. Прямая корреляция уровня свободного PS и активности PC с величиной ETP у обследованных пациентов с Ph(-)МПН подтверждает ассоциацию снижения антикоагулянтного действия системы протеина С с уменьшением прокоагулянтного потенциала. Как известно, взаимодействие про- и антикоагулянтных влияний определяет сохранность гемостатического баланса, необходимого для нормального функционирования организма. Для оценки направленности и степени изменения гемостатического баланса у пациентов с Ph(-)МПН нами предложен расчетный показатель индекс коагуляции (CI), вычисляемый по формуле:

$$\mathrm{CI} = \frac{\mathrm{ETP}^{\mathrm{N}}{}_{\mathrm{TM-}}}{\mathrm{STM}_{\mathrm{ETP}}}$$

где $\mathrm{ETP}^{\mathrm{N}}{}_{\mathrm{TM-}}$ – эндогенный тромбиновый потенциал пациента в постановке ТГТ без добавления TM, выраженный в процентах относительно нормальных значений (медианы $\mathrm{ETP}_{\mathrm{TM-}}$ группы здоровых доноров), оценивает прокоагулянтный потенциал;

$\mathrm{STM}_{\mathrm{ETP}}$ – чувствительность к TM, вычисленная как процент падения ETP пациента после добавления TM при постановке ТГТ, оценивает антикоагулянтный потенциал.

Тем самым, индекс коагуляции позволяет определить отношение про- и антикоагулянтов, которое может характеризовать сохранность гемостатического баланса обследуемого. Увеличение CI свидетельствует о сдвиге гемостатического баланса в сторону гиперкоагуляции, снижение - указывает на гипокоагуляционные изменения.

Параметры ИК обследованных пациентов с ЭТ, ИП и ПМФ значимо превышали показатели здоровых лиц, свидетельствуя о сдвиге гемостатического баланса в сторону гиперкоагуляции, характерной для каждой группы в целом. Вместе с тем для всех нозологических групп был характерен широкий размах полученных значений. Среди пациентов каждой нозологии встречались как очень низкие показатели, указывающие на риск кровоточивости, так и высокие, соответствующие развитию выраженной в разной степени гиперкоагуляции.

Корреляция значений индекса коагуляции с такими протромботическими особенностями, как повышение активности и уровня фактора Виллебранда, активности фVIII, а также снижение активности/уровня протеинов C и S, отмеченная у пациентов с ЭТ, получавших антиагрегантную терапию препаратами ацетилсалициловой кислоты, указывает на то, что данный показатель отражает гиперкоагуляционные особенности, характерные для пациентов с Ph(-)МПН. Сходная корреляционная связь величин индекса коагуляции со значениями активности и уровня фактора Виллебранда, обнаруженная у больных ПМФ, не получавших лечение на момент обследования, подтверждает значимость определения представленного параметра для выявления гиперкоагуляционных изменений в плазменном звене гемостаза. Ассоциация индекса коагуляции с особенностями клеточного состава крови больных, а именно обратная корреляция его значений с уровнем гематокрита и числом эритроцитов у пациентов с ИП, подчеркивает связь данного показателя, отражающего направленность и степень изменений гемостатического баланса и характеризующего состояние плазменного звена гемостаза, с процессом миелопролиферации.

Определение индекса коагуляции у пациентов с Ph-негативными МПН позволяет осуществить персонализированный подход к выявлению разнонаправленных нарушений гемостатического баланса, результатом которых может быть развитие гипер- или гипокоагуляционного состояния плазменного звена гемостаза.

Тромбоциты играют существенную роль в патогенезе тромбоза при Ph-негативных МПН. Повышенное число кровяных пластинок и их активация in vivo могут вносить вклад в развитие прокоагулянтного фенотипа. Активация тромбоцитов в циркуляции продемонстрирована в целом ряде исследований у пациентов с Ph(-)МПН, в том числе при ЭТ, ИП и ПМФ [103, 104, 119, 151, 158, 209]. В то же время оценка функциональной активности тромбоцитов ex vivo, необходимая для выявления протромботических состояний у больных Ph(-)МПН в клинической практике, демонстрирует неоднозначные (противоречивые) результаты в работах различных авторов.

В настоящем исследовании для определения функциональных особенностей тромбоцитов пациентов с Ph-негативными МПН использовали метод оптической индуцированной агрегатометрии по Борну с добавлением таких агонистов, как АДФ (в концентрациях 1 мкМ и 5мкМ), коллаген (2 мкг/мл) и ристоцетин (1,2 мг/мл). Для характеристики агрегационной активности кровяных пластинок учитывали параметры начальной скорости (V) и максимальной амплитуды (МА) агрегации. Анализ показателей агрегации осуществляли с учётом наличия и вида терапии, принимаемой обследованными больными, в сравнении с контрольной группой здоровых лиц и отдельных групп пациентов между собой.

Оценка агрегационной функции тромбоцитов пациентов с Ph-негативными МПН, не получавших медикаментозного лечения, обнаружила существенное снижение параметров агрегации под действием низких доз АДФ (1 мкМ) относительно контрольных величин. Подобная особенность была характерна для больных всех нозологических групп и может указывать на нарушение рецепторного аппарата кровяных пластинок. При этом у обследованных пациентов без медикаментозной терапии отмечалась обратная корреляция скорости и МА агрегации при индукции АДФ в низких дозах (1 мкМ) с гематологическими показателями, такими как уровень гемоглобина, гематокрит, число эритроцитов и тромбоцитов, свидетельствуя о тесной взаимосвязи указанных агрегационных характеристик с миелопролиферативными изменениями.

Влияние других индукторов, включая высокие концентрации АДФ, на агрегацию тромбоцитов у больных, не получавших терапии, зависело от принадлежности пациентов к различным нозологиям. Наиболее выраженные изменения были характерны для больных ЭТ, у которых V агрегации под действием высоких доз АДФ (5 мкМ) и коллагена, а также МА агрегации при индукции коллагеном и ристоцетином существенно превышали контрольные показатели. Сходные результаты представлены в исследовании Pedersen O.H. et al., продемонстрировавших значимое усиление агрегации тромбоцитов в цельной крови при индукции АДФ (6,5 мкМ) и арахидоновой кислотой у пациентов с ЭТ, не получавших антиагрегантных препаратов, в сравнении с показателями здоровых добровольцев [155]. У больных ИП, не получавших терапии на момент обследования, в настоящем исследовании не было отмечено значимых изменений агрегационной активности тромбоцитов относительно контрольных величин, однако имелась тенденция к росту показателей агрегации при действии АДФ (5 мкМ), коллагена и ристоцетина. Согласуясь с нашими данными, в работе Panova-Noeva M. et al. в группе больных ЭТ и ИП, не получавших лечения, отмечались наиболее высокие показатели агрегации тромбоцитов цельной крови при индукции АДФ и коллагеном [23].

Следует отметить, что адекватная оценка агрегационных характеристик с помощью метода индуцированной агрегатометрии возможна при количестве тромбоцитов в плазме от $150x10^9$/л до $600x10^9$/л, и при показателях числа тромбоцитов в исследуемой PRP, превышавшем верхнее пороговое значение, её разбавляли путём добавления аутологичной PPP до достижения концентрации в пределах необходимого диапазона. По данным работы Grignani C. et al. подобное разведение может приводить к подавлению агрегации тромбоцитов in vitro, в том числе при индукции АДФ или коллагеном, неправомерно свидетельствуя о нарушении функциональной активности тромбоцитов [107]. Авторы предполагают, что снижение агрегации тромбоцитов in vitro, ранее описанное у пациентов с МПН и с тромбоцитозом [14], отчасти связано с лабораторным артефактом. Однако в настоящем исследовании в группе пациентов с ЭТ, для которых наиболее характерно повышенное число тромбоцитов, параметры агрегации под действием АДФ, коллагена и ристоцетина, напротив, превышали показатели здоровых лиц, указывая на отсутствие описанного лабораторного эффекта.

В противоположность больным ЭТ и ИП, группа пациентов с ПМФ, в соответствии с полученными нами результатами, отличалась существенным ослаблением агрегации под действием коллагена относительно как контрольной группы, так и больных ЭТ. Кроме того, скорость агрегации при индукции АДФ (5 мкМ) у них была значимо ниже соответствующих показателей пациентов с ЭТ, а по сравнению с величинами здоровых лиц оба параметра агрегации, вызванной данным агонистом, обнаруживали тенденцию к снижению. Наряду с указанными отклонениями, свидетельствующими о снижении функциональной активности тромбоцитов, отмечалось некоторое усиление агрегации под действием ристоцетина относительно контрольных показателей. Исследований агрегационной активности тромбоцитов у больных ПМФ, не получавших терапии, в доступной литературе не обнаружено.

Таким образом, исследование функциональной активности тромбоцитов у пациентов с Ph-негативными МПН, не получавших медикаментозного лечения на момент обследования, наряду с общей для всех нозологий особенностью, которая заключалась в значимом снижении показателей агрегации под действием АДФ в низких дозах, позволило выявить изменения, характерные для отдельных нозологических групп. Наиболее высокая агрегационная активность кровяных пластинок под действием практически всех индукторов (кроме АДФ, 1 мкМ) отмечена у больных ЭТ. У пациентов с ИП обнаружена тенденция к росту показателей агрегации тромбоцитов относительно значений здоровых лиц. Для больных ПМФ характерна противоположная направленность изменений функциональной активности тромбоцитов, в том числе падение параметров агрегации, вызванной коллагеном, и тенденция к снижению показателей агрегации под действием АДФ (5 мкМ), которые при этом сочетались с усилением агрегации при индукции ристоцетином.

Подавляющее большинство обследованных нами пациентов находилось на той или иной терапии, причём значительная часть больных получала антиагрегантные препараты (в основном ацетилсалициловой кислоты, АСК) в сочетании или без циторедуктивной или таргетной терапии. Как известно, назначение препаратов АСК рекомендовано для предотвращения тромбоэмболических осложнений и широко применяется у пациентов с ЭТ и ИП как при низком, так и высоком риске тромбозов [69, 187].

У обследованных нами больных как ЭТ, так и ИП, лечение которых заключалось в приёме препаратов АСК, отмечалось резкое падение показателей агрегации, вызванной коллагеном, относительно нормальных значений. Подобное изменение подтверждает существенное подавление агрегации тромбоцитов в результате необратимого ингибирования циклооксигеназы и простагландин-тромбоксанового пути передачи сигнала активации под действием АСК. МА агрегации, вызванной АДФ (5 мкМ), у пациентов обеих групп также была значимо ниже контрольных величин. Данная особенность может быть обусловлена нарушением передачи сигнала активации в результате действия АСК и вторичным дефицитом пула хранения. В то же время, приём препаратов АСК не влиял на показатели скорости агрегации при индукции АДФ (5 мкМ), которые превышали контрольные значения, как и у больных без терапии. При добавлении АДФ в низких дозах (1 мкМ) у обследованных пациентов с ЭТ и ИП, принимавших препараты АСК в качестве основного терапевтического средства, сохранялось характерное для больных Ph(-)МПН, не получающих лечение, снижение агрегационных параметров тромбоцитов относительно контрольных показателей. Между параметрами агрегации тромбоцитов пациентов обеих обследованных групп, получавших АСК, не обнаружено значимых различий под действием как АДФ в различных концентрациях, так и других индукторов. Результаты оценки агрегационной активности тромбоцитов в цельной крови больных ЭТ и ИП, получавших АСК, описанные в работе Panova-Noeva M. et al., лишь отчасти согласуются с нашими данными. Так, параметры агрегации под действием АДФ в приведённом исследовании значимо превышали контрольные значения, в то время как при добавлении коллагена не отмечалось различий с контрольной группой [23]. На основании этих результатов авторы делают вывод о недостаточности постоянного приёма АСК для полноценного ингибирования реактивности тромбоцитов у пациентов с Ph(-)МПН. Полученные нами повышенные значения скорости агрегации при добавлении АДФ (5 мкМ) у больных ЭТ и ИП, принимавших препараты АСК, соответствуют данным указанной работы. В то же время, у обследованных нами больных отмечалось значительное подавлении агрегации под действием коллагена, а также снижение МА агрегации при индукции АДФ (5 мкМ). Обнаруженные противоречия могут быть связаны с особенностями применяемых методов исследования

агрегационной функции тромбоцитов и состава обследованных больных. Действительно, при сопоставлении различных методов оценки функциональной активности тромбоцитов *in vitro* в работе Lussana F. et al. было выявлено существенное влияние аналитических условий на агрегационные характеристики кровяных пластинок у пациентов с ЭТ [75]. При проведении световой трансмиссионной агрегатометрии у больных ЭТ, получавших лечение аспирином, параметры агрегации под действием АДФ, коллагена, TRAP-14 (thrombin receptor activating peptide) и адреналина были ниже (при нормализации PRP по числу тромбоцитов) или близки (в нативной PRP) к показателям здоровых лиц, также принимавших аспирин. В то же время, при использовании импедансной агрегатометрии параметры агрегации в PRP и цельной крови у пациентов с ЭТ имели тенденцию к повышению относительно контрольной группы. Дизайн представленного исследования, а именно, приём АСК лицами контрольной группы, не позволяет сопоставить указанные результаты с данными настоящей работы.

Широко применяемой терапевтической стратегией при лечении больных Ph-негативными МПН является назначение циторедуктивных средств в сочетании с антиагрегантами, в том числе препаратами АСК. Анализ агрегационных параметров тромбоцитов обследованных нами пациентов с ЭТ и ИП, получавших подобную комбинированную терапию, обнаружил существенное снижение показателей агрегации при индукции коллагеном в обеих группах больных относительно нормы, а также уменьшение МА агрегации, вызванной АДФ (5 мкМ). Данные изменения отражают ингибирующее влияние АСК на агрегацию тромбоцитов и аналогичны результатам пациентов, принимавших препараты АСК без циторедуктивного лечения. При этом больные ИП, получавшие АСК и циторедуктивные препараты, отличались значимым повышением МА агрегации, индуцированной ристомицином, относительно контрольных величин, что указывает на рост функциональной активности тромбоцитов. Также у пациентов обеих нозологических групп на фоне подобной терапии, сходно с обследованными больными без терапии или принимавшими только АСК, отмечалось снижение агрегации тромбоцитов под действием АДФ в низких дозах (1мкМ), наиболее выраженное по показателям МА. В исследовании Panova-Noeva M. et al. у пациентов с ЭТ и ИП, получавших, кроме АСК, циторедуктивную терапию гидроксимочевиной, выявлено значимое снижение агрегации тромбоцитов, индуцированной коллагеном, относительно контрольных показателей [23]. Данное изменение согласуется с результатами нашей работы, однако указанная особенность у обследованных нами больных отмечалась при приёме как комбинированной терапии, так и отдельно препаратов АСК, отражая ингибирующее влияние АСК на агрегацию тромбоцитов, в то время как в приведённом исследовании она была обнаружена только у получавших циторедуктивную терапию с АСК.

Сравнение обследованных нами больных ЭТ и ИП, получавших комбинированную терапию АСК и циторедуктивными средствами, с группой пациентов тех же нозологий, принимавших только препараты АСК, не выявило значимых различий по параметрам агрегации тромбоцитов под действием всех использованных индуцирующих агентов. В то же время большинство агрегационных показателей у больных, находившихся на комбинированной терапии, имели выраженную тенденцию к увеличению, что свидетельствует о влиянии приёма циторедуктивных препаратов на повышение функциональной активности кровяных пластинок у пациентов с Ph(-)МПН. Однако подобный эффект может быть также обусловлен падением числа тромбоцитов на фоне циторедуктивной терапии, подтверждением чему служит значительно более низкое количество тромбоцитов крови у обследованных больных ЭТ и ИП, получавших циторедуктивные препараты, чем у принимавших только АСК. В определённой степени данный вывод соответствует результатам Tsantes A.E. et al., отмечавших нормализацию функциональной активности кровяных пластинок при анализе световой трансмиссионной агрегатометрии у пациентов с ЭТ на фоне различных видов циторедуктивной терапии. При этом нормализация функциональных тестов была ассоциирована со снижением числа тромбоцитов в результате лечения [64].

Для оценки влияния терапии на функциональную активность тромбоцитов у пациентов с ПМФ в настоящем исследовании проведён сравнительный анализ агрегационных характеристик тромбоцитов в зависимости от получаемого больными лечения. Для пациентов с ПМФ, принимавших антиагрегантные и/или циторедуктивные препараты, сходно с больными ЭТ и ИП на аналогичной терапии, было характерно выраженное падение параметров агрегации под действием коллагена, а также снижение МА агрегации, обусловленной АДФ (5 мкМ), в сравнении с контрольными значениями. У пациентов с ПМФ, терапия которых включала руксолитиниб, отмечено наибольшее число сниженных относительно нормы показателей агрегации тромбоцитов. Только в этой группе больных почти все исследованные агрегационные параметры, включая скорость агрегации при индукции АДФ (5 мкМ) и ристоцетином, не достигали контрольных величин. Указанные показатели были также существенно ниже аналогичных параметров больных, получавших только препараты АСК. Оба показателя агрегации под действием ристоцетина в группе пациентов, принимавших руксолитиниб, имели тенденцию к снижению относительно больных, получавших циторедуктивные препараты. Тем самым, по-видимому, приём руксолитиниба способствует ослаблению агрегационной активности тромбоцитов, проявляющемуся in vitro снижением агрегации под действием различных индукторов. Отмеченная особенность указывает на положительную роль терапии ингибиторами тирозинкиназ в тромбопрофилактике за счёт влияния на тромбоцитарное звено гемостаза. Данный вывод согласуется с наблюдениями

Keohane C. et al., обнаруживших при помощи проточной цитометрии у пациентов с миелофиброзом и ИП, получавших ингибиторы JAK, тенденцию к снижению количества тромбоцитарно-моноцитарных агрегатов, отражающих степень активационных изменений тромбоцитов in vivo, относительно исходного уровня [197]. Имеющиеся в доступных литературных источниках исследования агрегационной активности тромбоцитов у пациентов с ПМФ представлены лишь описанием клинических случаев [16,179].

Таким образом, оценка функциональных особенностей тромбоцитов пациентов с Ph-негативными МПН, проведённая в настоящем исследовании, выявила значимое снижение агрегационных параметров при использовании в качестве индуктора агрегации малых доз АДФ (1 мкМ), которое было характерно для больных всех обследованных нозологических групп независимо от наличия и вида терапии. Данная особенность может свидетельствовать о неполноценности рецепторного аппарата тромбоцитов у пациентов с Ph-негативными МПН. Больные отдельных нозологических групп, не получавшие терапию на момент обследования, характеризовались различным уровнем агрегационной активности тромбоцитов. Наиболее высокие показатели агрегации под действием практически всех индукторов (кроме АДФ, 1 мкМ) были отмечены в группе ЭТ. Для пациентов с ИП была характерна тенденция к росту параметров агрегации относительно нормальных значений. У больных ПМФ наблюдались разнонаправленные изменения: значимое по сравнению с контрольными показателями замедление агрегации, вызванной коллагеном, и тенденция к уменьшению показателей агрегации под действием АДФ (5 мкМ), отмечались наравне с некоторым усилением агрегации при индукции ристоцетином. Пациенты с ЭТ и ИП, получавшие препараты АСК в качестве основного терапевтического средства, демонстрировали значительное падение параметров агрегации, обусловленной коллагеном, относительно нормальных величин. Также относительно контрольных параметров были значимо снижены показатели МА под действием АДФ (5 мкМ), несмотря на сохраняющиеся высокие значения скорости агрегации, вызванной данным индуктором. У пациентов с ЭТ и ИП, получавших комбинированную терапию, отмечена тенденция к увеличению параметров агрегации по сравнению с больными, лечение которых включало только препараты АСК. Для пациентов с ПМФ, получавших терапию антиагрегантными и/или циторедуктивными препаратами, было характерно выраженное падение параметров агрегации под действием коллагена и снижение МА агрегации, обусловленной АДФ (5 мкМ). Таргетная терапия, направленная на ингибицию тирозинкиназ, приводила к значимому снижению всех агрегационных характеристик, включая агрегацию под действием ристоцетина, что свидетельствовало о падении функциональной активности тромбоцитов.

Анализ агрегационной активности кровяных пластинок при помощи индуцированной агрегатометрии является широко используемым диагностическим методом, наиболее часто применяемым для выявления тромбоцитарных нарушений или оценки эффективности антитромбоцитарной терапии. Однако возможности данной методики для определения гиперкоагуляционных изменений тромбоцитарного звена гемостаза, в частности, у пациентов с Ph-негативными МПН, по-видимому, несколько ограничены, в том числе методологическими особенностями при исследовании образцов с экстремальными значениями числа тромбоцитов и за счёт существенного влияния на показатели получаемой больными терапии.

Сосудистый эндотелий является неотъемлемым компонентом системы гемостаза, нарушение функциональности которого играет важную роль в развитии протромботических состояний. Различные факторы могут оказывать влияние на функцию эндотелия у пациентов с Ph-негативными МПН, нарушая физиологическое состояние эндотелия и превращая его в проадгезивную и прокоагулянтную поверхность. Реологические нарушения кровотока, взаимодействие с активированными тромбоцитами и лейкоцитами, воспалительные цитокины, активные формы кислорода и внутриклеточные протеазы, высвобождаемые нейтрофилами, способствуют активации эндотелия при Ph(-)МПН и могут индуцировать открепление или лизис эндотелиоцитов, нарушая целостность эндотелиального монослоя. В настоящем исследовании проведена оценка нарушений гемостатической функции эндотелия путем определения в плазме растворимых маркеров, образующихся в эндотелии и участвующих в гемостазе, и вазомоторной функции эндотелия неинвазивным методом периферической артериальной тонометрии.

Полученные результаты определения уровня растворимых маркеров активации и повреждения эндотелия, таких как фактор Виллебранда (фВ) и растворимый тромбомодулин (sTM) у больных Ph-негативными МПН анализировали с учётом принадлежности к различным нозологиям, наличия факторов тромботического риска, а именно мутации JAK2V617F и тромботического анамнеза, а также получаемой терапии. Уровень фВ у обследованных пациентов с Ph(-)МПН значительно превышал показатели контрольной группы. При этом увеличение данного параметра было ассоциировано с протромботическими изменениями плазменного звена гемостаза, такими как повышение концентрации фибриногена, активности фVIII и фВ, а также снижение активности PC и чувствительности к TM. Наличие указанных взаимосвязей свидетельствует о параллельном развитии активации эндотелия и гиперкоагуляционных изменений у больных Ph(-)МПН. При оценке отдельных нозологических групп уровень фВ был существенно выше контрольных величин у пациентов с ИП и ПМФ. У больных ЭТ обнаруживалась лишь некоторая тенденция к увеличению данного параметра.

Полученные результаты согласуются с данными Bellucci et al., свидетельствовавшими о незначительном, не достигавшем статистической значимости, повышении АгфВ у пациентов с ЭТ относительно контрольных показателей [156]. В исследовании Falanga et al. значимое увеличение содержания фВ в циркуляции при сравнении с показателями здоровых лиц наблюдалось в группе больных ЭТ и ИП [160], что соответствует нашим данным лишь в отношении пациентов с ИП. В то же время Arellano-Rodrigo E. et al. отмечали сходное изменение также в отдельной группе пациентов с ЭТ [158]. Противоречивость приведённых результатов может быть связана с особенностями состава обследованных в разных работах больных, в частности по наличию факторов тромботического риска или получаемой терапии.

Анализ влияния тромботического анамнеза на уровень фВ в плазме крови у обследованных больных Ph(-)МПН свидетельствует о более выраженном росте данного параметра у пациентов с предшествующими тромбозами. Наряду со значительным увеличением АгфВ в обеих группах относительно контрольных величин, у пациентов с тромбозами в анамнезе данный показатель существенно превышал значения больных, не имевших тромботических осложнений. При оценке особенностей отдельных нозологических групп содержание фВ у пациентов с ИП и ПМФ был значимо выше контрольных показателей вне зависимости от тромботического анамнеза. Увеличение данного маркера было наиболее выражено у больных с предшествующими тромбозами, однако различия с остальными пациентами соответствующих нозологий не достигали статистической значимости. В то же время у больных ЭТ с тромбозами в анамнезе отмечено значительное повышение АгфВ относительно как контрольной группы, так и остальных обследованных пациентов с данной нозологией. В работе Arellano-Rodrigo E. et al. наиболее выраженное увеличение уровня фВ выявлялось у больных ЭТ с предшествующими тромбозами относительно пациентов без тромботического анамнеза [158], что согласуется с нашими данными. В ранних опубликованных исследованиях также описано повышение АгфВ в ассоциации с тромбозами в анамнезе у больных хроническими МПН [84].

Кроме тромботического анамнеза, признанным фактором риска развития тромботических осложнений у пациентов с Ph-негативными МПН является наличие мутации JAK2 V617F. В общей группе обследованных больных уровень фВ был существенно выше нормы независимо от мутационного статуса JAK2 V617F. При рассмотрении отдельных нозологических групп оценка влияния мутации JAK2 V617F на показатели больных ИП была затруднена в связи с наличием её у большинства обследованных с этой нозологией. У пациентов с ПМФ, позитивных по мутации JAK2 V617F, АгфВ был существенно выше контрольных величин, но значимо не отличался от показателей JAK2 V617F-негативных пациентов. У больных ЭТ также не выявлено значимых различий по данному маркеру в

зависимости от наличия мутации JAK2 V617F. Тем не менее, по данным Arellano-Rodrigo E. et al. наиболее выраженное повышение плазменного уровня циркулирующего фВ выявлялось у JAK2 V617F-позитивных пациентов с ЭТ относительно носителей аллеля дикого типа [158].

При анализе влияния аллельной нагрузки JAK2 V617F на уровень фВ в общей группе обследованных пациентов и среди больных ЭТ и ПМФ не отмечено значимой взаимосвязи. В то же время, в группе пациентов с ИП обнаружена прямая корреляционная зависимость между указанными параметрами. В противоположность нашим данным, в исследовании Arellano-Rodrigo E. et al. плазменный уровень фВ пациентов с ЭТ коррелировал с аллельной нагрузкой JAK2 V617F [158]. Ассоциация АгфВ как маркера активации и повреждения эндотелия с величиной аллельной нагрузки JAK2 V617F может обуславливать её влияние на частоту развития тромбозов.

При оценке влияния получаемого пациентами лечения на уровень фВ среди больных ЭТ не было выявлено значимых различий с контрольной группой независимо от наличия и вида терапии. У пациентов с ИП повышение АгфВ относительно нормальных значений отмечалось во всех группах, но достигало статистической значимости только у принимавших циторедуктивные препараты. У больных ПМФ увеличение содержания фВ относительно контрольных показателей отмечалось у пациентов, получавших циторедуктивные препараты и/или руксолитиниб.

Тем самым, полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о том, что для пациентов с Ph(-)МПН характерно существенное повышение уровня фВ, наиболее выраженное при ИП и ПМФ, предполагая высокую степень активации и повреждения эндотелия и указывая на развитие ЭД. Повышение содержания фВ было наиболее выражено у пациентов, имевших тромботические осложнения в анамнезе, что проявлялось как в общей группе обследованных больных Ph(-)МПН, так и при рассмотрении отдельных нозологий. Значимого влияния мутационного статуса JAK2 V617F на показатели АгфВ не было обнаружено. Повышенное содержание фВ в циркуляции у пациентов с Ph(-)МПН, особенно при наличии тромботического анамнеза, может обусловливать акселерацию свертывания, приводящую к повышенному риску тромбообразования. Кроме того, наиболее выраженное увеличение уровня фВ у больных, получавших циторедуктивные и/или таргетные препараты, может указывать на повышение степени повреждения и активации эндотелия на фоне приёма данных медикаментозных средств.

В качестве биохимического маркера повреждения эндотелия в настоящем исследовании определяли также растворимый тромбомодулин (sTM) в плазме крови больных Ph-негативными МПН. Концентрация sTM обследованных пациентов значительно превышала показатели здоровых лиц. При этом рост данного параметра коррелировал с такими прокоагулянтными

характеристиками плазменного звена гемостаза, как повышение активности фVIII и фВ, снижение активности PC и уровня свободного PS, снижение чувствительности к TM. Кроме того, выявлена прямая корреляция между показателями концентрации sTM и АгфВ, что подтверждает выраженность эндотелиальных нарушений у обследованных пациентов. При анализе отдельных нозологий Ph-негативных МПН уровень sTM был существенно выше контрольных показателей во всех группах обследованных пациентов. Увеличение данного параметра было несколько более выражено у больных ИП и ПМФ, однако различия между группами не были значимы. Тем самым, повреждение эндотелия, по-видимому, свойственно пациентам всех нозологических групп Ph-негативных МПН. При этом у больных ЭТ отмечалась прямая корреляция уровня sTM с числом тромбоцитов крови, подтверждая связь повреждения эндотелия с миелопролиферативными особенностями. Согласуясь с полученными нами результатами, данные о повышении концентрации sTM в плазме пациентов с Ph(-)МПН представлены в ряде работ [83, 104, 131, 160]. Так, плазменный уровень sTM в группе пациентов с ИП и ЭТ значимо превышал показатели здоровых лиц по данным Musolino C. et al., а также в исследовании Falanga A. et al. [131, 160]. Существенный рост данного параметра в плазме пациентов с ПМФ относительно здоровых добровольцев отмечен в работе Alvarez-Larra´n A. et al. [104]. Значительное повышение концентрации TM описано у пациентов с МПН в сравнении с контрольной группой в работе Jensen M.K. et al. [83]. Однако отдельный анализ нозологических групп в исследовании Falanga A. et al. обнаружил существенное увеличение TM в сравнении с показателями здоровых лиц лишь у пациентов с ИП, в то время как незначительное повышение TM у пациентов с ЭТ не достигало уровня статистической значимости [160], согласуясь с ранними данными Bellucci S. et al. [156]. Arellano-Rodrigo E. et al. также не обнаружили значимых различий по содержанию sTM у пациентов с ЭТ и группой здоровых добровольцев [158]. В противоположность последним трем указанным работам, в соответствии с полученными нами результатами уровень sTM превышал показатели здоровых лиц во всех обследованных нозологических группах, в том числе, у больных ЭТ.

При оценке влияния на концентрацию sTM такого фактора тромботического риска, как наличие тромбозов в анамнезе, в общей группе обследованных пациентов с Ph(-)МПН существенное повышение данного параметра относительно нормы наблюдалось независимо от тромботического анамнеза. Однако у больных с предшествующими тромбозами была отмечена тенденция к более выраженному росту уровня sTM и, соответственно, более высокой степени повреждения эндотелия. Сходные закономерности были выявлены и в отдельных нозологических группах пациентов, а именно у больных ЭТ и ИП. В то же время, по данным Musolino C. et al. больные хроническими МПН, имевшие тромбозы в анамнезе,

характеризовались значимым повышением концентрации ТМ относительно пациентов без тромботических эпизодов [100].

Сравнительный анализ общей группы обследованных больных Ph(-)МПН не выявил существенных различий в зависимости от мутационного статуса JAK2 V617F, уровень sTM в обеих группах значительно превышал контрольные величины. Аналогичные результаты отмечались при оценке пациентов с ЭТ. Среди больных ИП все полученные значения концентрации sTM принадлежали пациентам, позитивным по мутации JAK2 V617, что не позволило провести сравнительную оценку. У больных ПМФ повышение уровня sTM было более выражено при наличии мутации JAK2 V617F, однако различия не достигали статистической значимости. В то же время в общей группе обследованных пациентов с Ph-негативными МПН обнаружена прямая корреляционная взаимосвязь между содержанием sTM и аллельной нагрузкой мутации JAK2 V617F. В исследовании Arellano-Rodrigo E. et al. повышение концентрации sTM у пациентов с ЭТ было ассоциировано с наличием мутации JAK2 V617F [158].

При оценке изменений уровня sTM под влиянием терапии у обследованных больных ЭТ показатели получавших только антиагреганты значимо превышали параметры пациентов, лечение которых включало циторедуктивные препараты. При этом содержание sTM было существенно выше нормы в обеих группах больных. У пациентов с ИП, получавших только антиагреганты, а также у больных ИП, лечение которых включало циторедуктивные препараты отдельно или в сочетании с антиагрегантами, концентрация sTM значительно превышала контрольные параметры и не зависела от вида терапии. Показатели уровня sTM в отдельных группах пациентов с ПМФ существенно превосходили величины здоровых лиц и значимо не отличались между собой. Согласуясь с полученными нами результатами, в исследовании Falanga A. et al. терапия гидроксимочевиной не влияла на содержание ТМ в группе пациентов с ЭТ и ИП [160].

Тем самым, во всех нозологических группах обследованных больных Ph-негативными МПН уровень sTM был значительно выше показателей здоровых лиц независимо от тромботического анамнеза, мутационного статуса JAK2 V617F, а также наличия и вида терапии. Влияние получаемого лечения на значения sTM было выявлено только у пациентов с ЭТ и проявлялось в более выраженном повышении его концентрации в группе, получавшей в качестве основного терапевтического средства антиагреганты, относительно больных, лечение которых включало циторедуктивные препараты. Повышение содержания sTM у пациентов с Ph(-)МПН предполагает длительное повреждение эндотелиальных клеток, которое может вносить существенный вклад в патогенез тромбоэмболических событий у этих больных.

Кроме определения растворимых в плазме биохимических маркеров, продуцируемых эндотелием при активации и повреждении, выявление ЭД возможно при помощи методов функциональной диагностики, которые позволяют оценить в основном реализацию вазомоторной функции эндотелия за счет изменения продукции NO и других вазоактивных веществ, в частности при помощи различных видов плетизмографии. В настоящем исследовании для характеристики состояния эндотелия применяли неинвазивный метод периферической артериальной тонометрии (peripheral arterial tonometry, PAT), позволяющий оценить вазомоторную функцию эндотелия микрососудистого русла путём регистрации изменений пульсового объема кончика пальца при развитии реактивной гиперемии. Функциональную активность эндотелия, а именно, способность эндотелия к NO-зависимой вазодилатации, при этом характеризует индекс реактивной гиперемии (reactive hyperemia index, RHI), значения которого ниже 1,67 свидетельствуют о развитии эндотелиальной дисфункции, параметры от 1,67 до 2,0 лежат в зоне риска и показатели, превышающие 2,0, соответствуют нормальному функционированию эндотелия. В соответствии с полученными значениями RHI эндотелиальная дисфункция была выявлена у 36,7% обследованных JAK2V617F-позитивных пациентов с Ph(-)МПН. При рассмотрении отдельных нозологических групп дисфункция эндотелия была наиболее характерна для больных ИП (47,1%) и в меньшей степени для пациентов с ЭТ (31,8%) и ПМФ (30,0%). Кроме того, существенная доля значений RHI обследованных больных соответствовала зоне риска. В этом диапазоне лежали значения RHI 26,5% общей группы пациентов с Ph(-)МПН, 31,8% больных ЭТ, 5,9% больных ИП и 50% больных ПМФ. Высокая встречаемость значений RHI≤1,67 свидетельствует о выраженной вазомоторной дисфункции эндотелия, в то время как результаты, лежащие в зоне риска, также предполагают определённое нарушение вазодилататорной функции эндотелия. Оценка эндотелиальной функции методом PAT при помощи пальцевых плетизмографических датчиков также была осуществлена в работе Vrtovec M. et al. у JAK2 V617F-позитивных пациентов с ЭТ в сравнении с практически здоровыми лицами. По показателям RHI при этом не наблюдалось значимых различий между больными ЭТ и контрольной группой, несмотря на некоторую тенденцию к ухудшению эндотелиальной реактивности у пациентов с ЭТ [43]. В настоящем исследовании сравнение полученных результатов RHI больных Ph(-)МПН с показателями контрольной группы не проводилось, в то время как между нозологическими группами пациентов значимых различий не было обнаружено. Однако параметры больных ЭТ и ИП были в большей степени сдвинуты в область низких значений RHI≤1,67, подтверждая большую выраженность вазомоторных нарушений. По результатам корреляционного анализа выявлена прямая зависимость между показателями RHI и уровнем свободного PS у обследованных пациентов с Ph(-)МПН. При оценке отдельных нозологических групп сходная корреляция

отмечалась среди больных ИП. В этой же группе пациентов RHI напрямую коррелировал с чувствительностью к ТМ. Отмеченные зависимости свидетельствовали о взаимосвязи эндотелиальной дисфункции, выявляемой при помощи метода РАТ, с нарушением системы протеина С у больных Ph-негативными МПН. На наличие связи вазомоторной функции эндотелия с работой естественных антикоагулянтных систем также указывала прямая корреляция RHI с активностью АТ у пациентов с ИП. Взаимосвязь вазодилататорной функции эндотелия с уровнем исследованных растворимых маркеров ЭД обнаружена среди больных ЭТ и заключалась в обратной зависимости между показателями RHI и концентрацией sTM.

Таким образом, проведённая в настоящем исследовании оценка состояния эндотелия, включавшая определение растворимых маркеров, а также неинвазивный метод РАТ, свидетельствовала о развитии выраженной эндотелиальной дисфункции у пациентов с Ph-негативными МПН. Определение уровня фВ и концентрации sTM обнаружило их значительное повышение у пациентов с Ph(-)МПН. Увеличение АгфВ было в большей степени характерно для больных ИП и ПМФ, в то время как повышение уровня sTM наблюдалось во всех нозологических группах. Рост АгфВ был значимо более выражен при наличии тромбозов в анамнезе обследованных пациентов, тогда как концентрация sTM имела лишь тенденцию к повышению у больных с предшествующими тромботическими осложнениями. Мутационный статус JAK2V617F значимо не влиял на содержание обоих маркеров. В то же время была выявлена прямая корреляция аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F с уровнем фВ у пациентов с ИП и с концентрацией sTM в общей группе обследованных больных Ph(-)МПН. У пациентов с ИП и ПМФ, получавших циторедуктивные и/или таргетные препараты, отмечался наиболее выраженный рост АгфВ, в то время как в этих же нозологических группах терапия не оказывала существенного влияния на концентрацию sTM. Более того, у больных ЭТ, получавших антиагрегантную терапию, обнаруживалось значимое увеличение последнего параметра относительно пациентов, принимавших циторедуктивные препараты. Выраженная корреляционная зависимость содержания фВ и sTM с прокоагулянтными изменениями показателей плазменного звена гемостаза свидетельствует об ассоциации эндотелиальных нарушений с развитием гиперкоагуляции у пациентов с Ph-негативными МПН. Взаимосвязь обоих исследованных эндотелиальных маркеров со снижением эффективности работы естественных антикоагулянтов системы протеина С указывает на определяющую роль эндотелиальной дисфункции в развитии протромботического состояния у пациентов с Ph(-)МПН. Применение неинвазивного метода РАТ способствовало выявлению вазомоторной дисфункции эндотелия у 37% обследованных больных Ph-негативными МПН, наибольшая доля лиц с ЭД отмечалась среди пациентов с ИП. В этой же группе больных обнаружена

корреляционная зависимость между нарушением вазодилататорной функции эндотелия и снижением уровня и эффективности работы естественных антикоагулянтов системы протеина С, подчёркивая взаимосвязь ЭД и гиперкоагуляционных изменений плазменного звена гемостаза. Тем самым, нарушение как гемостатической, так и вазомоторной функций эндотелия ассоциировано со снижением эффективности системы естественных антикоагулянтов и развитием протромботических состояний. Использование различных методов выявления эндотелиальных нарушений позволяет более полно характеризовать состояние эндотелия и способствует многосторонней оценке эндотелиальной дисфункции.

ВЫВОДЫ

1. Состояние плазменного звена гемостаза у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями характеризуется наличием протромботических изменений, таких как повышение концентрации фибриногена и активности фактора VIII, и снижением эффективности естественных антикоагулянтов системы протеина С, приводящих к нарушению гемостатического баланса, наиболее выраженного при первичном миелофиброзе по сравнению с больными истинной полицитемией и эссенциальной тромбоцитемией.
2. Особенностью тромбоцитарного звена гемостаза у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией и истинной полицитемией, не получающих лечения, является высокая функциональная активность тромбоцитов, что подтверждается ростом параметров агрегации под действием таких индукторов, как коллаген и ристоцетин.
3. Для пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями характерна дисфункция эндотелия, которая проявляется нарушением гемостатической и вазомоторной функций, о чём свидетельствует увеличение содержания фактора Виллебранда (Me, Q1-Q3: 129,50, 103,20–149,50), растворимого тромбомодулина (Me, Q1-Q3: 2,98, 2,36-3,64) относительно значений здоровых лиц (Me, Q1-Q3: 107,00, 91,00-134,50 и 1,59, 1,45-1,82 соответственно), а также снижение индекса реактивной гиперемии ниже 1,67.
4. Дисфункция эндотелия ассоциируется с гиперкоагуляционными изменениями плазменного звена гемостаза, что указывает на прямую вовлечённость нарушений функциональной активности эндотелия в развитие протромботического состояния.
5. У пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями, имеющих тромбозы в анамнезе, усугубляются признаки эндотелиальной дисфункции и прокоагулянтные изменения плазменного звена гемостаза.
6. Наличие мутации JAK2 V617F у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями сопровождается уменьшением активности антитромбина относительно носителей аллеля дикого типа. Повышение аллельной нагрузки данной мутации коррелирует с падением активности и уровня антикоагулянтов системы протеина С (R=-0,390 и R=-0,400 для протеинов С и S соответственно), а также со снижением количественных показателей генерации тромбина (R=-0,504 и R=-0,353 для значений эндогенного потенциала и пиковой концентрации тромбина соответственно).
7. Степень выраженности протромботических изменений у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями характеризуется уровнем маркеров эндотелиальной дисфункции и величиной индекса коагуляции, который в группе здоровых лиц составляет 1,91, 1,57–2,17 (Me, Q1-Q3), у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией,

истинной полицитемией и первичным миелофиброзом (Me, Q1-Q3) 2,25, 1,61-4,76; 2,62, 1,92-3,94 и 2,90, 1,71-7,28 соответственно.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для выявления протромботической направленности плазменного звена гемостаза у больных Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями рекомендуется применять индекс коагуляции, рассчитываемый по параметрам теста генерации тромбина.

2. Для оценки степени выраженности эндотелиальной дисфункции у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями целесообразно определение уровня фактора Виллебранда в плазме крови.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфорная кислота

АгфВ - уровень фактора Виллебранда

АПТВ - активированное парциальное тромбопластиновое время

АСК - ацетилсалициловая кислота

АТ – антитромбин

АФК - активные формы кислорода

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ИП - истинная полицитемия

кДНК – кодирующая дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

МА - максимальная амплитуда агрегации

Ме – медиана

МПН - миелопролиферативные новообразования

ССЗ - сердечно-сосудистые заболевания

ПМФ - первичный миелофиброз

ПТ - протромбиновый тест по Квику

ТАТ-комплекс - тромбин-антитромбиновый комплекс

ТГТ - тест генерации тромбина

ТМ – тромбомодулин

ТПО – тромбопоэтин

ТФ - тканевой фактор

фВ - фактор Виллебранда

фII – коагуляционный фактор II (протромбин)

фV – коагуляционный фактор V

фVIII – коагуляционный фактор VIII

фVIIIa - активированный фактор VIII

ЭД – эндотелиальная дисфункция

ЭТ - эссенциальная тромбоцитемия

20-HETE - 20-гидроксиэйкозотетраеновая кислота

ADM – адреномедуллин

APC - активированный протеин С

CALR – кальретикулин

CD11b – кластер дифференцировки 11b

CD40-L - лиганд кластера дифференцировки CD40

CD63 – кластер дифференцировки 63 (лизосомально-ассоциированный мембранный белок)

CI - индекс коагуляции (coagulation index)

ECLAP - European Collaboration on Low-dose Aspirin

EDHF - эндотелиальный гиперполяризующий фактор

ET-1 – эндотелин I

ETP - эндогенный тромбиновый потенциал (Endogenous Thrombin Potential)

FMD - поток-зависимая вазодилатация (flow-mediated dilatation)

F1+2 - фрагменты протромбина 1+2

ICAM-1 - молекула межклеточной адгезии-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule-1)

IPSET-thrombosis - Международная Прогностическая Шкала риска развития тромбозов ВОЗ 2012 при ЭТ

JH1-7 - Janus homology domains 1-7

MAC-1 - macrophage 1 antigen

NETs - нейтрофильные внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular traps)

NO - оксид азота

PAC-1 - активированный комплекс GPIIb / IIIa

PAT - периферическая артериальная тонометрия (peripheral arterial tonometry)

PC - протеин С

Peak thrombin – пиковая концентрация тромбина

PDGF - тромбоцитарный фактор роста (platelet derived growth factor)

Ph(-)МПН - Philadelphia-негативные миелопролиферативные новообразования

PPP - бедная тромбоцитами плазма (platelet-poor plasma)

PRP - богатая тромбоцитами плазма (platelet-rich plasma)

PS - протеин S

PSGL-1 - P-selectin glycoprotein ligand-1

Q1-Q3 - интерквартильный интервал

RHI - индекс реактивной гиперемии (reactive hyperemia index)

sCD40L - растворимый фрагмент мембранного CD40L

sE-селектин - растворимый Е-селектин

sP-селектин - растворимый Р-селектин

STAT - signal transducer and activator of transcription

sTM - растворимый тромбомодулин

STM_{ETP} - чувствительность к тромбомодулину по проценту падения показателей ETP при добавлении тромбомодулина

$STM_{Peak\ thrombin}$ - чувствительность к тромбомодулину по проценту падения показателей Peak thrombin при добавлении тромбомодулина

TPFI - ингибитор пути тканевого фактора (tissue factor pathway inhibitor),

TRAP - thrombin receptor activating peptide

TxA2 - тромбоксан А2

V - начальная скорость агрегации

VCAM-1 - молекула адгезии сосудистых клеток-1 (Vascular cell adhesion molecule-1)

VWF:RCO - ристоцетин-кофакторная активность фактора Виллебранда

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулкадыров, К.М. Клиническая гематология: справочник / К.М. Абдулкадыров. - СПб: Питер, 2006. – 447 с.

2. Абдулкадыров, К.М. Миелопролиферативные новообразования / К.М. Абдулкадыров, В.А. Шуваев, И.С. Мартынкевич. – М., 2016. – 304 с.

3. Абдулкадыров, К.М. Первичный миелофиброз: собственный опыт и новое в диагностике и лечении / К.М. Абдулкадыров, В.А. Шуваев, И.С. Мартынкевич // Онкогематология. – 2015. – Т. 10, №2. – С. 25-35.

4. Абдулкадыров, К.М. Современные подходы к диагностике и лечению эссенциальной тромбоцитемии: обзор литературы и собственные данные / К.М. Абдулкадыров, В.А. Шуваев, И.С. Мартынкевич // Клиническая онкогематология. – 2015. – Т. 8, №3. – С. 235-247.

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

6. Абдулкадыров, К.М. Эссенциальная тромбоцитемия: современные представления о диагностике и лечении: методические рекомендации / К.М. Абдулкадыров, В.А. Шуваев. - СПб., 2014. - 49 с.

7. Методы диагностики эндотелиальной дисфункции / А.Н. Иванов, А.А. Гречихин, И.А. Норкин, Д.М. Пучиньян // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2014. – Т. 13, №4. – С. 4-11.

8. Петрищев, Н. Н. Дисфункция эндотелия - ключевой фактор нарушений микроциркуляции / Н.Н. Петрищев, Т.Д. Власов, М.В. Дубина // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 1999. - №2. - С. 41-42.

9. Петрищев, Н. Н. Функциональное состояние эндотелия при ишемии-реперфузии (обзор литературы) / Н.Н. Петрищев, Т.Д. Власов // Российский Физиологический Журнал им. И.М. Сеченова. – 2000. – Т. 86, №2. – С. 148-163.

10. Рукавицын, О.А. Гематология: национальное руководство / под ред. О.А. Рукавицына. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. – 784 с.

11. Типовые формы дисфункции эндотелия / Н.Н. Петрищев, Л.В. Васина, Т.Д. Власов и др. // Клинико-лабораторный консилиум. - 2007. - №18. - С. 31-35.

12. Шитикова, А.С. Тромбоцитарный гемостаз / А.С. Шитикова. – СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2000. – 227 с.

13. Шитикова, А.С. Тромбоцитопатии, врожденные и приобретенные / под ред. Л.П. Папаян, О.Г. Головиной. – СПб.: ИИЦ ВМА, 2008. – 320 с.

14. Abnormalities of platelet aggregation in chronic myeloproliferative disorders / S. Avram, A. Lupu, S. Angelescu et al. // J. Cell. Mol. Med. – 2001. – Vol. 5. – P. 79–87.

15. Acquired APC resistance and oral contraceptives: differences between two functional tests / J. Curvers, M.C. Thomassen, G.A. Nicolaes et al. // Br. J. Haematol. – 1999. – Vol. 105. – P. 88-94.

16. Acquired Gray Platelet Syndrome Associated with Primary Myelofibrosis / K. Ido, T. Nakane, N. Tanizawa et al. // Intern. Med. – 2020. – Vol. 59, №21. – P. 2751-2756.

17. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders / E.J. Baxter, L.M. Scott, P.J. Campbell et al. // Lancet. - 2005. – Vol. 365. – P. 1054–1061.

18. Acquired resistance to activated protein C (aAPCR) in multiple myeloma is a transitory abnormality associated with an increased risk of venous thromboembolism / F. Elice, L. Fink, G. Tricot et al. // Br. J. Haematol. – 2006. – Vol. 134. – P. 399-405.

19. Acquired resistance to activated protein C in breast cancer patients / M.R. Nijziel, R. van Oerle, M. Christella et al. // Br. J. Haematol. – 2003. – Vol. 120. – P. 117-122.

20. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes / A.S. Weyrich, M.R. Elstad, R.P. McEver et al. // J. Clin. Invest. – 1996. – Vol. 97. – P. 1525-1534.

21. Activated protein C resistance in the absence of factor V Leiden mutation is a common finding in multiple myeloma and is associated with an increased risk of thrombotic complications / M. Zangari, F. Saghafifar, E. Anaissie et al. // Blood Coagul. Fibrinolysis. – 2002. – Vol. 13. – P. 187-192.

22. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis / R.L. Levine, M. Wadleigh, J. Cools et al. // Cancer Cell. - 2005. – Vol. 7. – P. 387–397.

23. ADP-induced platelet aggregation and thrombin generation are increased in Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera / M. Panova-Noeva, M. Marchetti, L. Russo et al. // Thromb. Res. – 2013. – Vol. 132. - №1. – P. 88–93.

24. Adrenomedullin in liver transplantation and its relationship with vascular complications / E. Fabrega, J. Crespo, F. Casafont et al. // Liver Transpl. Surg. – 1999. – Vol. 5. – P. 485–490.

25. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders / R. Kralovics, F. Passamonti, A.S. Buser et al. // N. Engl. J. Med. – 2005. – Vol. 352, №17. – P. 1779-1790.

26. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of JAK2 / R. Kralovics, S.-S. Teo, A.S. Buser et al. // Blood. – 2005. –Vol. 106, №10. – P. 3374-3376.

27. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation / P. Guglielmelli, A. Pancrazzi, G. Bergamaschi et al. // Br. J. Haematol. - 2007. – Vol. 137. – P. 244–247.

28. Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial / H. Gisslinger, M. Gotic, J. Holowiecki et al. // Blood. – 2013. – Vol. 121, №10. – P. 1720-1728.

29. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor / J. Staerk, C. Lacout, T. Sato et al. // Blood. - 2006. – Vol. 107. - P. 1864–1871.

30. A novel mutation in MPL(Y252H) results in increased thrombopoietin sensitivity in essential thrombocythemia / M.P. Lambert, J. Jiang, V. Batra et al. // Am. J. Hematol. - 2012. – Vol. 87. – P. 532–534.

31. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients / J.H. Griffin, B. Evatt, C. Wideman, J.A. Fernandez // Blood. – 1993. – Vol. 82. – P. 1989-1993.

32. Approaches for non-invasive assessment of endothelial function: focus on peripheral arterial tonometry / J.J. Kandhai-Ragunath, H.T. Jørstad, F.H.A.F. de Man et al. // Neth. Heart J. – 2013. – Vol. 21. – P. 214-218.

33. Assessment of Endothelial Dysfunction with Flow-Mediated Dilatation in Myeloproliferative Disorders / A. Yildiz, M. Güryildirim, M.S. Pepeler et al. // Clin. Appl. Thromb. Hemost. - 2018. - Vol. 24, №7. - P. 1102-1108.

34. Assessment of peripheral vascular endothelial function in the ambulatory setting / J.T. Kuvin, A. Mammen, P. Mooney et al. // Vasc. Med. – 2007. – Vol. 12. – P. 13–16.

35. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude / J.T. Kuvin, A.R. Patel, K.A. Sliney et al. // Am. Heart J. – 2003. – Vol. 146. – P. 168-174.

36. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera / C. James, V. Ugo, J.-P. Le Couedic et al. // Nature. – 2005. – Vol. 434. – P. 1144–1148.

37. Axtell, A.L. Assessing endothelial vasodilator function with the Endo-PAT 2000 / A.L. Axtell, F.A. Gomari, J.P. Cooke // J. Vis. Exp. – 2010. - №44. – e2167.

38. Barbui, T. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis / T. Barbui, G. Finazzi, A. Falanga // Blood. – 2013. – Vol. 122, №13. – P. 2176–2184.

39. Bleeding, thrombosis, and anticoagulation in myeloproliferative neoplasms (MPN): analysis from the German SAL-MPN-registry / A. Kaifie, M. Kirschner, D. Wolf et al. // J. Hematol. Oncol. – 2016. – Vol. 9. – P. 18.

40. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma / H.C. Hemker, P. Giesen, R.A. Dieri et al. // Pathophysiol. Haemost. Thromb. – 2003. – Vol. 33, №1. - P. 4-15.

41. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum / M. Michalak, J. Groenendyk, E. Szabo et al. // Biochem. J. - 2009. – Vol. 417. – P. 651–666.

42. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons / A. Tefferi, T.L. Lasho, C.M. Finke et al. // Leukemia. - 2014. – Vol. 28. – P. 1472–1477.

43. Carotid artery stiffness, digital endothelial function, and coronary calcium in patients with essential thrombocytosis, free of overt atherosclerotic disease / M. Vrtovec, A. Anzic, I.P. Zupan et al. // Radiol. Oncol. – 2017. – Vol. 51, №2. – P. 203-210.

44. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia / A.M. Vannucchi, E. Antonioli, P. Guglielmelli et al. // Blood. - 2008. – Vol. 112. – P. 844–847.

45. Characterization of 35 new cases with four different MPLW515 mutations and essential thrombocytosis or primary myelofibrosis / S. Schnittger, U. Bacher, C. Haferlach et al. // Haematologica. - 2009. – Vol. 94. – P. 141–144.

46. Circulating endothelial cells and endothelial activation in essential thrombocythemia: results from $CD146^+$ immunomagnetic enrichment — flow cytometry and soluble E-selectin detection / A. Belotti, E. Elli, T. Speranza et al. // Am. J. Hematol. – 2012. – Vol. 87, №3. – P. 319-320.

47. Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia / J. Kittur, R.A. Knudson, T.L. Lasho et al. // Cancer. - 2007. – Vol. 109. – P. 2279–2284.

48. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia / A.M. Vannucchi, E. Antonioli, P. Guglielmelli et al. // Blood. – 2007. – Vol. 110. – P. 840-846.

49. Clinical significance of acquired activated protein C resistance in patients with systemic lupus erythematosus / F.J. Munoz-Rodrıguez, J.C. Reverter, J. Font et al. // Lupus. – 2002. – Vol. 11. – P. 730-735.

50. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations / T. Anderson, A. Uehata, M.D. Gerhard et al. // J. Am. Coll. Cardiol. – 1995. – Vol. 26, №5. – P. 1235-1241.

51. Conlan, M.G. Low protein S in essential thrombocythaemia with thrombosis / M.G. Conlan, W.D. Haire // Am. J. Hematol. – 1989. – Vol. 32. – P. 88-93.

52. Correlation of blood counts with vascular complications in essential thrombocythemia: analysis of the prospective PT1 cohort / P.J. Campbell, C. MacLean, P.A. Beer et al. // Blood. – 2012. – Vol. 120. – P. 1409–1411.

53. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study / N.M. Hamburg, M.J. Keyes, M.G. Larson et al. // Circulation. – 2008. – Vol. 117. – P. 2467-2474.

54. Cytokine production in myelofibrosis exhibits differential responsiveness to JAK-STAT, MAP kinase, and NFkB signaling / D.A.C. Fisher, C.A. Miner, E.K. Engle et al. // Leukemia. - 2019. – Vol. 33. – P. 1978-1995.

55. Danese, S. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation / S. Danese, E. Dejana, C. Fiocchi // J. Immunol. - 2007. - Vol. 178, №10. - P. 6017–6022.

56. Deanfield, J.E. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance / J.E. Deanfield, J.P. Halcox, T.J. Rabelink // Circulation. - 2007. - Vol. 115, №10. - P. 1285–1295.

57. Decreased free protein S levels in polycythemia vera / M. Loppi, M. Furlan, G.B.D. Re et al. // Thromb. Haemost. – 1990. – Vol. 64. – P. 177-178.

58. Deficiency of natural anticoagulant proteins C, S and antithrombin in portal vein thrombosis: a secondary phenomenon? / N.C. Fisher, J.T. Wilde, J. Roper, E. Elias // Gut. – 2000. – Vol. 46. – P. 534-539.

59. Defining the thrombotic risk in patients with myeloproliferative neoplasms / F. Vianello, A. Battisti, G. Cella et al. // ScientificWorldJournal. – 2011. – Vol. 11. – P. 1131–1137.

60. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study / P.J. Campbell, L.M. Scott, G. Buck et al. // Lancet. - 2005. – Vol. 366. – P. 1945–1953.

61. Determinants of the APTT- and ETP-based APC sensitivity tests / M.C.H. de Visser, A. van H. Vlieg, G. Tans et al. // J. Thromb. Haemost. – 2005. – Vol. 3. - P. 1488-1494.

62. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis) / T. Barbui, G. Finazzi, A. Carobbio et al. // Blood. - 2012. – Vol. 120. – P. 5128–5133.

63. Devendra, K.C. The underappreciated risk of thrombosis and bleeding in patients with myelofibrosis: a review / K.C. Devendra, L. Falchi, S. Verstovsek // Ann. Hematol. – 2017. – Vol. 96, №10. – P. 1595–1604.

64. Direct evidence for normalization of platelet function resulting from platelet count reduction in essential thrombocythemia / A.E. Tsantes, G.K. Nikolopoulos, P. Tsirigotis et al. // Blood Coagul. Fibrinolysis. – 2011. – Vol. 22, №6. – P. 457–462.

65. Dittman, W.A. Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant / W.A. Dittman, P.W. Majerus // Blood. – 1990. – Vol. 75. – P. 329-336.

66. Dysfunction of the PI3 kinase/Rap1/integrin a(IIb)b(3) pathway underlies ex vivo platelet hypoactivity in essential thrombocythemia / S.F. Moore, R.W. Hunter, M.T. Harper et al. // Blood. – 2013. – Vol. 121. – P. 1209-1219.

67. Effect of oral contraceptives on the anticoagulant activity of protein S in plasma / R.R. Koenen, M. Christella, L.G.D. Thomassen et al. // Thromb. Haemost. – 2005. – Vol. 93. – P. 853-859.

68. Effect of oral contraceptives on thrombin generation measured via calibrated automated thrombography / S.N. Tchaikovski, H.A.A.M. van Vliet, M.C.L.G.D. Thomassen et al. // Thromb. Haemost. – 2007. – Vol. 98. – P. 1350-1356.

69. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera / R. Landolfi, R. Marchioli, J. Kutti et al. // N. Engl. J. Med. – 2004. – Vol. 350, №2. – P. 114–124.

70. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia / M.C. Trappenburg, M. van Schilfgaarde, M. Marchetti et al. // Haematologica. – 2009. – Vol. 94. – P. 911-918.

71. Elliott, M.A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia / M.A. Elliott, A. Tefferi // Br. J. Haematol. – 2005. – Vol. 128, №3. – P. 275-290.

72. Endothelial dysfunction in patients with polycythaemia vera / T. Neunteufl, S. Heher, T. Stefenelli et al. // Br. J. Haematol. – 2001. – Vol. 115, №2.– P. 354-359.

73. Erythromelalgia in essential thrombocythemia is characterized by platelet activation and endothelial cell damage but not by thrombin generation / P.J. van Genderen, I.S. Lucas, R. van Strik et al. // Thromb. Haemost. – 1996. – Vol. 76. – P. 333-338.

74. 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, №2. - P. 159-166.

75. Evaluation of platelet function in essential thrombocythemia under different analytical conditions / F. Lussana, E.A. Femia, M. Pugliano et al. // Platelets. – 2020. – Vol. 31, №2. – P. 179–186.

76. Experience with pegylated interferon a-2a in advanced myeloproliferative neoplasms in an international cohort of 118 patients / K. Gowin, P. Thapaliya, J. Samuelson et al. //Haematologica. – 2012. – Vol. 97. – P. 1570–1573.

77. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model / G. Wernig, T. Mercher, R. Okabe et al. // Blood. - 2006. – Vol. 107. – P. 4274–4281.

78. Factor V Leiden mutation carriership and venous thromboembolism in polycythemia vera and essential thrombocythemia / M. Ruggeri, H. Gisslinger, A. Tosetto et al. // Am. J. Hematol. – 2002. – Vol. 71. – P. 1-6.

79. Factors predisposing to acquired von Willebrand syndrome during the course of polycythemia vera – retrospective analysis of 142 consecutive cases / A. Mital, W. Prejzner, R. Swiatkowska-Stodulska, A. Hellmann // Thromb. Res. – 2015. – Vol. 136, №4. – P. 754–757.

80. Factors related to the development of acquired von Willebrand syndrome in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera / A. Rottenstreich, G. Kleinstern, S. Krichevsky et al. // Eur. J. Intern. Med. - 2017. - Vol. 41. – P. 49-54.

81. Falanga, A. Thrombotic disease in the myeloproliferative neoplasms / A. Falanga, M. Marchetti // Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program. – 2012. – Vol. 2012. – P. 571-581.

82. Frequency and risk factors for thrombosis in idiopathic myelofibrosis: analysis in a series of 155 patients from a single institution / F. Cervantes, A. Alvarez-Larran, E. Arellano-Rodrigo et al. // Leukemia. – 2006. – Vol. 20, №1. – P. 55–60.

83. Frequent occurrence of anticardiolipin antibodies, Factor V Leiden mutation, and perturbed endothelial function in chronic myeloproliferative disorders / M.K. Jensen, P.N. Brown, S. Thorsen, H.C. Hasselbalch // Am. J. Hematol. – 2002. – Vol. 69, №3. – P. 185-191.

84. Friedenberg, W.R. Relationship of thrombohemorrhagic complications to endothelial cell function in patients with chronic myeloproliferative disorders / W.R. Friedenberg, R.C. Roberts, D.E. David // Am. J. Hematol. – 1992. – Vol. 40. – P. 283-289.

85. Furie, B. Mechanisms of thrombus formation / B. Furie, B.C. Furie // N. Engl. J. Med. – 2008. – Vol. 359. – P. 938–949.

86. Gangat, N. Abdominal vein thrombosis in essential thrombocythemia: prevalence, clinical correlates and prognostic implications / N. Gangat, A.P. Wolanskyj, A. Tefferi // Eur J Haematol. – 2006. – Vol. 77. – P. 327–333.

87. Ghoreschi, K. Janus kinases in immune cell signaling / K. Ghoreschi, A. Laurence, J.J. O'Shea // Immunol Rev. - 2009. – Vol. 228. – P. 273–287.

88. Global coagulation in myeloproliferative neoplasms / A. Tripodi, V. Chantarangkul, F. Gianniello et al. // Ann. Hematol. – 2013. – Vol. 92. – P. 1633–1639.

89. Golebiewska, E.M. Platelet secretion: from haemostasis to wound healing and beyond / E.M. Golebiewska, A.W. Poole // Blood Rev. – 2015. – Vol. 29, №3. – P. 153-162.

90. Griesshammer, M. Thromboembolic events in polycythemia vera / M. Griesshammer, J.J. Kiladjian, C. Besses // Ann. Hematol. – 2019. – Vol. 98, №5. – P. 1071-1082.

91. Gros, A. Platelets in inflammation: regulation of leukocyte activities and vascular repair / A. Gros, V. Ollivier, B. Ho-Tin-Noe // Front. Immunol. – 2015. – Vol. 5. – P. 678.

92. Haemostatic Profile in Patients of Myeloproliferative Neoplasms - A Tertiary Care Centre Experience / Y. Parashar, R. Kushwaha, A. Kumar et al. // J. Clin. Diagn. Res. – 2016. – Vol. 10, №11. - EC01-EC04.

93. Healy, B. Endothelial cell dysfunction: an emerging endocrinopathy linked to coronary disease / B. Healy // J. Am. Coll. Cardiol. – 1990. – Vol. 16. – P. 357-358.

94. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia / C.N. Harrison, P.J. Campbell, G. Buck et al. // N. Engl. J. Med. - 2005. – Vol. 353, №1. – P. 33–45.

95. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis / S. Cortelazzo, G. Finazzi, M. Ruggeri et al. // N. Engl. J. Med. – 1995. – Vol. 332. – P. 1132–1136.

96. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia / G. Rotunno, C. Mannarelli, P. Guglielmelli et al. // Blood. - 2014. – Vol. 123. – P. 1552–1555.

97. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study / I.A. Naess, S.C. Christiansen, P. Romundstad et al. // J. Thromb. Haemost. – 2007. – Vol. 5, №4. – P. 692–699.

98. Increased acquired activated protein C resistance in unselected patients with hematological malignances / H.F.S. Negaard, P.O. Iversen, B. Ostenstad et al. // J. Thromb. Haemost. – 2008. – Vol. 6. – P. 1482-1487.

99. Increased circulating procoagulant activity and thrombin generation in patients with myeloproliferative neoplasms / J. Duchemin, V. Ugo, J.-C. Ianotto et al. // Thromb. Res. – 2010. – Vol. 126. – P. 238–242.

100. Increased levels of the soluble adhesion molecule E-selectin in patients with chronic myeloproliferative disorders and thromboembolic complications / C. Musolino, A. Alonci, A. Allegra et al. // Am. J. Hematol. – 1998. – Vol. 57. – P. 109-112.

101. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms / O. Wolach, R.S. Sellar, K. Martinod et al. // Sci. Transl. Med. – 2018. – Vol. 10, №436. - eaan8292.

102. Increased platelet activation and abnormal membrane glycoprotein content and redistribution in myeloproliferative disorders / M.K. Jensen, P.D.N. Brown, B.V. Lund et al. // Br. J. Haematol. – 2000. – Vol. 110. – P. 116-124.

103. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status / E. Arellano-Rodrigo, A. Alvarez-Larrán, J.C. Reverter et al. // Haematologica. – 2006. – Vol. 91. – P. 169–175.

104. Increased platelet, leukocyte, and coagulation activation in primary myelofibrosis / A. Alvarez-Larra´n, E. Arellano-Rodrigo, J.C. Reverter et al. // Ann Hematol. – 2008. – Vol. 87, №4. – P. 269-276.

105. Increased reactive oxygen species production and p47phox phosphorylation in neutrophils from myeloproliferative disorders patients with JAK2 (V617F) mutation / M. Hurtado-Nedelec, M.-J. Csillag-Grange, T. Boussetta et al. // Haematologica. – 2013. – Vol. 98, №10. – P. 1517–1524.

106. Interferon-induced nuclear signaling by Jak protein tyrosine kinases / O. Silvennoinen, J.N. Ihle, J. Schlessinger, D.E. Levy // Nature. - 1993. - Vol. 366, №6455. - P. 583-585.

107. In vitro platelet aggregation defects in patients with myeloproliferative disorders and high platelet counts: are they laboratory artefacts? / C. Grignani, P. Noris, C. Tinelli et al. // Platelets. – 2009. – Vol. 20, №2. – P. 131-134.

108. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis / L.M. Scott, W. Tong, R.L. Levine et al. // N. Engl. J. Med. - 2007. – Vol. 356. – P. 459–468.

109. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis / L. Martinez-Aviles, C. Besses, A. Alvarez-Larran et al. // Haematologica. - 2007. – Vol. 92. – P. 1717–1718.

110. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis / C. Lacout, D.F. Pisani, M. Tulliez et al. // Blood. - 2006. – Vol. 108. – P. 1652–1660.

111. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis / G. Barosi, G. Bergamaschi, M. Marchetti et al. // Blood. - 2007. – Vol. 110. – P. 4030–4036.

112. JAK2V617F mutation and hydroxyurea treatment as determinants of immature platelet parameters in essential thrombocythemia and polycythemia vera patients / M. Panova-Noeva, M. Marchetti, S. Buoro et al. // Blood. – 2011. – Vol. 118. – P. 2599–2601.

113. Kharbanda, R.K. Functions of the healthy endothelium / R.K. Kharbanda, J.E. Deanfield // Coron. Artery Dis. - 2001. - Vol. 12, №6. - P. 485-491.

114. Landolfi, R. European collaboration on low-dose aspirin in polycythemia vera (ECLAP): A randomized trial / R. Landolfi, R. Marchioli // Semin. Thromb. Hemost. – 1997. – Vol. 23, №5. – P. 473–478.

115. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain / T. Neunteufl, S. Heher, R. Katzenschlager et al. // Am. J. Cardiol. – 2000. – Vol. 86. – P. 207-210.

116. Lavi, N. Calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms / N. Lavi // Rambam. Maimonides Med. J. - 2014. – Vol. 5. – e0035.

117. Leucemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases / R.A. Mesa, C.-Y. Li, R.P. Ketterling et al. // Blood. - 2005. -Vol. 105, №3. - P. 973-977.

118. Leukocyte engagement of fibrin(ogen) via the integrin receptor alphaMbeta2/Mac-1 is critical for host inflammatory response in vivo / M.J. Flick, X.L. Du, D.P. Witte et al. // J. Clin. Invest. – 2004. – Vol. 113, №11. - P. 1596-1606.

119. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera / A. Falanga, M. Marchetti, A. Vignoli et al. // Exp. Hematol. – 2005. – Vol. 33. – P. 523–530.

120. Leukocytosis as an important risk factor for arterial thrombosis in WHO-defined early/prefibrotic myelofibrosis: an international study of 264 patients / V. Buxhofer-Ausch, H. Gisslinger, J. Thiele et al. // Am. J. Hematol. – 2012. – Vol. 87, №7. – P. 669–672.

121. Level of protein S and essential thrombocythemia / M.G. Mazzucconi, A. Chistolini, A. Ferrari et al. // Am. J. Hematol. – 1991. – Vol. 36. – P. 73.

122. Levine, R.L. JAK-mutant myeloproliferative neoplasms / R.L. Levine // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 2012. – Vol. 355. – P. 119-133.

123. Levine, R.L. New advances in the pathogenesis and therapy of essential thrombocythemia / R.L. Levine, M. Heaney // Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program. - 2008. - №1. - P. 76-82.

124. Ley, K. Adhesion Molecules: Function and Inhibition / K. Ley. - Springer, 2007. - 309 p.

125. Liu, K.D. JAK/STAT signaling by cytokine receptors / K.D Liu, S.L. Gaffen, M.A. Goldsmith // Curr. Opin. Immunol. - 1998. – Vol. 10. – P. 271–278.

126. Long-term follow-up of essential thrombocythemia patients treated with anagrelide: subgroup analysis according to JAK2/CALR/MPL mutational status / M.J.M. Osorio, L. Ferrari, N.P. Goette et al. // Eur. J. Haematol. – 2016. – Vol. 96. – P. 435–442.

127. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction / J.A. Suwaidi, S. Hamasaki, S.T. Higano et al. // Circulation. – 2000. – Vol. 101. – P. 948-954.

128. Long-term incidence of hematological evolution in three French prospective studies of hydroxyurea and pipobroman in polycythemia vera and essential trombocythemia / J.-J. Kiladijian, J.-D. Rain, J.-F. Bernard et al. // Semin. Thromb. Hemost. - 2006. - Vol. 32, №4. – P. 417-421.

129. Lowe, G.D.O. Can haematological tests predict cardiovascular risk? The 2005 Kettle lecture / G.D.O. Lowe // Br. J. Haematol. – 2006. – Vol. 133. – P. 232–250.

130. Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients / C. Besses, F. Cervantes, A. Pereira et al. // Leukemia. - 1999. – Vol. 13. – P. 150-154.

131. Markers of Endothelial and Platelet Status in Patients with Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera / C. Musolino, A. Alonci, G. Bellomo et al. // Hematology. – 1999. – Vol. 4, №5. – P. 397-402.

132. Messner, B. Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis / B. Messner, D. Bernhard // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. - 2014. - Vol. 34, №3. - P. 509–515.

133. Mital, A. Acquired von Willebrand Syndrome During the Course of Myelofibrosis: Analysis of 32 Cases / A. Mital, W. Prejzner, A. Hellmann // Adv. Clin. Exp. Med. – 2015. – Vol. 24, №6. – P. 1001–1006.

134. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations / F. Passamonti, C. Elena, S. Schnittger et al. // Blood. - 2011. – Vol. 117. – P. 2813–2816.

135. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients / A.D. Pardanani, R.L. Levine, T. Lasho et al. // Blood. - 2006. – Vol. 108. – P. 3472–3476.

136. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1cohort / P.A. Beer, P.J. Campbell, L.M. Scott et al. // Blood. - 2008. – Vol. 112. – P. 141–149.

137. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia / Y. Pikman, B.H. Lee, T. Mercher et al. // PLoS Med. - 2006. – Vol. 3. - e270.

138. MPL W515L/K Mutations in chronic myeloproliferative neoplasms / T.S. Akpinar, V.S. Hancer, M. Nalcaci, R. Diz-Kucukkaya // Turk. J. Haematol. - 2013. – Vol.30. – P. 8–12.

139. Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways / H. Luo, P. Rose, D. Barber et al. // Mol. Cell. Biol. - 1997. – Vol. 17. – P. 1562–1571.

140. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis / A.M. Vannucchi, T.L. Lasho, P. Guglielmelli et al. // Leukemia. - 2013. – Vol. 27. – P. 1861–1869.

141. Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups / F. Cervantes, G. Barosi, J.L. Demory et al. // Br. J. Haematol. - 1998. - Vol. 102, №3. - P. 684-690.

142. Myeloproliferative neoplasms in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a meta-analysis / J.H. Smalberg, L.R. Arends, D.C. Valla et al. // Blood. – 2012. – Vol. 120, №25. - P.4921-4928.

143. Neutrophil and endothelial adhesive function during human fetal ontogeny / C. Nussbaum, A. Gloning, M. Pruenster et al. // J. Leukoc. Biol. - 2013. - Vol. 93, №2. - P. 175-184.

144. Neutrophil extracellular trap formation and circulating nucleosomes in patients with chronic myeloproliferative neoplasms / C.P.M. Oyarzún, A. Carestia, P.R. Lev et al. // Sci. Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 38738.

145. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms / W. Vainchenker, F. Delhommeau, S.N. Constantinescu, O.A. Bernard // Blood. - 2011. – Vol. 118. – P. 1723–1735.

146. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition / R. Chaligne, C. Tonetti, R. Besancenot et al. // Leukemia. - 2008. – Vol. 22. – P. 1557–1566.

147. Nitric oxide derivatives and soluble plasma selectins in patients with myeloproliferative neoplasms / G. Cella, M. Marchetti, F. Vianello et al. // Thromb. Haemost. – 2010. – Vol. 104, №1. – P. 151-156.

148. Noninvasive diagnostic tools for investigating endothelial dysfunction / L. Ghiadoni, D. Versari, C. Giannarelli et al. // Curr. Pharm. Des. - 2008. - Vol. 14, №35. - P. 3715–3722.

149. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia / P.O. Bonetti, G.M. Pumper, S.T. Higano et al. // J. Am. Coll. Cardiol. – 2004. – Vol. 44. – P. 2137-2141.

150. Observational retrospective study of vascular modulator changes during treatment in essential thrombocythemia / A. Piccin, M. Steurer, C. Feistritzer et al. // Transl. Res. – 2017. – Vol. 184. - P. 21-34.

151. Oyarzún, C.P.M. Platelets as Mediators of Thromboinflammation in Chronic Myeloproliferative Neoplasms / C.P.M. Oyarzún, P.G. Heller // Front. Immunol. – 2019. – Vol. 10. – P. 1373.

152. Petri, B. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective / B. Petri, M. Phillipson, P. Kubes // J. Immunol. – 2008. – Vol. 180, №10. - P. 6439-6446.

153. Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis / D.M. Williams, A.H. Kim, O. Rogers et al. // Exp. Hematol. - 2007. – Vol. 35. – P. 1641–1646.

154. Platelet and coagulation activation markers in myeloproliferative diseases: relationships with JAK2 V6I7 F status, clonality, and antiphospholipid antibodies / B. Robertson, C. Urquhart, I. Ford et al. // J. Thromb. Haemost. - 2007. – Vol. 5, №8. – P. 1679–1685.

155. Platelet characteristics in patients with essential thrombocytosis / O.H. Pedersen, M.L. Larsen, E.L. Grove et al. // Cytometry B. Clin. Cytom. – 2018. – Vol. 94, №6. – P. 918–927.

156. Platelet hyperactivation in patients with essential thrombocythemia is not associated with vascular endothelial cell damage as judged by the level of plasma thrombomodulin, protein S, PAI-1, tPA and vWF / S. Bellucci, E. Ignatova, N. Jaillet, M.C. Boffa // Thromb. Haemost. – 1993. – Vol. 70. – P. 736-742.

157. Platelet-induced thrombin generation by the calibrated automated thrombogram assay is increased in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera / M. Panova-Noeva, M. Marchetti, H.M. Spronk et al. // Am. J. Hematol. – 2011. – Vol. 86. – P. 337-342.

158. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden / E. Arellano-Rodrigo, A. Alvarez-Larran, J.-C. Reverter et al. // Am. J. Hematol. – 2009. – Vol. 84. – P. 102–108.

159. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years / Gruppo Italiano Studio Policitemia // Ann. Intern. Med. – 1995. – Vol. 123, №9. – P. 656–664.

160. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera / A. Falanga, M. Marchetti, V. Evangelista et al. // Blood. – 2000. – Vol. 96. – P. 4261-4266.

161. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera / A. Pardanani, T.L. Lasho, C. Finke et al. – Leukemia. - 2007. – Vol. 21. – P. 1960–1963.

162. Prevalence of acquired von Willebrand syndrome during essential thrombocythemia: a retrospective analysis of 170 consecutive patients / A. Mital, W. Prejzner, M. Bieniaszewska, A. Hellmann // Pol. Arch. Med. Wewn. - 2015. – Vol. 125, №12. – P. 914-920.

163. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients / F. Passamonti, E. Rumi, L. Arcaini et al. // Haematologica. – 2008. - Vol. 93, №11. – P. 1645-1651.

164. Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks / S. Pfeiler, K. Stark, S. Massberg, B. Engelmann // Haematologica. – 2017. – Vol. 102. – P. 206–213.

165. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden / A.M. Vannucchi, E. Antonioli, P. Guglielmelli et al. // Leukemia. – 2007. – Vol. 21. – P. 1952-1959.

166. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes / A. Celi, G. Pellegrini, R. Lorenzet et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1994. – Vol. 91. – P. 8767–8771.

167. Reduction of antithrombin III, protein C, and protein S levels and activated protein C resistance in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients with thrombosis / A. Bucalossi, G. Marotta, C. Bigazzi et al. // Am. J. Hematol. – 1996. – Vol. 52. – P. 14-20.

168. Reikvam, H. Venous thromboembolism in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera / H. Reikvam, R.V. Tiu // Leukemia. – 2012. – Vol. 26, №4. – P. 563-571.

169. Revised response criteria for polycythemia vera and essential thrombocythemia: an ELN and IWG-MRT consensus project / G. Barosi, R. Mesa, G. Finazzi et al. // Blood. – 2013. – Vol. 121. – P. 4778–4781.

170. Risk for arterial and venous thrombosis in patients with myeloproliferative neoplasms: a population-based cohort study / M. Hultcrantz, M. Björkholm, P.W. Dickman et al. // Ann. Intern. Med. - 2018. – Vol. 168. – P. 317-325.

171. Risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemiavera according to JAK2 V617F mutation status / G. Finazzi, A. Rambaldi, V. Guerini et al. // Haematologica. - 2007. – Vol. 92. – P. 135–136.

172. Rodriguez-Linares, B. Thrombopoietin potentiates activation of human platelets in association with JAK2 and TYK2 phosphorylation / B. Rodriguez-Linares, S.P. Watson // Biochem. J. – 1996. – Vol. 316. – P. 93–98.

173. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis - an update / R. Ross // N. Engl. J. Med. – 1986. – Vol. 314. – P. 488-500.

174. Ruggeri, Z.M. The complex multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor / Z.M. Ruggeri, T.S. Zimmerman // Blood. – 1981. – Vol. 57. – P. 1140-1143.

175. Saeidi, K. Myeloproliferative neoplasms: Current molecular biology and genetics / K. Saeidi // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2016. – Vol. 98. – P. 375-389.

176. Saharinen, P. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction / P. Saharinen, O. Silvennoinen // J. Biol. Chem. - 2002. – Vol. 277. – P. 47954–47963.

177. Sankar, K. Thrombosis in the Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasms / K. Sankar, B.L. Stein, R.K. Rampal // Cancer Treat. Res. – 2019. – Vol. 179. – P. 159-178.

178. Schächinger, V. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease / V. Schächinger, M.B. Britten, A.M. Zeiher // Circulation. – 2000. – Vol. 101. - P. 1899-1906.

179. Severe acquired platelet dysfunction because of primary myelofibrosis with full functional and morphological recovery after allogeneic hematopoietic cell transplantation / Y.A. Linnik, L.T. Salvatore, C.H. Lowrey, D.L. Ornstein // Blood Coagul. Fibrinolysis. – 2019. – Vol. 30, №8. – P. 419-422.

180. Soluble CD40 ligand and endothelial dysfunction in aspirin-treated polycythaemia vera patients / G. Lessiani, A. Dragani, A. Falco et al. // Br. J. Haematol. – 2009. – Vol. 145, №4. – P. 538-540.

181. Soluble cell adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1, and sE-selectin) in patients with early rheumatoid arthritis / P.A. Klimiuk, M. Fiedorczyk, S. Sierakowski, J. Chwiecko // Scand. J. Rheumatol. - 2007. - Vol. 36, №5. - P. 345–350.

182. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2 / J. Nangalia, C.E. Massie, E.J. Baxter et al. // N. Engl. J. Med. - 2013. – Vol. 369. – P. 2391–2405.

183. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms / T. Klampfl, H. Gisslinger, A.S. Harutyunyan et al. // N. Engl. J. Med. - 2013. – Vol. 369. – P. 2379–2390.

184. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders / D. Pietra, S. Li, A. Brisci et al. // Blood. - 2008. – Vol. 111. – P. 1686–1689.

185. Sun, C. Calreticulin gene mutations in myeloproliferative neoplasms without Janus kinase 2 mutations / C. Sun, S. Zhang, J. Li // Leuk. Lymphoma. – 2015. - Vol. 56. – P. 1593–1598.

186. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease / T. Neunteufl, R. Katzenschlager, A. Hassan et al. // Atherosclerosis. – 1997. – Vol. 129. – P. 111-118.

187. Tefferi, A. Annual Clinical Updates in Hematological Malignancies: a continuing medical education series: polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management / A. Tefferi // Am. J. Hematol. – 2011. – Vol. 86, №3. – P. 292–301.

188. Tefferi, A. Myeloproliferative neoplasms: a contemporary review / A. Tefferi, A. Pardanani // JAMA Oncol. - 2015. – Vol. 1. – P. 97-105.

189. Tefferi, A. Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies / A. Tefferi, W. Vainchenker // J. Clin. Oncol. – 2011. – Vol. 29, №5. – P. 573-582.

190. Tefferi, A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1 / A. Tefferi // Leukemia. – 2010. – Vol. 24. – P. 1128–1138.

191. Tefferi, A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management / A. Tefferi // Am. J. Hematol. – 2012. – Vol. 87, №3. – P. 285-293.

192. Tefferi, A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. A. Tefferi, T. Barbui // Am. J. Hematol. – 2017. – Vol. 92, №1. – P. 94-108.

193. Tefferi, A. Thrombosis in myeloproliferative disorders: prevalence, prognostic factors, and the role of leukocytes and JAK2V617F / A. Tefferi, M. Elliott // Semin. Thromb. Hemost. - 2007. – Vol. 33. – P. 313–320.

194. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia / D.A. Arber, A. Orazi, R. Hasserjian et al. // Blood. – 2016. – Vol. 128, №3. – P. 462-463.

195. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability / H.C. Hemker, P. Giesen, R.AlDieri et al. // Pathophysiol. Haemost. Thromb. – 2002. – Vol. 32. – P. 249-253.

196. The dual role of platelet-innate immune cell interactions in thrombo-inflammation / J. Rayes, J.H. Bourne, A. Brill, S.P. Watson // Res. Pract. Thromb. Haemost. - 2019. – Vol. 4. – P. 23-35.

197. The effects of JAK inhibitor therapy upon novel markers of thrombosis In myeloproliferative neoplasms / C. Keohane, D.P. McLornan, K. Sanchez et al. // Haematologica. – 2015. – Vol. 100, №9. - e348-350.

198. The fibrinolytic system and proteins C and S in treated polycythaemia rubra vera / I. Wieczorek, I.R. MacGregor, R.J. Prescott, C.A. Ludlam // Blood Coagul. Fibrinolysis. – 1992. – Vol. 3. – P. 823-826.

199. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation / C.H.M. Jamieson, J. Gotlib, J.A. Durocher et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. - 2006. – Vol. 103. – P. 6224–6229.

200. The paradox of platelet activation and impaired function: platelet-von Willebrand factor interactions, and the etiology of thrombotic and hemorrhagic manifestations in essential thrombocythemia and polycythemia vera / J.J. Michiels, Z. Berneman, W. Schroyens et al. // Semin. Thromb. Hemost. – 2006. – Vol. 32. – P. 589-604.

201. The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythaemia / B. Cheung, D. Radia, P. Pantelidis et al. // Br. J. Haematol. – 2006. – Vol. 132. – P. 244-245.

202. The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease / G.E. Rainger, M. Chimen, M.J. Harrison et al. // Platelets. – 2015. – Vol. 26, №6. – P. 507-520.

203. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system / H.C. Hemker, R.A. Dieri, E.D. Smedt, S. Beguin // Thromb. Haemost. – 2006. – Vol. 96. – P. 553-561.

204. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocytemia and polycythemia vera / M. Marchetti, E. Castoldi, H.M.H. Spronk et al. // Blood. – 2008. – Vol. 112, №10. – P. 4061–4068.

205. Thrombocytosis and leukocytosis interaction in vascular complications of essential thrombocythemia / A. Carobbio, G. Finazzi, E. Antonioli et al. // Blood. – 2008. – Vol. 112. – P. 3135–3137.

206. Thrombophilic genotypes, natural anticoagulants, and plasma homocysteine in myeloproliferative disorders: relationship with splanchnic vein thrombosis and arterial disease / L. Amitrano, M.A. Guardascione, P.R.J. Ames et al. // Am. J. Hematol. – 2003. – Vol. 72. – P. 75-81.

207. Thrombosis in myelofibrosis: prior thrombosis is the only predictive factor and most venous events are provoked / M.A. Elliott, A. Pardanani, T.L. Lasho et al. // Haematologica. – 2010. – Vol. 95, №10. – P. 1788–1791.

208. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors / T. Barbui, A. Carobbio, F. Cervantes et al. // Blood. – 2010. – Vol. 115, №4. – P. 778–782.

209. Thromboxane B2 and platelet derived growth factor in essential thrombocythemia treated with anagrelide / M.S. Laguna, L.I. Kornblihtt, R.F. Marta, F.C. Molinas // Medicina. – 2000. – Vol. 60. – P. 448–452.

210. Two novel JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythaemia vera patients / C.M. Butcher, U. Hahn, L.B. To et al. // Leukemia. - 2008. – Vol. 22. – P. 870–873.

211. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules / A. Falanga, M. Marchetti, A. Vignoli et al. // Exp. Hematol. – 2007. – Vol. 35. – P. 702-711.

212. V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis / P.J. Campbell, M. Griesshammer, K. Dohner et al. // Blood. - 2006. – Vol. 107. – P. 2098–2100.

213. Variation of PDGF, TGFbeta, and bFGF levels in essential thrombocythemia patients treated with anagrelide / P.R. Lev, R.F. Marta, P. Vassallu, F.C. Molinas // Am. J. Hematol. – 2002. – Vol. 70. – P .85-91.

214. Varon, D. Platelets and their microparticles as key players in pathophysiological responses / D. Varon, E. Shai // J. Thromb. Haemost. – 2015. – Vol. 13, Suppl.1. – S40-S46.

215. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera / R. Marchioli, G. Finazzi, R. Landolfi et al. // J. Clin. Oncol. – 2005. – Vol. 23, №10. – P. 2224–2232.

216. Wang, W.-A. Calreticulin signaling in health and disease / W.-A. Wang, J. Groenendyk, M. Michalak // Int. J. Biochem. Cell. Biol. – 2012. – Vol. 44. - P. 842–846.

217. Wieczorek, I. Low proteins C and S and activation of fibrinolysis in treated essential thrombocythemia / I. Wieczorek, I.R. MacGregor, C.A. Ludlam // Am. J. Hematol. – 1995. – Vol. 49. – P. 277-281.