

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА ТРОМБОЗА И ОСОБЕННОСТИ
ОКИСЛИТЕЛЬНО-АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ
У БОЛЬНЫХ ИСТИННОЙ ПОЛИЦИТЕМИЕЙ**

Алексян Л.Р., Рыбакова Л.П., Капустин С.И., Замотина Т.Б., Бессмельцев С.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии

Федерального медико-биологического агентства»,

г. Санкт-Петербург, ул. 2-Советская, д.16, тел. (812) 717- 19-37, forlusu@rambler.ru

Резюме. Профилактика сосудистых катастроф является важнейшей задачей современной терапии истинной полицитемии (ИП). Установление генетических и приобретенных факторов риска тромбоза при данном заболевании представляется в этой связи весьма актуальным. В работе проведен анализ встречаемости ряда генетических вариантов, ассоциированных с увеличением риска тромбоза, а также изучены особенности состояния окислительно-антиокислительной системы (ОС-АОС) в группе из 100 больных ИП и у 200 здоровых лиц. Показано, что мутации FV G1691A и FII G20210A не ассоциированы с риском развития тромботических осложнений при ИП. Выявлено почти двукратное снижение доли лиц с генотипом 5G/5G гена PAI-1 в группе пациентов, имевших в анамнезе эпизод(ы) тромбоза, что может свидетельствовать о протективном эффекте этого генетического варианта в патогенезе тромботических осложнений при ИП. Обнаружен ряд отличий группы больных от здоровой популяции в характере распределения генотипов фактора I, GpIIIa, MTHFR и их сочетаний. Выявлены признаки значительного дисбаланса ОС-АОС в группе больных, что может указывать на важную роль этого фактора в увеличении риска тромботических и иных осложнений при ИП. Увеличение уровня малонового диальдегида на 40% по сравнению с нормой ($p<0,001$) свидетельствует о нарастании окислительных процессов при этом заболевании. На угнетение антиоксидантной защиты указывает снижение относительно нормальных показателей уровня церулоплазмينا в плазме крови больных ИП – на 30% ($p<0,01$) и соотношения активностей супероксиддисмутазы и каталазы – в 2,3 раза, а также содержания небелковых тиоловых групп в эритроцитах – на 41% ($p<0,001$).

Ключевые слова: истинная полицитемия, тромбоз, фактор риска, наследственная тромбофилия, ген, оксидативный стресс, окислительно-антиокислительная система

GENETIC RISK FACTORS OF THROMBOSIS AND OXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM IN PATIENTS WITH POLYCYTHEMIA VERA

Aleksanyan L.R., Ribakova L.P., Kapustin S.I., Zamotina T.B., Bessmeltsev S.S.

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology,

Russian Federal Medico-biological Agency,

2-nd Sovetskaya st., 16, Saint-Petersburg, Russia, Tel. (812)-717-19-37, forlusy@rambler.ru

Abstract. Prophylaxis of vascular complications is an important part of modern therapy in polycythemia vera (PV). Identification of genetic and acquired risk factors for thrombosis in PV is of great value. In this work, we studied the frequency of several genetic variants associated with thrombosis as well as the peculiarities of oxidant-antioxidant system (OS-AOS) in 100 patients with PV and 200 healthy controls (HC). We found, that mutations FV G1691A and FII G20210A are not associated with increased risk of thrombotic complications in PV. We revealed almost 2-fold decrease in frequency of PAI-1 5G/5G genotype in the group of PV patients with positive history of thrombosis when compared to those free of thrombotic events. This variant of PAI-1 gene could, thus, have protective effect on thrombosis development in PV. We also found, that distribution of genotypes of the β -fibrinogen (factor I), GpIIIa and MTHFR genes as well as their combinations in PV group differed from those in HC. The features of imbalance between oxidant and antioxidant systems were detected in PV patients. This observation could indicate on participation of this acquired factor in pathogenesis of thrombotic and other complications in PV. The growth of oxidation processes was reflected by 40% increase of malondialdehyde content in blood plasma of PV patients (15.4 $\mu\text{mol/l}$ vs. 11.0 $\mu\text{mol/l}$ in HC, ($p<0,001$). At the same time, the level or/and activity of several components of the antioxidant system were decreased significantly in PV group. In particular, we detected the reduction of ceruloplasmin plasma level (by 30% compared to HC, $p<0,01$) and non-protein thiol groups content in erythrocytes (by 41% compared to HC, $p<0,001$) in PV patients. Moreover, the mean ratio of superoxide dismutase to catalase activities was significantly decreased in PV group ($p<0,001$).

Key words: polycythemia vera, thrombosis, risk factor, inherited thrombophilia, gene, oxidative stress, oxidant-antioxidant system

Введение

Истинная полицитемия (ИП) относится к числу клональных Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний, характеризуется неконтролируемой пролиферацией эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, а также наличием значительной массы неполноценных эритроидных клеток [1, 2]. В последние годы достигнуты значительные успехи в расшифровке молекулярных механизмов развития ИП, что способствовало созданию нового класса лекарственных препаратов патогенетического действия – ингибиторов янус-киназ, показавших достаточно высокую эффективность и безопасность в клинических исследованиях [3, 4]. На фоне существенного увеличения выживаемости больных и снижения риска летальности вследствие основного заболевания, развитие тромботических, инфекционных и иных осложнений при ИП по-прежнему представляет серьезную проблему. Выявление факторов риска возникновения указанных осложнений, их своевременная коррекция являются, таким образом, актуальными задачами, решение которых может способствовать повышению качества и длительности жизни больных ИП.

Развитие оксидативного стресса вследствие дисбаланса про- и антиоксидантных изменений в организме, вызванных как генетически обусловленными, так и внешними факторами, является ключевым звеном разнообразных патологических реакций. Большая часть осложнений, характерных для ИП, в том числе, со стороны сердечно-сосудистой системы (артериальная гипертензия, венозные и артериальные тромбозы) в настоящее время объединены в группу так называемых “свободнорадикальных патологий” [5]. В литературе также активно обсуждается роль свободнорадикальных процессов в патогенезе онкологических и онкогематологических заболеваний, однако при ИП такие исследования единичны [5-7]. В связи с этим, изучение особенностей биохимических показателей окислительно-антиокислительной системы (ОС-АОС) в группе больных ИП, несомненно, представляет значительный интерес.

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) является одним из наиболее значимых последствий оксидативного стресса. Для оценки интенсивности ПОЛ и, следовательно, активности окислительных процессов наиболее часто используют количественное определение в плазме крови вторичного продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА), являющегося одним из интегральных показателей пероксидации липидов. Повышение уровня МДА используют в качестве биомаркера для раннего выявления метаболических нарушений в организме [5, 8, 9]. В противовес свободнорадикальным процессам, в организме существует антиоксидантная система, представляющая собой совокупность защитных механизмов при избыточном образовании продуктов ПОЛ в клетках, тканях и

органах [10]. Равновесие между этими двумя противоположными системами препятствует развитию цепного окислительного процесса и характеризует антиоксидантный статус организма.

К числу наиболее важных ферментов антиоксидантной системы относятся супероксиддисмутаза (СОД), глутатион пероксидаза, каталаза, церулоплазмин и трансферазы. Каждый из них имеет определенную специализацию по отношению к конкретным видам радикалов и перекисей. Супероксиддисмутаза является ключевым звеном в регуляции концентрации супероксидного анион-радикала, который образуется при синтезе простагландинов, метаболизме ксенобиотиков и ряде других процессов в клетке, участвует в клеточной пролиферации и экспрессии генов. Это позволяет рассматривать СОД как фермент, выполняющий не только защитную, но и регуляторную роль [8, 9]. Перекись водорода, образующаяся в результате дисмутации диоксидов, является основным источником гидроксильных радикалов. Устранение перекиси водорода происходит благодаря сопряженной работе каталазы и пероксидаз. Каталаза – один из наиболее активных ферментов антиоксидантной системы. Имеет место перекрестная регуляция активности СОД и каталазы, что находит отражение в отрицательной корреляции между активностями ферментов [8, 9, 11].

Основным внеклеточным антиоксидантом крови является церулоплазмин – многофункциональный медьсодержащий сывороточный белок, который синтезируется в гепатоцитах и ингибирует ПОЛ за счет перехвата и инактивации супероксидного радикала. Церулоплазмин осуществляет транспорт меди, доставляя ее в ткани для синтеза цитохром-С-оксидазы и других ферментов, участвует в регуляции биогенных аминов, является стимулятором кроветворения и регулятором функций крови, а также оказывает мощное противовоспалительное действие [8, 11]. Важными компонентами поддержания окислительно-восстановительного потенциала клетки являются низкомолекулярные тиоловые соединения, в состав которых входят сульфгидрильные (SH)-группы. При различных патологических состояниях наблюдается обратимая окислительная модификация SH-групп, что представляет неспецифическую реакцию организма на экстремальное воздействие. Тиоловые соединения подвергаются окислению в первую очередь, что снижает негативное воздействие свободных радикалов на другие функциональные группы и молекулы. В условиях оксидативного стресса окисление SH-групп приводит к опасному для организма угнетению функций серосодержащих ферментов и коферментов. В эритроцитах 90% небелковых тиоловых групп (НТГ) принадлежит восстановленному глутатиону [8, 9].

Основной причиной увеличения риска тромбозов при ИП является изменение реологических свойств крови вследствие повышения вязкости плазмы, а также числа циркулирующих клеточных элементов, что приводит к формированию конгломератов эритроцитов друг с другом, с тромбоцитами, а при воспалительных процессах – и с лейкоцитами крови [12]. Отдельный вклад в патогенез тромбозов при ИП может вносить генетически обусловленная склонность пациента к их развитию. Большинство авторов полагают, что первостепенное значение в увеличении риска артериальных и венозных тромбозов имеет аллельная нагрузка мутации V617F в гене JAK2 [13, 14]. Однако нельзя в этих случаях исключать и возможное влияние других генетических факторов, приводящих к протромботическим изменениям в системе гемостаза и, как следствие, увеличению вероятности развития тромботических осложнений у больных ИП. Таким образом, весьма актуальным представляется анализ встречаемости известных детерминант наследственной тромбофилии (НТ) у этой категории больных с целью уточнения молекулярных основ патогенеза заболевания и установления новых факторов риска артериальных и венозных тромбозов при данной патологии.

Целью настоящего исследования явилось изучение распространенности некоторых приобретенных (дисбаланс ОС-АОС) и генетических факторов риска тромбоза при ИП, а также оценка их роли в развитии тромботических осложнений у этих больных.

Материал и методы исследования

Обследуемую группу составили 100 больных ИП (45 мужчин и 55 женщин, средний возраст – $61,8 \pm 15,2$ года), находившихся на стационарном или амбулаторном лечении в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России в период с 2011 по 2014 гг. Все больные находились в хронической фазе заболевания. У 27 (27,0%) пациентов в анамнезе наблюдались тромботические осложнения, в том числе, острое нарушение мозгового кровообращения – у 14 (51,9%) человек, острый инфаркт миокарда – у 9 (33,3%) больных, тромбофлебит поверхностных вен – в 3 (11,1%) случаях, инфаркт селезенки – у 1 (3,7%) пациента. Контрольную группу (КГ) составили 200 здоровых лиц, соответствующих по полу и возрасту обследованным больным.

С целью идентификации аллельного полиморфизма ряда генов, ассоциированных с активностью гемостаза, из лейкоцитов периферической крови, стабилизированной ЭДТА в конечной концентрации 0,25%, выделяли геномную ДНК с помощью солевого метода [15]. С помощью метода ПЦР-ПДРФ, который основан на анализе полиморфизма длин

рестрикционных фрагментов (ПДРФ) продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР), полученных при обработке специфической эндонуклеазой рестрикции, осуществляли выявление аллельных вариантов следующих генов: фактора II (FII 20210 G/A), фактора V (FV 1691 G/A, FV Leiden), β -субъединицы фактора I (FI-B –455 G/A), ингибитора активатора плазминогена типа I (PAI-1 –675 4G/5G), гликопротеина IIIa (GpIIIa 1565 T/C) и метилентетрагидрофолат редуктазы (MTHFR 677 C/T). Условия постановки ПЦР и последующего рестрикционного анализа подробно описаны в литературе [16-21]. Продукты рестрикции анализировали с помощью электрофореза в 6% или 10% полиакриламидном геле.

Для характеристики состояния ОС-АОС в группе 70 больных ИП и 50 здоровых лиц использовали такие показатели, как уровень в плазме крови МДА и церулоплазмينا, содержание НТГ в эритроцитах, а также активность в плазме крови СОД и каталазы. Уровень МДА определяли колориметрическим методом по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [22]. Содержание церулоплазмينا (КФ 1.16.3.1) измеряли по реакции окисления фенилендиаминдигидрохлорида в его присутствии [23]. Определение уровня НТГ в эритроцитах основано на способности низкомолекулярных тиоловых соединений при взаимодействии с дитионитробензойной кислотой образовывать стойкое окрашенное соединение [11]. Активность суммарной СОД (КФ 1.15.1.1) оценивали по степени торможения реакции окисления кверцетина [24]. Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) определяли на основании ее способности разлагать перекись водорода, о чем судили по количеству неутилизированной H_2O_2 , образующей стойкий окрашенный комплекс с солями молибдата аммония [25].

Статистическая обработка результатов проводилась на персональном компьютере с помощью программы GraphPad Prism, версия 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Частоты встречаемости (ЧВ) генотипов определяли прямым подсчетом. Для оценки степени различий по данному показателю между исследуемыми группами использовался точный критерий Фишера. При этом рассчитывали коэффициент “отношения шансов” (OR – *odds ratio*) с 95% доверительным интервалом (CI – *confidence interval*), а также *p*-значение. Оценку различий биохимических показателей проводили по методу Стьюдента. Во всех случаях статистическая значимость различий принималась при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования

Результаты сравнительного анализа распределения генотипов изученных генов у больных ИП и в контроле представлены в таблице 1. В целом, ЧВ генотипов у больных соответствовали таковым в КГ. В частности, мутация FV Leiden была выявлена у 4 (4,0%)

пациентов с ИП, что несколько реже, чем в здоровой популяции (4,5%). При этом только у одного больного в возрасте 55 лет был диагностирован острый инфаркт миокарда, тогда как у 3 остальных не наблюдалось тромботических осложнений в анамнезе. Мутация G20210A в гене протромбина была обнаружена у 1 (1,0%) пациентки, не имевшей в анамнезе тромбозов, в то время как в КГ доля носителей этого варианта составила 2,5%.

Таблица 1 – Распределение генотипов изученных генов у больных ИП и в контроле (КГ).

Ген, полиморфизм	Генотип	ЧВ генотипа, %		OR (95%CI)	p
		ИП (N=100)	КГ (N=200)		
FII-B, -455 G/A	-455 GG	61,0	55,5	0,4 (0,1-1,3)	0,13
	-455 GA	36,0	36,5		
	-455 AA	3,0	8,0		
FII, 20210 G/A	20210 GG	99,0	97,5		
	20210 GA	1,0	2,5		
	20210 AA	0,0	0,0		
FV, 1691 G/A	1691 GG	96,0	95,5		
	1691 GA	4,0	4,5		
	1691 AA	0,0	0,0		
PAI-1, -675 4G/5G	-675 4G/4G	31,5	34,0		
	-675 4G/5G	50,5	48,0		
	-675 5G/5G	18,0	18,0		
GpIIIa, 1565 T/C	1565 TT	72,0	67,0	0,7 (0,4-1,2) 3,1 (0,5-18,5)	0,23 0,34
	1565 TC	25,0	32,0		
	1565 CC	3,0	1,0		
MTHFR, 677 C/T	677 CC	50,5	49,5		
	677 CT	39,0	40,5		
	677 TT	10,5	10,0		

Примечание. N – количество индивидов в группе.

В группе больных ИП доля лиц с генотипом -455 AA фактора I оказалась в 2,5 раза ниже, чем в КГ (3,0% против 8,0%), однако это различие не было статистически значимым (OR=0,4; 95%CI: 0,1-1,3; p=0,13). Гетерозиготы по гену GpIIIa также встречались гораздо реже среди пациентов, чем в группе здоровых лиц (25,0% против 32,0% соответственно). При этом гомозиготы по аллелю GpIIIa 1565 C обнаруживались среди больных в 3 раза чаще, чем в контроле (3,0% против 1,0% соответственно), однако это различие также не было статистически значимым (OR=3,1; 95%CI: 0,5-18,5; p=0,34). Интересно, что у всех 3

пациентов с указанным генотипом одновременно был выявлен гетерозиготный генотип фактора I. Данное наблюдение характеризовалось положительной ассоциативной связью между вариантами GpIIIa 1565 CC и FI-B -455 GA в группе больных (OR=13,3; 95%CI: 0,7-265,1; $p=0,045$). Кроме того, в группе лиц с ИП была обнаружена отрицательная ассоциативная связь между генотипом MTHFR 677TT и носительством аллеля -455 A гена фактора I (OR=0,14; 95%CI: 0,02-1,1; $p=0,047$). Интересным наблюдением в группе пациентов с ИП, перенесших тромботические осложнения, явилось почти двукратное снижение ЧВ генотипа 5G/5G гена PAI-1 (11,1% против 20,5% в группе больных, не имевших тромбозов), однако это различие не было статистически значимым ($p=0,38$).

В группе больных ИП обнаружено значительное (почти на 40%) увеличение уровня МДА в плазме крови (в среднем, 15,4 мкмоль/л), по сравнению с контролем (11 мкмоль/л) ($p<0,001$), что свидетельствует о наличии оксидативного стресса у большинства пациентов (рис. 1).

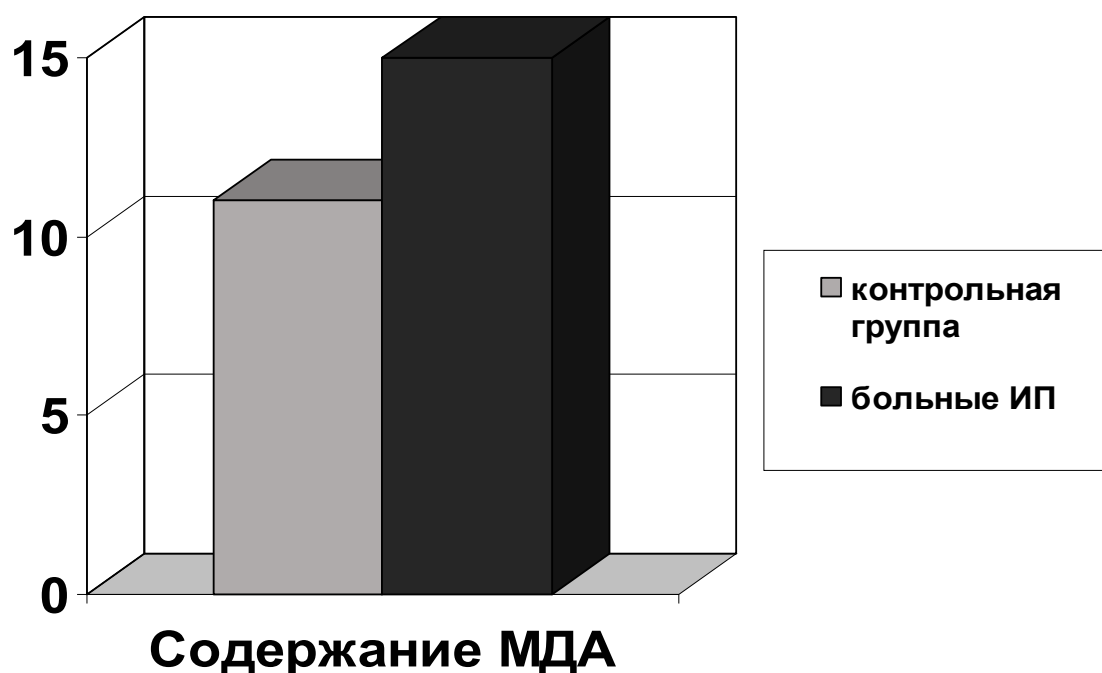


Рисунок 1. Содержание малонового диальдегида в плазме крови больных ИП.

Показатели антиоксидантной системы у лиц с ИП испытывали разнонаправленное изменение. Как видно из рисунка 2, активность каталазы в плазме крови больных ИП была повышена в 2,7 раза по сравнению с нормой ($p<0,001$). Для активности СОД при ИП, в среднем, не отмечалось достоверного изменения показателя, однако наблюдалась его выраженная вариабельность по группе. В целом, соотношение активностей этих сопряженных ферментов антиоксидантной защиты оказалось снижено у больных ИП в 2,3

раза по сравнению с нормой (9,1 против 21,0, $p < 0,001$). Высокий уровень активности каталазы и вариабельность значений активности СОД у больных ИП могут свидетельствовать о неспособности поддержания барьерных функций эритроцитарной мембраной, а также, возможно, о ее повреждении продуктами ПОЛ.

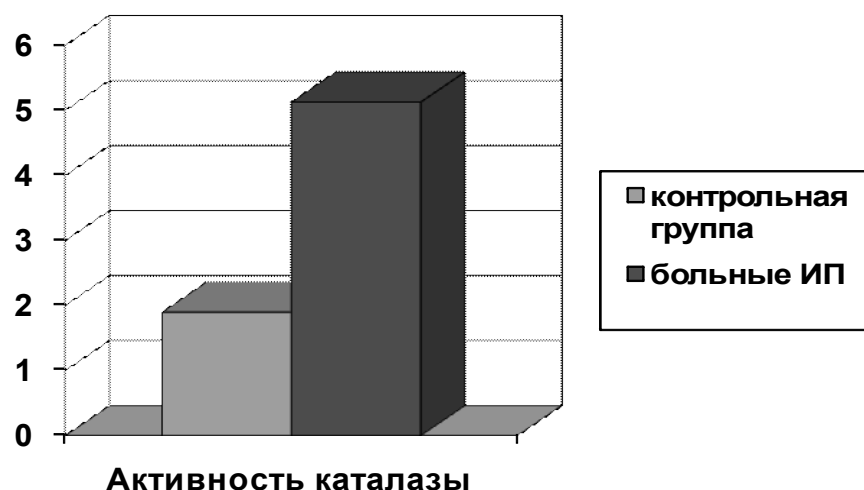


Рисунок 2. Активность каталазы в плазме крови больных ИП.

Высокий уровень активности каталазы при ИП, по всей видимости, объясняется наличием значительной массы неполноценных эритроидных клеток. Об этом же свидетельствует представленное на рис. 3 снижение на 41% содержания НТГ у больных (0,2 ммоль/л против 0,34 ммоль/л в КГ, $p < 0,001$), что может быть также связано с присутствием при ИП микроцитарных фракций эритроцитов. Кроме того, в группе больных наблюдалось снижение на 30% уровня церулоплазмينا в плазме крови по сравнению с нормой (0,28 г/л против 0,4 г/л, $p < 0,01$). Возможно, это объясняется тем, что печень не справляется с утилизацией поврежденных эритроидных клеток, что ведет к осложнению болезни и отражается на синтезе данного белка.

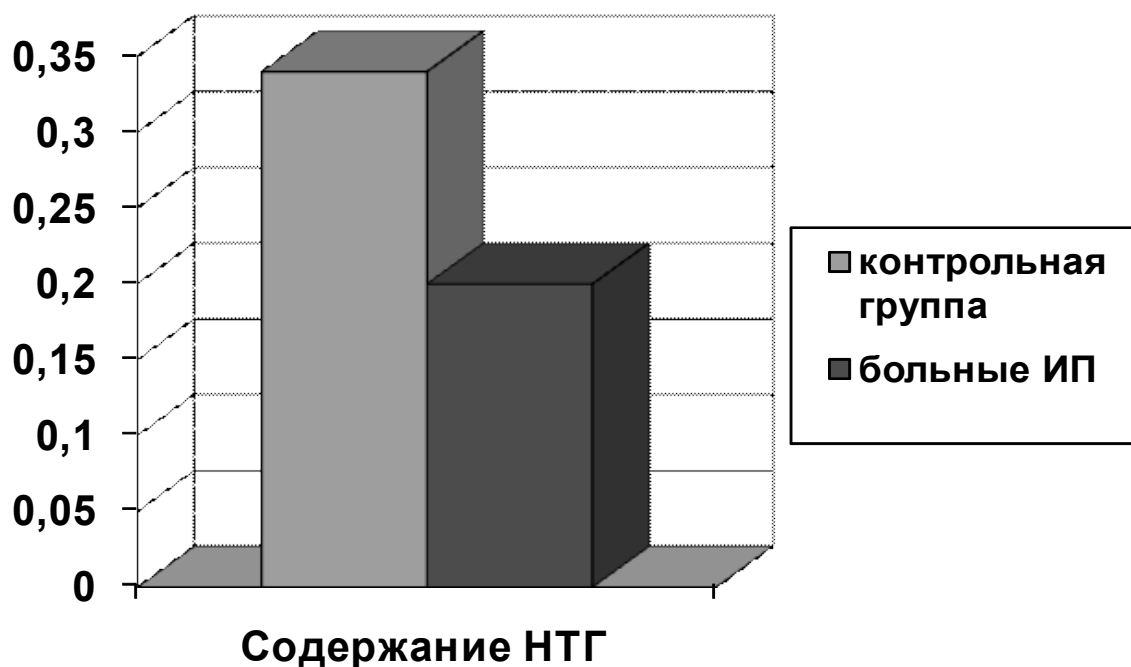


Рисунок 3. Содержание небелковых тиоловых групп в эритроцитах больных ИП.

Обсуждение результатов

Установление факторов, повышающих риск развития тромботических осложнений у онкогематологических больных, представляет важную проблему современной гематологии. Частота возникновения венозных и артериальных тромбозов особенно велика в группе пациентов с миелопролиферативными заболеваниями, в частности, ИП. Тем не менее, данные отечественной и зарубежной литературы о патогенетических механизмах тромбоза при ИП весьма скудны [13, 14, 26, 27]. В последние годы активно обсуждается роль наследственных факторов в развитии тромботических осложнений, в том числе, при различных гемобластозах. Trifa A.P. et al. обнаружили, что носительство Лейденской мутации может быть ассоциировано с наличием тромбозов в анамнезе больных ИП [26]. Напротив, результаты нашего исследования не позволяют говорить о такой взаимосвязи. Анализ распределения генотипов шести ключевых генов, вовлеченных в регуляцию функциональной активности гемостаза, проведенный как в общей группе больных ИП, так и в зависимости от наличия тромботических эпизодов в анамнезе, показал, что “классические” детерминанты наследственной тромбофилии – мутации FV G1691A и FII G20210A, по всей видимости, не оказывают существенного влияния на риск развития тромбозов при этом заболевании. В то же время, выявленное снижение ЧВ генотипа 5G/5G гена PAI-1 в группе пациентов, имевших в анамнезе эпизод(ы) тромбоза, возможно, указывает на протективный эффект этого генетического варианта в патогенезе указанных осложнений при ИП. Обнаруженные различия между группой больных и контролем в ЧВ генотипов фактора I, GrIIIa и MTHFR, а также их сочетаний могут свидетельствовать о вовлечении указанных генов в патогенез ИП или/и ее осложнений.

Полученные нами данные убедительно доказывают факт наличия дисбаланса в состоянии ОС-АОС у больных ИП, что выражается, прежде всего, в увеличении уровня МДА и, следовательно, нарастании окислительных процессов. Снижение показателей основных компонентов антиоксидантной защиты, по всей видимости, связано с истощением данной системы вследствие состояния хронического оксидативного стресса и воспаления. Как было показано нами ранее, дисбаланс ОС-АОС является характерным наблюдением у лиц с ранним дебютом венозного тромбоза, что может быть связано с его негативным влиянием на целостность и тромборезистентные свойства

сосудистого эндотелия [28]. Таким образом, можно предположить, что оксидативный стресс является также одним из ведущих патогенетических механизмов тромботических осложнений у больных ИП. Это свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения молекулярных биохимических процессов при ИП для понимания факторов риска и прогноза осложнений этого заболевания, а также о перспективности использования новых подходов к его лечению, способствующих элиминации воспаления, в том числе, за счет коррекции дисбаланса ОС-АОС, и включения гемореологических корректоров в состав патогенетической терапии для профилактики тромбозов.

Выводы

“Классические” детерминанты наследственной тромбофилии (мутации FV Leiden и FII G20210A) не оказывают существенного влияния на риск развития тромбозов при ИП. Отличия в распределении генотипов фактора I, GpIIb и MTHFR у больных ИП от нормы свидетельствуют о возможном вовлечении указанных факторов в патогенез заболевания, риск или/и прогноз его осложнений. Генотип 5G/5G гена PAI-1 может оказывать защитное действие в отношении риска развития тромботических осложнений при ИП. Нарушение баланса ОС-АОС является характерным наблюдением в группе больных ИП, что свидетельствует о необходимости его коррекции с целью профилактики тромботических и иных осложнений при данном заболевании.

Список литературы

1. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С., Шихбабаева Д.И. Современные представления о диагностике и лечении истинной полицитемии // Вестник гематологии. – 2015. – Т. 11, № 1. – С. 4-46.
2. Гематология: Новейший справочник / Под общ. ред. К.М. Абдулкадырова. – М.: Изд-во Эксмо; СПб.: Изд-во Сова, 2004. – 928 с.
3. Гусева С.А., Бессмельцев С.С., Абдулкадыров К.М., Гончаров Я.П. Истинная полицитемия. – Киев, СПб.: Логос, 2009. – 405 с.
4. Поп В.П. Истинная полицитемия // Гематология: национальное руководство / под ред. О.А. Рукавицына. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – С. 337-345.
5. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и соавт. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.

6. Durmus A., Mentese A., Yilmaz M. et al. The thrombotic events in polycythemia vera patients may be related to increased oxidative stress // *Med. Princ. Pract.* – 2014. – Vol. 23. – P. 253-258.
7. Samuelsson J., Lindstrom P., Palmblad J. Stimulus-specific defect in oxidative metabolism of polymorphonuclear granulocytes in polycythemia vera // *Eur. J. Haematol.* – 1988. – Vol. 41. – P. 454-458.
8. Путилина Ф.Е., Галкина О.В., Ещенко Н.Д. и соавт. Свободнорадикальное окисление. СПб: Изд-во СПб. университета, 2008. – 161 с.
9. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // *Вестник Рос. Акад. мед. наук.* – 1998, № 7. – С. 43-51.
10. Buico A., Cassino C., Ravera M. et al. Oxidative stress and total antioxidant capacity in human plasma // *Redox. Rep.* – 2009. – Vol. 14. – P. 125-131.
11. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. СПб. – 2000. – 103 с.
12. Ройтман Е.В., Давыдкин И.Л., Колесникова И.М. и соавт. Особенности реологических свойств крови у пациентов с истинной полицитемией // *Тромбоз, гемостаз и реология.* – 2015. – №3. – С. 8-19.
13. Coucelo M., Caetano G., Sevivas T. et al. JAK2V617F allele burden is associated with thrombotic mechanisms activation in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients // *Int. J. Hematol.* – 2014. – Vol. 99. – P. 32-40.
14. Barbui T., Finazzi G., Falanga A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis // *Blood.* – 2013. – Vol. 122. – P. 2176-2184.
15. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells // *Nucl. Acid. Res.* – 1988. – Vol. 16. – P. 1215-1218.
16. Poort S.R., Rosendaal F.R., Reitsma P.H. et al. A common genetic variation of the 3' untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis // *Blood.* – 1996. – Vol. 88. – P. 3698-3703.
17. Thomas A., Green F., Kelleher C. et al. Variation in the promoter region of the β fibrinogen gene is associated with plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers // *Thromb. Haemost.* – 1991. – Vol. 65. – P. 487-490.
18. Gandrille S., Alhenc-Gelas M. and Aiach M. A rapid screening method for the factor V Arg⁵⁰⁶→Gln mutation. // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* – 1995. – Vol.6. – P. 245-248.
19. Margaglione M., Grandone E., Cappucci G. et al. An alternative method for PAI-1 promoter polymorphism (4G/5G) typing // *Thromb. Haemost.* – 1997. – Vol. 77. – P. 605-606.

20. Bray P.F., Jin Y., Kickler T. Rapid genotyping of the five major platelet alloantigens by reverse dot-blot hybridization // Blood. – 1994. – Vol. 84. – P. 4361-4367.
21. Arruda V.R., von Zuben P.M., Chiaparini L.C. et al. The mutation Ala677→Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis // Thromb. Haemost. – 1997. – Vol.77. – P. 818-821.
22. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекиси липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. – 1988. – №11. – С. 41-43.
23. Ravin H., Harvard M. Rapid test for hepatolenticular degeneration // Lancet. – 1956. – Vol. 1. – P. 726-727.
24. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии. – 1990. – Т. 36, №2. – С. 88-91.
25. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарева В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – №1. – С. 16-48.
26. Trifa A.P., Cucuianu A., Popp R.A. et al. The relationship between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR mutations and the first major thrombotic episode in polycythemia vera and essential thrombocythemia // Ann. Hematol. – 2014. – Vol. 93. – P. 203-209.
27. Бессмельцев С.С., Федорова З.Д., Абдулкадыров К.М. Реологические свойства эритроцитов и система гемостаза у больных истинной полицитемией//Гематол. и трансфузиол. – 1989. – №11. – С.29-33.
28. Алексанян Л.Р., Рыбакова Л.П., Капустин С.И. Оценка окислительно-антиокислительной системы у лиц с ранним дебютом венозного тромбоза // Материалы VII Всероссийской конференции «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии», Москва. – 2015. – С. 27.