

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства
здравоохранения Российской Федерации



На правах рукописи

ПОЛЕТАЕВ Александр Владимирович

**КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА МУЛЬТИМЕРНОГО СОСТАВА ФАКТОРА
ВИЛЛЕБРАНДА У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ БОЛЕЗНИ
ВИЛЛЕБРАНДА**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

3.1.28. Гематология и переливание крови

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор физико-математических наук,

член-корреспондент РАН

Пантелеев Михаил Александрович

доктор медицинских наук, доцент

Жарков Павел Александрович

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Структура и функции фактора Виллебранда	10
1.2 Болезнь Виллебранда.....	15
1.3 Классификация болезни Виллебранда.....	16
1.4 Лабораторная диагностика болезни Виллебранда.....	20
1.4.1 Антиген фактора Виллебранда (vWF:Ag)	22
1.4.2 Активность фактора Виллебранда	23
1.4.3 Активность фактора VIII (FVIII:C).....	24
1.4.4 Коллаген-связывающая активность фактора Виллебранда (vWF:CB)	25
1.4.5 Агрегация тромбоцитов, индуцированная ристомицином.....	25
1.4.6 Фактор-VIII-связывающая активность фактора Виллебранда (vWF:FVIIIb).....	26
1.4.7 Мультимерный анализ	26
1.4.8 Генетические исследования.....	30
1.5 Установление диагноза болезнь Виллебранда	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	34
2.1 Пациенты.....	34
2.2 Критерии постановки диагноза.....	35
2.3 Методы обследования пациентов	35
2.4 Взятие образцов	37
2.5 Лабораторные исследования.....	37
2.6 Оценка пропускной способности геля	42
2.7 Количественная оценка мультимерных форм фактора Виллебранда.....	43
2.8 Статистическая обработка данных	44
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	46
3.1 Клинические проявления.....	46
3.2 Результаты лабораторных исследований.....	56
3.3 Результаты оценки пропускной способности геля.....	61

3.4 Результаты количественной оценки мультимеров vWF пациентов с различными типами БВ.....	63
3.5 Оценка взаимосвязи клинических проявлений с лабораторными данными.....	67
Глава 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	74
Глава 5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	84
5.1 Перспективы дальнейшего развития темы диссертации.....	86
ВЫВОДЫ.....	87
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	88
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	91
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	114

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Болезнь Виллебранда (БВ) является одним из наиболее часто встречающихся геморрагических заболеваний в мире [32; 136]. Частота встречаемости клинически значимых форм БВ в популяции составляет не менее 0,01% [103; 136]. Заболевание связано с количественным или качественными нарушениями в молекуле фактора Виллебранда (vWF), который представляет собой сложную белковую молекулу с множеством функций, основное действие которой направлено на образование первичного тромбоцитарного сгустка и предотвращение кровопотери [103; 189]. Наибольший вклад в выполнении этой функции вносят высокомолекулярные изоформы vWF [32]. Диагностика БВ основана на анализе клинической картины заболевания, семейного анамнеза и выполнении лабораторных исследований – определении антигена vWF (vWF:Ag), ристомицин-кофакторной активности (vWF:RCo), фактора свертывания крови VIII (FVIII:C) [139; 189; 178]. Основным инструментом оценки клинической картины является применение специализированных опросников (PBQ, ISTH BAT), однако они имеют определенные ограничения, связанные с чувствительностью и специфичностью. При оптимальном соотношении данных параметров, пороговый уровень составляет 4 балла. В то же время как у многих пациентов детского возраста, особенно раннего, могут отсутствовать клинические проявления [4]. У взрослых пациентов полученные данные основных лабораторных методов оценки vWF (vWF:Ag, vWF:RCo, FVIII:C) демонстрируют хорошую корреляцию с клинической картиной [56; 163]. Для педиатрической популяции подобные исследования существуют в ограниченном количестве, в большинстве случаев отмечается значительная вариабельность клинических проявлений [9; 30; 46]. Некоторым пациентам, для установления типов БВ, необходимо выполнение дополнительных исследований, таких как коллаген-связывающая способность (vWF:CB), FVIII-связывающая способность vWF (vWF:FVIIIb), которые ввиду гетерогенности получаемых результатов, не всегда способны помочь в точном типировании болезни, что влечет за собой необходимость проведения следующего шага – определение мультимерного состава vWF. Мультимерный анализ (МА) vWF,

позволяющий визуализировать распределение молекул vWF в зависимости от размера, оказался крайне ценным тестом в диагностике БВ: из 480 пациентов в 17,3% случаев МА играл ключевую роль в типировании, в 76% случаев был полезен в диагностике и лишь в 6,7% случаев не являлся информативным. Так же было показано, что диагностическая информативность МА в диагностический процесс гораздо выше, чем у vWF:CB [137]. Однако, данный тест доступен в очень малом количестве лабораторий, поскольку он технически сложен, трудоемок, отнимает большое количество времени (2-5 дней) и не стандартизован. На данный момент доступна коммерческая методика для визуализации мультимеров vWF компании “Sebia” (Франция), позволяющая в автоматизированном режиме оценить распределения мультимерных форм vWF [63; 129]. Однако методика является качественной, позволяя лишь визуально определить распределение мультимеров vWF, что усложняет объективную оценку мультимерного профиля пациента, и, как следствие, не позволяет провести четкой корреляции между степенью нарушения мультимерного состава и другими клинико-лабораторными показателями. Поэтому, поиск новых методик оценки мультимерного состава vWF у пациентов с БВ является актуальной задачей.

Степень разработанности темы

Выраженность геморрагических проявлений значительно варьирует при различных типах БВ от полного отсутствия кровоточивости до жизнеугрожающих, требующих медикаментозной коррекции кровотечений. В отличие от гемофилии, для которой характерна четкая зависимость между активностью FVIII и степенью тяжести заболевания, в настоящее время для БВ отсутствует методика, позволяющая оценить степень тяжести и спрогнозировать тяжесть геморрагических проявлений. Одним из новых диагностических направлений является изучение мультимерного профиля vWF с определением количества мультимерных групп. На данный момент существует ограниченное количество работ, посвященных количественной оценке мультимеров vWF, которая проводилась лишь с целью определения мультимерного профиля как дополнительного инструмента в диагностике БВ, а также для поиска новых нарушений со стороны молекулы vWF, без учета взаимосвязи с клиническими

проявлениями геморрагического синдрома. Для количественной оценки методика мультимерного анализа нуждается в усовершенствовании - оценке пропускной способности геля и разработке алгоритма, позволяющего анализировать готовые гели и получать количественное распределение мультимеров vWF.

Цель исследования

Выявление клинико-лабораторных особенностей течения БВ у детей с применением алгоритма количественной оценки мультимерного профиля vWF

Задачи исследования

1. Проведение анализа анамнестических особенностей и тяжести клинических проявлений у детей с БВ.
2. Разработка алгоритма количественной оценки молекулярных форм vWF.
3. Оценка мультимерного профиля у детей с различными типами БВ.
4. Проведение анализа зависимости между выраженностью клинических проявлений и результатами лабораторных исследований у детей с БВ.

Новизна исследования

Впервые в РФ разработан алгоритм количественной оценки мультимерного состава vWF у детей с применением методики оценки пропускной способности геля, что позволило объективно охарактеризовать распределение различных изоформ vWF на основании их молекулярной массы

Впервые в мире на основании проведенного анализа установлено, что изменение мультимерного состава и активности vWF не может служить критерием оценки степени тяжести заболевания у детей с типами 1 и 2 БВ.

Данная работа демонстрирует гетерогенность клинических проявлений БВ у детей, отсутствие взаимосвязи между тяжестью клинических проявлений и лабораторными исследованиями.

Практическая значимость

В ходе исследования установлены границы распределения различных мультимерных форм на геле, установлены референсные интервалы. Алгоритм количественной оценки мультимерного состава vWF позволил с большей точностью оценить мультимерный состав при различных формах БВ.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Дети с БВ имеют полиморфные проявления геморрагического синдрома, большинство из которых носит нетяжелый характер.
2. Границы разделения мультимерных форм vWF на исследованном геле, представленные производителем, не соответствуют разделению мультимеров vWF по молекулярной массе.
3. Наибольшей диагностической ценностью для лабораторной диагностики БВ у детей обладает исследование активности vWF.

Методология и методы исследования

Характеристика исследования: ретроспективное, моноцентровое, выполненное на госпитальной выборке больных.

Исследование состояло из 2 этапов – первый этап клинический, основанный на анализе данных обследования пациентов, обращавшихся в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России в рамках консультативной помощи, в 2017–2022 гг., а именно:

- сбор и анализ клинических данных, анамнестических особенностей, проведение комплексного лабораторного обследования, постановка диагноза и исключение других нарушений свертывающей системы;
- оценка кровоточивости с использованием педиатрического опросника.

Второй этап - лабораторный, включал в себя оценку пропускной способности геля с помощью молекулярных меток и разработку алгоритма количественной оценки мультимерного состава vWF, анализ результатов исследования мультимерного профиля с использованием разработанного алгоритма, анализировались различные группы пациентов в зависимости от установленного

типа БВ и изменений результатов лабораторных исследований (vWF:Ag, vWF:RCo, vWF:CB, MA).

Исследование не требовало дополнительного взятия биологического материала и/или визита пациента в Центр и было проведено с использованием заготовленного в рамках рутинной клинико-лабораторной практики биологического материала.

Степень достоверности

Степень достоверности результатов диссертации подтверждается большой выборкой – были проанализированы данные 666 пациентов детского возраста, обратившихся в консультативное отделение с жалобами на кровоточивость или изменения в лабораторных анализах, из которых диагноз БВ был установлен у 24 детей, а также 46 пациентов с ранее установленным на базе ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России диагнозом БВ, корректно разработанным статистическим планом исследования и примененными методами медицинской статистики.

Апробация результатов

Апробация диссертации проведена на совместном заседании экспертных комиссий по лабораторной диагностике, клеточным технологиям и фундаментальным исследованиям, и гематологии, иммунологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, протокол №2 от 27.02.2025 г.

Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на следующих конференциях: VII Конгресс гематологов России (Москва, 10-12 апреля 2024), IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием по физиологии и патологии системы гемостаза «Баркагановские чтения» (Барнаул, 26-28 мая 2023), Всероссийский конгресс с международным участием «Инновации в детской гематологии, онкологии и иммунологии: от науки к практике» (Москва, 1-3 июня 2023), ISTH 2022 (Лондон, онлайн, июль 2022 г.), II объединенный конгресс НОДГО и РОДО «Актуальные

проблемы и перспективы развития детской онкологии и гематологии в Российской Федерации – 2021» (Москва, декабрь 2021).

Участие автора в получении результатов исследования

Автор участвовал в планировании данной работы, постановке цели и задач исследования, самостоятельно проводил анализ клинического материала и проводил лабораторные исследования пациентов, самостоятельно анализировал полученные данные, готовил в соавторстве публикации и доклады по теме диссертации.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 работ, из них 6 статей в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных журналов, рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией (ВАК) при Минобрнауки России.

Внедрение результатов диссертации

Основные результаты исследования используются в клинической работе лаборатории клинического гемостаза ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, в учебном процессе при подготовке ординаторов и курсантов на кафедрах гематологии, клеточных технологий и трансфузиологии и клинической лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 117 страницах машинописного текста, иллюстрирована 8 таблицами и 25 рисунками. Диссертационная работа состоит из 5 глав. Первая глава содержит введение, обзор литературы по теме диссертации, вторая глава содержит информацию о материалах и методах исследования, в третьей главе приведены результаты, в четвертой – обсуждение, в пятой - заключение, выводы и практические рекомендации. Список использованной литературы включает 186 источников иностранных и 6 отечественных авторов. Приложение А содержит текст опросника RBQ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Структура и функции фактора Виллебранда

Фактор Виллебранда (vWF) является мультимерным гликопротеином плазмы крови, играющим важнейшую роль в процессах остановки кровотечения. vWF принимает участие в инициации механизмов адгезии тромбоцитов в месте повреждения эндотелиальной выстилки сосуда, а также связывается с субэндотелиальными структурами, обнажающимися при нарушении целостности эндотелия. Другая важнейшая роль vWF – перенос фактора свертывания крови VIII (FVIII) и защита последнего от протеолитической активности протеина С. Нарушение функциональных свойств молекулы vWF или снижение количества приводит к развитию наследственной коагулопатии - болезни Виллебранда (БВ) Ген, кодирующий vWF, состоит из 52 экзонов и локализуется на коротком плече 12 хромосомы (12q13.31) [87]. Большая протяженность гена обуславливает многообразие нарушений функций молекулы vWF. Наличие псевдогена *VWF*, локализованного на длинном плече 22 хромосомы, имеющего гомологию с основным геном 97% и повторяющего экзоны 23-34, усложняет генетическую диагностику БВ [90; 158]. Описаны случаи генной конверсии между псевдогеном и геном *VWF*, когда псевдоген может быть источником различных мутаций, часть из которых является патогенной [48; 83]. Большое количество патогенных вариантов гена *VWF* содержится в международных базах данных, таких как LOVD3, HGMD, NCBI Clin Var, где, в том числе, интерпретированы патогенности этих вариантов.

VWF преимущественно экспрессируется эндотелиальными клетками а также мегакариоцитами, с последующим хранением в α -гранулах тромбоцитов [122]. Тромбоцитарный vWF представлен сверхгигантскими формами мультимеров vWF, и благодаря характеру гликозилирования, он менее подвержен протеолизу, в отличие от эндотелиального vWF [13; 27]. vWF имеет доменную структуру и состоит из D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1- C2-C3-C4-C5-C6-CK доменов, причем домены D1-D2 представляют пропептид, а остаточная пептидная цепь - зрелый vWF [147]. Предшественник молекулы (пре-пропептид, или пре-про-vWF) состоит

из 2813 аминокислотных остатков (АМК), формирующих три субъединицы: сигнальный пептид 1 - 22АМК, пропептид (23 - 363 АМК) и большую субъединицу (764-2813 АМК) [78; 140]. Пре-про-VWF транспортируется в эндоплазматический ретикулум, отщепляется сигнальный пептид, образуя мономеры про-vWF, которые соединяются друг с другом С-концевыми доменами с участием цистеиновых узлов (СК, cysteine knot) с помощью межмолекулярных дисульфидных связей (димеризация от “хвоста” к “хвосту”) [92]. Таким образом образуется устойчивая димерная структура, отличающаяся достаточной стабильностью, и является основной структурной единицей мультимерной формы vWF [147]. В дальнейшем, димеры транспортируются в аппарат Гольджи, где после сульфатирования и гликозилирования димеров про-vWF и отщепления пропептида, между N-концевыми областями димеров возникают дисульфидные мостики, образуя мультимеры vWF. Последние упаковываются в тельца Вейбеля – Палладе, которые соединяются с актиновым цитоскелетом клетки посредством белкового комплекса, состоящего из белка Rab27a, связывающего белка и миозина-Va [117]. Помимо vWF, тельца содержат множество других белков: Р-селектин, интерлейкин-8, ангиопоэтин-2 и фактор свертывания VIII (FVIII). Тельца Вейбеля – Паладе непрерывно выделяют vWF в кровоток и субэндотелиальное пространство [18; 24]. При необходимости, когда происходит активация эндотелия, пулы хранения способны высвободить огромное количество vWF, поддерживая адгезию тромбоцитов в месте повреждения сосудистой стенки [5]. Помимо эндотелиальных клеток, vWF накапливается в α -гранулах мегакариоцитов и субэндотелиальной соединительной ткани [122].

Мономер vWF (субъединица) представляет собой белок, состоящий из 2050 аминокислотных остатков [140]. В плазме крови vWF циркулирует в виде молекул различной молекулярной массы: димеры имеют массу около 500 кДа, низкомолекулярные формы – от 500 до 2500 кДа, средномолекулярные формы мультимеров – от 3000 до 5000 кДа, высокомолекулярные – от 5500 до 10 000 кДа, и сверхвысокомолекулярные свыше 20 000 кДа. Последние встречаются у новорожденных детей, включают в себя более 40 мономерных субъединиц, и составляют в длину более 2 мкм [74; 157; 160]. Мультимеры vWF состоят из

идентичных мономерных субъединиц, каждая из которых имеет молекулярную массу около 250 кД. Мономер vWF содержит несколько активных доменов, каждый из которых выполняет одну или более функций. Домен A1 взаимодействует с тромбоцитарным рецептором гликопротеином GPIb (Gp1B-V-IX) [47; 159], отвечает за связывание молекулы vWF с ристомицином, который используется в лабораторной диагностике для активации vWF, имитируя напряжение сдвига, вызванное потоком [135]. Также домен A1 осуществляет связывание с коллагенами IV и VI типов [96; 125]. В домене A2, в положении Tyr1605-Met1606 протеолитический фермент ADAMTS13 (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13) относящийся к классу металлопротеиназ, осуществляет расщепление высокомолекулярных форм мультимеров vWF после разворачивания молекулы [108].

Домен A3 содержит сайт связывания с коллагеном на своей поверхности, позволяя связывать фибриллярный (I типа) и тройной спиральный (III типа) коллаген [95]. Структурное сходство между доменами A1 и A3, а также похожие формы и положения сайтов связывания для GpIba и коллагена позволяют предположить, что оба домена могут связывать коллаген в гомологичных положениях [156]. Домен A1 способен связывать коллагены IV и VI типов, нарушения связывания которых встречаются при 1 типе и чаще при 2M типе БВ, однако вклад нарушений связывания коллагена IV и VI в степень тяжести развития клинических проявлений плохо изучен, необходимы дополнительные исследования [53].

Домен D'D3 связывает FVIII, тем самым осуществляя доставку FVIII в зону повреждения [155]. Домен C1 связывает рецептор тромбоцитов α IIb β 3, который отвечает за связывание vWF и фибриногена после активации тромбоцита для стабилизации тромбоцитарной пробки [153]. Терминальный C домен содержит «цистеиновый узел», ответственный за димеризацию мономеров vWF [92; 106].

Важную роль в регуляции мультимерного профиля vWF играет фермент ADAMTS13. При секреции в кровотоки крупных форм мультимеров vWF, фермент ADAMTS13 расщепляет высокомолекулярный vWF, снижая адгезивную функцию последнего [26]. Воздействие высокого напряжения сдвига переводит

глобулярную форму vWF в нитевидную, открывая для взаимодействия важнейший сайты связывания vWF. Этот процесс имеет важнейшее значение для выполнения гемостатических функций vWF, таких как адгезия к коллагену, связывание с тромбоцитами и регулирование размера молекул vWF ферментом ADAMTS13. Также как адгезия к субэндотелиальному коллагену, взаимодействие vWF происходит в области C – концевой части белка, что позволяет уже прикрепленным молекулам связывать новые нити vWF [57]. В развернутом состоянии происходит окисление метионина в доменах А, что приводит к более эффективному связыванию тромбоцитов и повышения устойчивости к протеолитическому воздействию ADAMTS13 [11]. Также описано влияние силы сдвига на клиренс vWF через изменение конформации молекулы vWF в лиганд для рецепторов макрофагов. Такие изменения позволяют макрофагам связывать большее количество vWF для последующей элиминации [107]. Удаление из кровотока молекул vWF происходит с одинаковой эффективностью в печени и в селезенке [22; 104]. Происходит этот процесс при помощи нескольких видов рецепторов: рецептор, связанный с белком-1 липопротеидов низкой плотности (LRP1-рецептор) макрофагов, который связывается с развернутой формой vWF, лектиновый домен С-типа 4 (CLEC4M) на эндотелиальных клетках печени и селезенки, Ig-подобный лектин 5, связывающий сиаловую кислоту (Siglec-5) на макрофагах, связывающий сиаловую кислоту и ASGPR – рецептор (asialoglycoprotein receptor, или рецептор Эшвелла-Морелла) [69; 107; 152; 168]. Поскольку vWF достаточно сильно сиалирован, данный путь элиминации возможен только при десиализации молекулы vWF, при которой раскрывается терминальный остаток галактозы, позволяя эффективно взаимодействовать с ASGPR – рецептором [49].

vWF играет важнейшую роль в осуществлении первичного гемостаза, способствуя адгезии тромбоцитов к месту повреждения сосудистой стенки. Происходит взаимодействие специфического локуса домена А1 vWF и тромбоцитарного рецептора Gp1b (GPIb-V-IX) [143; 188]. Для осуществления связывания домена А1 vWF с GPIba требуется конформационные изменения связанного с коллагеном vWF под воздействием высоких скоростей сдвига, [19;

151; 167]. vWF является лигандом для другого важнейшего тромбоцитарного рецептора – GpIIb/IIIa, что способствует агрегации тромбоцитов. При связывании тромбоцита с vWF и субэндотелиальными структурами, происходят конформационные изменения цитоскелета тромбоцитов с последующей активацией. Активированные тромбоциты меняют форму с дискоидной на амёбовидную, образуются отростки и экспонируется фосфатидилсерин (ФС) для осуществления сборки комплексов факторов на своей поверхности [31]. Также происходит высвобождение содержимого альфа и плотных гранул, приводящие к усилению активации тромбоцитов. Конформационные перестройки и активация GpIIb/IIIa способствует связыванию тромбоцитов с фибриногеном и vWF, формируются тромбоцитарные агрегаты [154].

Еще одной важнейшей функцией vWF является защита от протеолитической деградации FVIII, а также перенос последнего к месту повреждения для усиления плазменного свертывания [166]. FVIII необходим для ускорения каскада биохимических реакций процессов плазменного свертывания в месте повреждения целостности сосудистой стенки. Связывание FVIII с vWF происходит в участке домена D'D3, который способен взаимодействовать с одной молекулой FVIII. Стабилизирующая роль vWF наиболее очевидна у пациентов с БВ при глубоком дефиците vWF. Молекулярное соотношение мономера FVIII к vWF в плазме крови человека составляет примерно 1:50 [162]. В отсутствие vWF, период полураспада FVIII очень короткий и составляет примерно 1-2 ч, в то время как в нормальном состоянии период полувыведения FVIII достигает, в среднем, 12 ч [113]. Взаимодействие FVIII с плазматическим vWF происходит в венах лимфатических сосудов [122], тогда как в α -гранулах тромбоцитов FVIII хранится совместно с vWF [68].

В последние годы активно изучается роль vWF в процессах системного воспаления, развития инфекции, тромбообразовании. Помимо фиксации тромбоцитов, развернутые формы vWF способны прикреплять к своей поверхности различные микрочастицы, а также другие форменные элементы крови, в частности лейкоциты [128]. Еще одной ключевой особенностью vWF является способность активировать комплемент по альтернативному пути,

который приводит к образованию мембрано-атакующего комплекса (МАК), способного повреждать интактный эндотелий и усугублять тяжесть пациентов в критическом состоянии [52].

Таким образом, сложность молекулы vWF , разнообразие выполняемых функций определяет клиническую гетерогенность различных форм заболеваний, связанных с количественным или функциональным нарушением vWF .

1.2. Болезнь Виллебранда

Болезнь Виллебранда представляет собой наследственное нарушение свертывающей системы крови, которое обусловлено количественным или качественным нарушением молекулы vWF . Заболевание впервые было описано финским ученым Эрихом Фон Виллебрандом в 1926 году. Исследуя случай кровоточивости у девочки 5 лет из семьи на Алландских островах, которая была 9 ребенком из 12 детей, четверо из которых умерли в возрасте до 4 лет от кровотечений. Изучив семейный анамнез и клиническую картину пациентки, врач назвал заболевание «псевдогемофилия». От классической гемофилии болезнь отличалась наличием клинических проявлений как у мужчин, так и у женщин, преобладанием кожно-слизистых геморрагических проявлений и почти полным отсутствием кровоизлияний в суставы [120]. Всего были изучены клинические проявления заболевания у 66 членов семьи, почти половина из которых имели клинические проявления кровоточивости.

vWF был открыт только в 1971 г. Теодором Циммерманом, спустя почти 50 лет от первого описания болезни [191]. В 1985 г. была получена кодирующая последовательность гена vWF , в 1994 г. Sadler J.E. и соавторы впервые опубликовали классификацию болезни Виллебранда, которая впоследствии была несколько раз дополнена и обновлена, последние рекомендации международного общества по тромбозу и гемостазу (International Society on Thrombosis and Haemostasis — ISTH) опубликованы в 2021 году [45]. Частота встречаемости БВ в популяции по данным различных исследователей варьирует от 0,6 до 1,3%, некоторые исследователи указывают распространенность до 2%, однако истинная распространенность БВ точно не известна [32; 136]. Это связано с большой

вариабельностью концентрации vWF, изменении его уровня при различных воспалительных процессах, стрессе, беременности и т.д. [20; 58]. Пациенты с клиническими проявлениями кровоточивости встречаются гораздо реже, и составляют от 23 до 100 на один миллион населения [32; 93].

Основная сложность в постановке диагноза БВ у детей связана с отсутствием четкой зависимости между активностью vWF и степенью тяжести заболевания, как, например, при гемофилиях [1]. Широкая вариабельность результатов лабораторных исследований у одного индивидуума в разный промежуток времени, даже при нормальных значениях количественных и качественных тестов, оценивающих vWF, не всегда позволяет исключить БВ при наличии симптомов кровоточивости [141].

1.3 Классификация болезни Вилебранда

Впервые классификация БВ была опубликована в 1994 г. Sadler J.E. и соавторами [139]. Основываясь на актуальных научных данных, последняя версия была представлена в 2021 г. комитетом по науке и стандартизации (Scientific and Standardization Committee — SSC) ISTH [45].

1-й тип заболевания обусловлен снижением количества vWF, при сохранении функциональных свойств, то есть активность фактора будет снижена пропорционально количеству. Существует четыре основных механизма возникновения 1 типа БВ: 1) снижение секреции vWF вследствие нарушенной экспрессии гена *vWF* [178]; 2) нарушение внутриклеточного транспорта молекул vWF [78, 79]; 3) ускоренная элиминация vWF из кровеносного русла (тип 1C “Vicenza”), при котором наблюдается присутствие сверхкрупных мультимеров vWF [183], 4) повышенная восприимчивость vWF к протеолитическому расщеплению, вызванная мутацией p.Tyr1584Cys, что приводит к снижению антигена и активности vWF [14; 17; 29].

Частота типа 1 составляет 75—80% от всех случаев заболевания. Наследование носит аутосомно-доминантный тип с высокой вариабельностью пенетрантности патологического гена [32].

2-й тип — качественные изменения vWF, при которых снижается vWF-зависимая адгезия тромбоцитов или связывание FVIII и включают в себя 4 типа: 2A, 2B, 2M, 2N. Диагностика БВ типа 2 является наиболее сложной задачей, вследствие гетерогенности функциональных и структурных дефектов. Частота данных форм составляет 20-25% [74].

БВ типа 2А является результатом нарушений двух различных патогенетических механизмов: нарушения сборки высокомолекулярных мультимеров и повышения протеолиза vWF. Определяется изолированный дефицит высокомолекулярных мультимеров vWF и сниженная vWF-зависимая адгезия тромбоцитов. Наследование 2А типа обычно аутосомно доминантное, однако некоторые варианты могут быть аутосомно рецессивными. Нарушение образования крупных форм мультимеров приводит к секреции небольших молекул vWF, которые слабо связываются с тромбоцитами и субэндотелиальным коллагеном и практически не подвергаются протеолизу [161]. Дефекты сборки могут быть вызваны аминокислотными заменами в пропептиде vWF, которые нарушают процесс мультимеризации в аппарате Гольджи. Эти замены приводят к отсутствию дополнительных полос на электрофореграмме, такой фенотип обозначается как IIС тип [41; 82; 91]. Нарушение сборки также могут быть вызваны заменами в С-концевом домене СК, которые нарушают процесс димеризации в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). В дальнейшем, мутантные мономеры vWF встраиваясь в растущий мультимер в аппарате Гольджи, прекращает его элонгацию. В результате секретируются небольшие мультимерные формы vWF наряду с нормальными молекулами. Данный фенотип обозначается как IID тип [37; 54]. Также причиной нарушения сборки vWF могут быть замены в D3 домене, которые приводят к нарушению образования дисульфидных связей между димерами в аппарате Гольджи. Это приводит к размытию мультимерной структуры, такой фенотип обозначается как IIE [144; 161].

В D3 домене миссенс-варианты в гетерозиготном состоянии, в некоторых случаях, не вызывают нарушений образования дисульфидных связей. В результате чего образуются мультимеры vWF небольших размеров, с четким разделением структуры, как и при дефектах пропептида, но с более высокой концентрацией vWF

в плазме. Этот фенотип обозначается как тип ПС Miami [118]. Повышенный протеолиз с помощью ADAMTS13 является еще одной причиной, вызывающий 2А тип БВ, и именуется как ПА. Замены, вызывающие данный подтип, локализируются вблизи домена А2, нарушая сворачивание данного домена и делая его доступным для расщепления ADAMTS13 без высокого напряжения сдвига. [94; 111]. В клинической практике разделение 2А типа БВ на варианты в зависимости от механизма не используется, поскольку клиническая значимость такого разделения не показана [178].

БВ типа 2В включает различные варианты качественного дефекта vWF, выражающиеся в его повышенном связывании с тромбоцитарным рецептором GPIb [88]. Этот тип характеризуется наличием ответа на низкие дозы ристомидина, часто может сопровождаться изолированной тромбоцитопенией, которая может усугубляться при стрессе или после использования десмопрессина [126]. Также для данного типа характерно снижение доли циркулирующих высокомолекулярных форм мультимеров и повышение протеолиза vWF [88; 161]. Гетерозиготные мутации в тромбоцитарном рецепторе Gp1ba приводят к фенотипу, сходному по проявлениям с 2В типом БВ. Такой вариант получил название тромбоцитарного типа БВ [109; 116; 131]. БВ 2В типа является самым варибельным подтипом по клинико-лабораторной картине. Кардинально отличаются не только пациенты между собой, но и лабораторные показатели одного и того же пациента могут сильно варьировать с течением времени, что обуславливает сложность диагностики 2В типа БВ, и необходимость повторных исследований. Marten S. и соавт. наглядно продемонстрировали три клинических случая пациентов с 2В типом БВ, в двух из которых пациентам без проведения генетического исследования был бы установлен неверный подтип БВ, а у 3 пациента БВ вообще могла быть исключена [8].

Тип 2М включает различные варианты качественного дефекта vWF в доменах А1 и А3, характеризующиеся снижением vWF-зависимой адгезии тромбоцитов и/или дефектах связывания vWF с коллагеном. При данном типе отсутствует изолированный дефицит высокомолекулярных мультимеров vWF [142; 178]. Функциональный дефект обусловлен мутациями внутри домена А1, в

результате которых происходит нарушение связывания vWF с тромбоцитами и субэндотелием. Нарушение связывания с тромбоцитами приводит к снижению доступности мультимеров vWF для расщепления металлопротеиназой ADAMTS13, в связи с этим распределение мультимеров vWF по молекулярной массе сохраняется без изменений после их секреции эндотелиальными клетками, со сдвигом в сторону высокомолекулярных форм мультимеров, как при 1С типе БВ [89]. Также возможны варианты 2М типа БВ с мутациями в домене А3, который отвечает за связывание vWF с субэндотелиальными коллагенами I и III типов [148].

БВ типа 2N характеризуется нормальным уровнем vWF и снижением активности FVIII. У пациентов имеется дефект vWF в месте связывания с FVIII, в результате чего образование комплекса vWF–FVIII затруднено или невозможно. Этот тип БВ вызывается гомозиготными или компаунд-гетерозиготными мутациями, которые обычно не выходят за пределы сайта связывания FVIII, находящийся между белками в положениях Ser764 и Arg1035, и охватывает домен D' и часть домена D3 [86; 177]. Данный вариант БВ подтверждают с помощью теста связывания vWF с FVIII [119]. Довольно часто у пациентов с 2N вариантом БВ, по результатам активности FVIII, диагностируют гемофилию А легкой или умеренной степени тяжести (активность FVIII составляет 5–22%). Особенно часто это происходит у лиц мужского пола, у которых нет убедительных доказательств X-сцепленного наследования [134]. Когда для лечения гемофилии А стали применять рекомбинантные и высоко пурифицированные концентраты FVIII, не содержащие или содержащие очень небольшое количество vWF, возникла необходимость проведения дифференциальной диагностики. У пациентов с БВ типа 2N при введении высокоочищенных концентратов FVIII наблюдается повышение активности FVIII до нормальных значений, однако время полужизни FVIII очень мало. Среди всех случаев БВ, частота случаев 2N типа варьирует от 1% до 10% [40; 97; 179; 192]. Распространенность 2N среди всех случаев 2 типа БВ составляет от 10,6% до 13% [73; 176]. Фенотипически, 2 N тип БВ сходен с гемофилией А легкой и средней степени тяжести. Клинические проявления зависят от активности FVIII в плазме, которая может варьировать от 5 до 40 МЕ/дл. [177].

3-й тип — наиболее редкая (менее 5%) и тяжелая форма БВ, для которой

характерен глубокий дефицит vWF как в плазме, так и в клеточных структурах (тромбоциты, клетки эндотелия сосудистой стенки) [60]. При таком типе БВ у пациентов отмечается практически полное отсутствие vWF ($vWF:Ag < 5\%$), наследование — аутосомно-рецессивное. У гетерозиготных носителей возможны легкие симптомы кровоточивости [59; 84]. Дифференциальную диагностику тяжелого течения типа 1 и 3 БВ можно провести по лабораторным результатам и клиническому ответу на десмопрессин. Так, при типе 1, количество и активность vWF редко достигают снижения менее 10% и наблюдается положительный ответ на введение десмопрессина. При типе 3 БВ, уровни vWF обычно не превышают 5% и применение десмопрессина не дает увеличения содержания vWF в плазме [178].

Приобретенная БВ встречается у пациентов с различными аутоиммунными, миело-, лимфопролиферативными заболеваниями и при сосудистых патологиях. Приобретенная БВ не наследуется. Синтез vWF не нарушен, однако быстро покидает сосудистое русло вследствие различных патологических механизмов (повышенный протеолиз, наличие специфических антител, циркулирующих иммуноглобулинов и др.) [76].

1.4 Лабораторная диагностика болезни Виллебранда

Лабораторная диагностика БВ представляет собой сложный процесс, так как основана на достаточно большом количестве исследований, и включает в себя несколько этапов диагностики. Первый этап является скрининговым, с обязательным выполнением анализа крови с подсчетом количества тромбоцитов, коагулологических исследований - активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), протромбинового времени (ПВ), содержание фибриногена. Данные исследования необходимы, в том числе, и для исключения других нозологий с нарушением свертывания, таких как тромбоцитопатии, гемофилии, другие редкие дефициты факторов свертывания [2]. Также на этом этапе осуществляется первичная качественная и количественная оценка vWF – оценка антигена vWF ($vWF:Ag$), активности vWF ($vWF:RCo$) и активности FVIII:C (FVIII:C). Использование аналитического отношения активности vWF и FVIII к антигену vWF, позволяет выявить качественные

нарушения молекулы vWF, для подтверждения которых используются лабораторные исследования второго уровня - коллаген-связывающая активность vWF (vWF:CB), агрегация тромбоцитов, индуцированная ристомидином (RIPA), а также агрегация с низкой дозой ристомидина (LDRIPA), фактор VIII-связывающая активность vWF (vWF:FVIII), мультимерный анализ, генетическое тестирование [74].

Диагностический алгоритм болезни Виллебранда международного общества по тромбозу и гемостазу (ISTH) представлен на Рисунке 1.

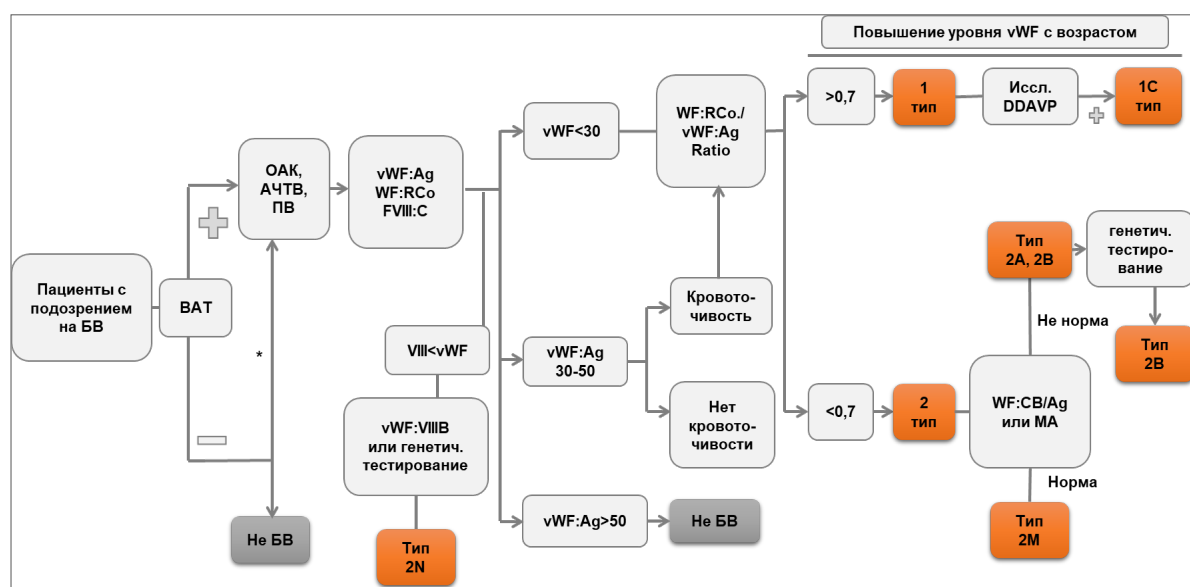


Рисунок 1 – Алгоритм диагностики БВ (адаптировано по [45]): ОАК – общий анализ крови; BAT – опросник кровоточивости, Bleeding Assessement Tool; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, ПВ – протромбиновое время; БВ – болезнь Виллебранда, vWF:Ag – антиген vWF; vWF:RCo – ристомидин кофакторная активность vWF; FVIII – определение активности фактора VIII; vWF:FVIII – фактор-VIII связывающая активность vWF; vWF:CB – коллаген-связывающая активность vWF; МА – мультимерный анализ; DDAVP – десмопрессин

Диагностика БВ начинается с оценки клинической картины пациента с использованием специализированных опросников. При достижении порогового значения балла кровоточивости, пациент направляется на лабораторные исследования. На первом уровне диагностики оценивают общий анализ крови

(ОАК) с обязательным подсчетом числа тромбоцитов, скрининговую коагулограмму (АЧТВ, ПВ, ПТИ по Квику, концентрацию фибриногена), vWF:Ag, vWF:RC₀ и активность FVIII. В случае выявления снижения активности FVIII по отношению к vWF:Ag, рекомендовано исключить 2N тип БВ. В зависимости от полученного результата исследования vWF:Ag, БВ либо исключается, либо продолжается диагностический поиск с установлением вариантов типов 2 или 1 БВ [45].

1.4.1 Антиген фактора Виллебранда (vWF:Ag)

vWF:Ag - это количественная оценка содержания белка vWF в плазме. Оценка содержания vWF:Ag может быть выполнена с помощью иммуноферментного анализа ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) или автоматизированного латексного иммуноанализа (LIA - latex immunoturbidimetric assay) на коагулометре. ELISA методика определения vWF:Ag очень надежна и воспроизводима, позволяет оценить даже очень низкую концентрацию фактора [133]. С другой стороны, методика ELISA требует достаточно много времени для выполнения и фармакоэкономически невыгодна при небольшом потоке пациентов, ввиду необходимости построения калибровочной кривой при каждой постановке. Поэтому наибольшего распространения получили LIA методики, позволяющие в течение короткого промежутка времени получить результаты, сопоставимые с результатами ELISA методик, лишь незначительно уступая в точности определения низких концентраций белка [65; 67]. Ввиду отсутствия зависимости тяжести заболевания от содержания vWF в плазме, недостаток определения крайне низких уровней не является столь критичным в рутинной диагностической практике. Большим плюсом LIA методик является то, что наборы поставляются в готовом к работе виде, не требуя предварительного разведения и стабилизации. Количественная оценка vWF позволяет установить типы 1 и 3 БВ, но не способна в полной мере диагностировать типы 2 БВ [45].

1.4.2 Активность фактора Виллебранда

Активность vWF позволяет оценить ключевую функцию vWF – связывание с тромбоцитами. Классическая ристомицин-кофакторная активность vWF (vWF:RCo) является традиционно используемым тестом для оценки способности vWF связывать GPIb тромбоцитов. Долгое время данная методика представлялась как золотой стандарт для оценки функции vWF. Анализ vWF:RCo широко используется, однако имеет значительные ограничения - высокий коэффициент внутрилабораторной и межлабораторной вариации (CV) вследствие использования тромбоцитов [100; 184]. Кроме того, нижний предел определения составляет примерно 10 МЕ/дл, что сильно затрудняет точную идентификацию тяжелого типа 1 и типа 3 БВ [72]. Еще одна проблема связана с тем, что полиморфизмы в домене A1 vWF (в частности D1472H) могут значительно ослаблять связывание vWF с ристомицином [50]. Это приводит к значительному снижению vWF:RCo *in vitro*, по сравнению с реальным уровнем функциональной активности vWF *in vivo*. Следовательно, пациенты, имеющие D1472H, могли быть неверно диагностированы на основании снижения активности vWF:RCo. Учитывать присутствие полиморфизмов, влияющих на связывание ристомицина с vWF крайне важно, вследствие довольно широкого распространения в популяции [50]. Для снижения вариабельности результатов и возможности оценки функции A1 домена vWF без использования тромбоцитов, были разработаны и внедрены в клиническую практику новые методики на основе LIA - vWF:GpIbR и vWF:GpIbM [34; 39; 80; 127]. Тест vWF:GpIbR включает в себя использование рекомбинантного фрагмента рецептора GPIb, нанесенного на латексные частицы помощью специфических моноклональных антител. В присутствии ристомицина vWF меняет конформацию с глобулярной на нитевидную, открывая домен A1 для взаимодействия. Степень агглютинации прямо пропорциональна активности vWF в образце и оценивается по уменьшению светопропускания в процессе образования агрегатов. Однако, для данной методики также необходим ристомицин, что влечет за собой получение заниженных результатов у испытуемых, имеющих ристомицин-связывающие полиморфизмы. Методика vWF:GpIbM включает в себя использование молекулы GPIba, который содержит ряд мутаций, ранее описанных

при тромбоцитарном типе БВ [35; 64; 123]. Наличие мутаций позволяет vWF связываться с мутантным фрагментом рецептора GPIIb без участия ристомидина. Также, появляющиеся исследования показывают более низкий коэффициент вариации (CV) и более низкие пределы определения по сравнению с vWF:RCo [123]. Варианты постановки теста vWF:RCo – от классических на стекле, до современных с использованием мутантного рекомбинантного GPIIb, не требующим присутствия ристомидина в исследуемом образце представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Методики оценки функции A1 домена с vWF

Тест	Исследуемая функция
1	2
vWF:RCo	Ристомидин-кофакторная активность: все тесты с использованием тромбоцитов и ристомидина (A1 домен)
vWF:GpIbR	Ристомидин-индуцированное связывание vWF и рекомбинантного фрагмента GpIb
vWF:GpIbM	Связывание vWF и мутантного фрагмента GpIb без ристомидина
vWF:Ab	Связывание моноклональных антител (mAb) с A1 доменом vWF

1.4.3 Активность фактора VIII (FVIII:C)

Определение активности фактора VIII (FVIII) необходимо для оценки соотношения с уровнем антигена vWF. Если соотношение FVIII:C/vWF:Ag менее 0,7, у пациента подозревается тип 2N БВ. Для точного подтверждения необходимо проведение дополнительных уточняющих исследований. Определение активности FVIII возможно с использованием любой из доступных в лаборатории методик: одностадийным клоттинговым методом, двухстадийным или хромогенным методом [21; 114].

1.4.4 Коллаген-связывающая активность фактора Виллебранда (vWF:CB)

Коллаген-связывающая активность vWF определяется методом ELISA. Оценка связывания коллагена является одной из важнейших методик и играет две важнейшие роли в оценке функциональных свойств vWF. Одна из них – непосредственно оценка связывания домена A3 vWF с субэндотелиальным коллагеном I и III типов в местах повреждения сосудов [105]. С другой стороны, позволяет оценить присутствие высокомолекулярных форм мультимеров vWF в плазме, ответственных за первичный гемостаз [70]. Описаны случаи пациентов с нормальным показателем vWF:Ag и vWF:RCo, присутствием ВМФМ, но значительным снижением связывания коллагена I и/или III типа, у которых впоследствии выявлено наличие специфических точечных мутаций в домене A3 vWF (Ser1731Thr, pTrp1745Cys и pSer1783Ala), что позволило установить подтип 2М БВ. Уже достаточно давно известно, что отдельные домены vWF могут взаимодействовать с различными типами коллагена, в частности, помимо домена A3, связывающим I и III типы, домен A1 vWF может связывать коллагены IV и VI типов [96; 125]. Тестирование на связывание vWF с коллагенами IV и VI типов на данный момент выполняется в ограниченном круге исследовательских лабораторий. Также пока не определена клиническая значимость выявления факта снижения vWF:CB IV и VI в клинической практике.

1.4.5 Агрегация тромбоцитов, индуцированная ристомицином (RIPA)

Агрегация тромбоцитов с ристомицином (RIPA - Ristocetin-induced platelet aggregation) по сути является вариантом vWF:RCo, выполненной на агрегометре. В современных рекомендациях RIPA не используется в непосредственной диагностике БВ ввиду отсутствия стандартизации методики, необходимости работать только на свежих образцах крови. Ее применение необходимо для дифференциальной диагностики БВ с тромбоцитопатиями. Агрегация с низкими дозами ристомицина (LDRIPA – low dose RIPA, концентрация $\leq 0,6$ мг / мл, в отличие от обычной дозы ≥ 1 мг / мл) отсутствует у здоровых лиц, однако может наблюдаться при БВ типа 2В и БВ тромбоцитарного типа. Ввиду высокой вариабельности получаемых результатов даже в рамках одного пациента, а также

необходимости проведения исследования только из свеженабранных образцов крови пациента, последние рекомендации по диагностике и лечению БВ рекомендуют отказаться от данной методики в пользу проведения таргетного генетического исследования [45].

1.4.6 Фактор-VIII-связывающая активность фактора Виллебранда (vWF:FVIII)

VWF:FVIII представляет собой ELISA методику, позволяя оценить способность vWF, выделенного из плазмы пациента, связывать рекомбинантный FVIII и используется для верификации диагноза БВ подтипа 2N, при котором существует специфический дефект связывания FVIII [110]. Данный анализ позволяет однозначно выявить нарушение связывания FVIII с vWF, что крайне важно в дифференциальной диагностике с гемофилией А, так как клинические проявления очень сходны [192]. Однако, учитывая низкую распространенность методики среди лабораторий даже крупных медицинских центров, возможно проведение таргетного генетического тестирования, как альтернативу vWF:FVIII [45].

1.4.7 Мультимерный анализ

Мультимерный анализ представляет собой один из дополнительных тестов для типирования БВ, который представляет собой электрофорез белка в агарозном геле, позволяющий оценить распределение различных форм vWF в зависимости от молекулярной массы [3; 102]. Отсутствие нарушений распределения мультимеров характерно для типов 1, 2M, 2N, хотя в последнее время появилось несколько исследований, демонстрирующие изменения мультимерной структуры у пациентов с типами 1 и 2M БВ [124]. Полное или частичное отсутствие высокомолекулярных форм мультимеров характерно либо для типа 2A, либо для 2B типа БВ. Современные рекомендации ISTH допускают использование мультимерного анализа для дифференциальной диагностики типов 2A, 2B и 2M наравне с vWF:CB. Однако, диагностическая ценность мультимерного анализа несколько выше, ввиду наличия у части пациентов с 2M типом БВ мутаций в

домене А3, который непосредственно связывает молекулу vWF с субэндотелиальным коллагеном, что приводит к снижению получаемых результатов vWF:CB и ошибочной постановке 2А типа БВ у таких пациентов. Классическая постановка мультимерного анализа представляет собой очень трудоемкий процесс, занимающий от 2 до 5 дней в зависимости от варианта методики. Каждый этап выполнялся отдельно, начиная с приготовления агарозного геля, затем этапа разделения мультимеров, фиксации геля или переноса исследуемого белка на мембрану, этапов обнаружения белка и последующей интерпретации полученной структуры [102]. Каждый этап сложен, трудоемок, и требует высокой квалификации специалиста. Агарозный гель используется в нескольких концентрациях: от низкой (1%) до высокой (2%), что соответствует гелям с низким разрешением и высоким разрешением. Также существует промежуточный вариант среднего разрешения геля, процент агарозы в которых составляет 1,2 - 1,6%. Гели с низким разрешением позволяют выявить наличие у пациента сверхтяжелых (гигантских) форм мультимеров vWF, что является полезным в диагностике различных патологий, связанных нарушением работы фермента ADAMTS13 при тромботической тромбоцитопенической пурпуре, синдроме Апшоу-Шульмана и дифференциальной диагностике гемолитико-уремического синдрома [42]. Гели с высоким разрешением позволяют оценить внутреннюю мультимерную структуру, наличие четкого разделения нетяжелых мультимеров на триплеты, а также возможную аномальную миграцию отдельных олигомеров vWF. Нарушение триплетной структуры позволяет типировать различные варианты типа 2А [77; 150]. Электрофорез представляет собой процесс миграции заряженной частицы в гелевой матрице под воздействием электрического поля. Средой для миграции vWF является агарозный гель, матричная структура которого влияет на миграцию белков в зависимости от размера частицы. Камеры для электрофореза могут быть плоскостные, вертикальные или подводные. Четкое разделение молекул на полосы возможно при использовании концентрированного буфера, при котором обязательно необходимо использование охлаждающего устройства, так как высокий пропускаемый ток приводит к образованию избытка тепла. Прерывистая буферная система является

наиболее часто используемой в лабораториях для проведения МА vWF [138]. Процедура электрофореза занимает от 4 до 16 часов, в зависимости от трех основных параметров – разрешения геля, количество образца (размер лунок) и силы тока. Последний параметр является ключевым во временном смысле, так как необходимо иметь эффективную систему охлаждения форезной камеры для максимального увеличения токов и, как следствие, уменьшения общего времени этапа электрофореза. Следующим этапом МА является процесс переноса белка на мембрану (Вестерн-Блоттинг) для последующей визуализации и денситометрического анализа. Процесс может осуществляться пассивно (диффузия) или электрофоретически (полусухой блоттинг, вакуумный блоттинг), вариантов которого существует несколько [36; 79; 169]. Мембраны, используемые для переноса белка, существуют трех типов: нитроцеллюлоза, нейлон, поливинилидендифлуорид. Процесс переноса состоит из 2-х этапов – вымывания белка из геля и адсорбция на мембране [85]. Процесс переноса происходит либо во влажной среде, с погружением в резервуар, либо между двумя проводящими пластинами, так называемый полусухой системы. Условия переноса зависят от типа геля, типа мембраны и устройства для переноса. После процесса переноса мембрана закаляется, блокируя оставшиеся сайты связывания белка, для получения на последующем этапе визуализации чистых данных [173].

Визуализация мультимеров может быть осуществлена 4 различными способами: радиоактивным, колориметрическим, люминографическим и флюорометрическим. Радиоактивным метод подразумевает использование рентгеновской пленки для визуализации молекул или их фрагментов с помощью метки. Для визуализации vWF используются антитела, меченые радиоактивным I^{125} . Данное антитело связывается с vWF непосредственно в геле и позволяет обнаруживать чрезвычайно низкие уровни белка. Однако важнейшим недостатком данной методики является проблема безопасности, ведь применение антител с радиоактивной меткой связано с высоким риском для здоровья. Колориметрический метод позволяет визуализировать vWF на мембране, и, в некоторых случаях, возможна детекция внутри агарозного геля. Метод обычно представляет собой твердофазный ИФА, включающий в себя инкубацию с

первичными и вторичными антителами с последующей детекцией оптической плотности. Данный метод может быть очень вариабельным по типу первичных и вторичных антител, субстратов [36; 43; 61; 101; 115; 169; 181; 172; 190]. Метод хемилюминесценции основан на излучении света с ограниченным выделением тепла, которое возникает при протекании химической реакции. Появление свечения связано с распадом возбужденного дианиона-3-аминофолата, который был образован при катализе люминола перекисью водорода. Данная методика может выполняться как в геле, так и на мембране, с использованием первичных и вторичных антител. Визуализация полученных данных осуществляется с помощью специальной камеры, чувствительной к хемилюминесцентному сигналу. По чувствительности метод хемилюминесценции лишь немногим уступает радиоактивной методике [145]. Метод флуоресцентной иммунодетекции основан на использовании специальных флуоресцентных красителей, свечение которых может находиться как в видимом, так и в инфракрасном спектре, в зависимости от типа красителя. Данная методика позволяет также, как и другие, детектировать vWF внутри геля или после переноса на мембрану. Чувствительность флуоресцентной иммунодетекции является высокой, но в отличие от хемилюминесценции, время экспозиции флуоресцентной метки значительно больше. Сигнал хемилюминесценции достигает своего максимума всего лишь в течение 5 мин. после реакции, что накладывает ограничения по времени анализа полученных результатов. Сигнал же флуоресцентных меток стабилен в течение нескольких месяцев, что позволяет проводить детектирование или анализ денситометрии в течение нескольких месяцев без потери чувствительности [44; 121]. В 2017 г. появился полный коммерческий набор для проведения мультимерного анализа vWF, позволяющий провести исследование в течение 7-8 часов [99]. Методика имеет возможность использовать различные гели – на 5 или на 11 дорожек в зависимости от количества исследуемых пациентов [3; 63; 146]. Полученные данные обрабатываются с помощью программы Phoresis Software (анализ денситограмм), в которой есть возможность подсчета процентного соотношения различных мультимерных групп. Исследования в этом направлении выполнялись ранее, где количественная оценка мультимерного профиля являлась

подтверждением нарушений молекулы vWF и особенностей мультимерной структуры при различных подтипах, а также использовалась для поиска новых возможных патологий vWF [132; 180]. Однако взаимосвязь между количеством различных мультимеров и степенью выраженности клинических проявлений не оценивалась.

1.4.8 Генетические исследования

Генетическое тестирование пациентов с БВ не является рутинной практикой, применяется в тех случаях, когда необходима дифференциальная диагностика типов и подтипов, когда функциональные исследования демонстрируют противоречивые результаты. А также для консультирования пациентов по возможной передаче заболевания по наследству. Тестирование пациентов с 1 типом БВ не совсем информативно, поскольку примерно 62% пациентов с 1 типом БВ имеют идентифицированный вариант последовательности (SV), пациенты с vWF < 30 МЕ/дл имеют частоту выявления SV более 80% [149]. Для пациентов с типом 2 БВ генетическое тестирование является крайне полезным исследованием, особенно при постановке 2N и 2B типов. Подтверждения 2N типа БВ является критически важным для пациентов. В отличие от других типов БВ, 2N клинически и лабораторно может быть не отличим от гемофилии А вследствие снижения концентрации или отсутствия FVIII в плазме пациента. Ошибочно установленный диагноз влечет за собой назначение терапии рекомбинантными концентратами FVIII, которые мало эффективны у пациентов с 2N типом БВ, и не могут в должной мере защитить пациента от развития геморрагических осложнений. Также важен тот факт, что 2N тип является аутосомно-рецессивным заболеванием, для которого необходимо проведение семейного генетического консультирования для выявления случаев носительства патогенной формы или гетерозиготных форм заболевания [98]. Генетическое исследование рекомендовано советом экспертов для 2B типа БВ, как исследование, подтверждающее данный тип, вместо Ld-RIPA. В данном случае проведение генетического исследования возможно в любой референсной лаборатории и не требует присутствия самого пациента, в отличие от RIPA. Для пациентов с типом 3 БВ генетическое тестирование позволяет

определить точность установленного диагноза, так как стандартная панель лабораторных исследований не позволяет дифференцировать 3 тип и тяжелый фенотип 1 типа БВ, необходимо исследование пропептида vWF [185]. Данная дифференцировка важна для семейного генетического консультирования, а также как оценка риска развития антител на проводимую терапию [112]. Выполнение генетических исследований при БВ имеют определенные сложности, связанные, в первую очередь, с размером гена *VWF*. Ген *VWF* достаточно крупный, состоит из 52 экзонов и расположен на коротком плече 12 хромосомы. Также диагностика осложняется наличием псевдогена, участки которого гомологичны экзонам с 23 по 34, который расположен на 22-й хромосоме. Отмечено, что ген *vWF* является крайне полиморфным, может значительно варьировать у здоровых людей. Многие патогенные варианты, которые ранее были отмечены как клинически значимые, встречаются у большого количества условно здоровых лиц, что ставит под сомнение патогенность данных изменений гена [187]. Изменения в структуре гена *VWF* обязательно должны подтверждаться наличием функциональных нарушений, что докажет патогенность исследуемого варианта [50]. Одним из ярких примеров является однонуклеотидный полиморфизм (snp – single-nucleotide polymorphism) p.1472H в 28 экзоне гена *VWF*, который характеризуется нарушением соотношения vWF:RCo к vWF:Ag и связана с нарушением связывания vWF с ристомицином, который используется в классических методиках определения связывания vWF с тромбоцитарным рецептором Gp1b. Данный вариант встречается у 63% афроамериканцев и до 17% у европейцев, и влияет лишь на снижение получаемых результатов ристомицин-кофакторной активности vWF у данных пациентов, не влияя на физиологические функции vWF и не вызывая клинических проявлений заболевания [75]. Секвенирование всего гена *VWF* имеет ограничения из-за высокой стоимости исследования, а также сложности последующего анализа полученных данных.

1.5 Установление диагноза БВ

Постановка диагноза БВ основана на данных кровоточивости в личном и/или семейном анамнезе в сочетании с результатами лабораторных исследований [2; 45].

Основная сложность диагностики связана с большой вариабельностью клинических проявлений. Симптомы и тяжесть течения могут быть различными у разных членов одной и той же семьи и меняться с течением времени у одних и тех же людей [62]. Характерными клиническими проявлениями БВ являются носовые кровотечения, меноррагии, кожный геморрагический синдром, кровотечения после оперативных вмешательств и удаления зубов, желудочно-кишечные кровотечения, а также возможны кровоизлияния в суставы [46; 56; 81; 170]. У детей, использование стандартизированных опросников для определения группы лиц, подлежащих дальнейшему лабораторному обследованию не столь эффективна, как для взрослых [130]. Особенно это характерно для 1 типа БВ, для которого возможно снижение активности vWF при наличии легких клинических проявлений, встречающихся в популяции здоровых лиц, так и без каких-либо геморрагических симптомов [38; 165]. Это значительно осложняет постановку диагноза, особенно учитывая высокую вариабельность концентрации vWF в зависимости от множества факторов: стресс, воспаление, гормональный фон, группа крови, возраст и т.д. [20; 51]. С возрастом концентрация vWF повышается, и даже может достичь нормальных значений у пациентов с БВ, тогда как геморрагический синдром не только сохраняется, но и может усилиться [182]. Таким пациентам требуется скрупулезная оценка клинического состояния, без учета результатов лабораторных исследований vWF [45]. Пациентам со снижением vWF:RCo менее 30% устанавливается диагноз БВ вне зависимости от клинических проявлений, при снижении vWF:RCo менее 50% - только при наличии геморрагического синдрома. Оценивается отношение $vWF:RCo/vWF:Ag$. Если оно больше 0,7 (пропорциональное снижение активности и антигена) диагностируется тип 1, если отношение менее 0,7 – устанавливается 2 тип БВ. Для дифференциальной диагностики типов 2 используются лабораторные исследования 2 уровня – vWF:CB, MA для разделения 2А и 2М типов. Диагностически более ценным является MA, так как позволяет визуализировать мультимерное распределение vWF в отличие от vWF:CB, который оценивает только работу домена А3 vWF. Существуют мутации, при которых нарушается связывание vWF с коллагеном, но мультимерный состав при этом не нарушается. В таком случае, при использовании

vWF:CB, может быть установлен неверный тип 2А [3]. Дифференциальная диагностика 2А и 2В типов является сложной задачей, ввиду значительной вариабельности клинических проявлений и сложности визуального определения размера молекул, вследствие отсутствия достоверных источников в литературе относительно распределения мультимерных форм vWF в геле Sebia. Выполнение Ld-RIPA исключена из последних международных рекомендаций, так как не во всех случаях позволяет установить 2В тип [8], к тому же выполнение данной методики невозможно при дистанционной диагностике БВ [6]. Сложность лабораторной диагностики и точного типирования БВ, имеющей клиническое значение у взрослых пациентов, а также недостаточность доступной информации по клиническим особенностям течения БВ у детей, сохраняющиеся вопросы относительно вклада изменений мультимерного состава vWF в клиническую картину заболевания, диктуют необходимость проведения дальнейших исследований, направленных на выявления клинико-лабораторных особенностей течения БВ у детей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации (далее – Центр). Исследование носило ретроспективный моноцентровой характер, в ходе которого было проанализированы данные пациентов с диагнозом D.68.0 болезнь Виллебранда за период с 2017 по 2022 гг. Все пациенты были обследованы амбулаторно, без госпитализации в стационар. Исследование одобрено Независимым этическим комитетом Центра (протокол № 9э/3-20 от 18.12.2020 г.).

Лабораторные исследования выполнялись на базе лабораторий Центра – клинико-диагностической лаборатории, лаборатории клинического гемостаза. При проведении исследования не предусматривались дополнительные для пациента визиты или манипуляции. Все исследования выполнялись в рамках рутинной клинической практики.

2.1 Пациенты

За период с 2020 по 2022 гг. в консультативно-поликлиническое отделение за консультацией к гематологу с жалобами на повышенную кровоточивость или изменения в коагулограмме обратились 666 пациентов в возрасте от 1 до 18 лет. При лабораторном обследовании были выделены 56 пациентов со снижением активности $vWF < 50\%$, из которых окончательный диагноз D 68.0 БВ был установлен 24 пациентам. Также в исследование включено 46 пациентов с установленным ранее диагнозом D 68.0 БВ на базе Центра в период с 2017 по 2019 гг. Таким образом, в анализируемую выборку было включено 70 пациентов с БВ (Рисунок 2).

Критериями включения пациентов в исследование являлись:

1. Возраст младше 18 лет.

2. Факт обращения к гематологу Центра в связи с отягощенным по геморрагическим эпизодам личным и/или семейным анамнезом, и/или изменениями в анализах крови.

3. Наличие результатов скринингового лабораторного обследования системы гемостаза в условиях Центра (ОАК, АЧТВ, ПВ, фибриноген, агрегация тромбоцитов с АДФ, коллагеном, адреналином, ристомицином, активность vWF).

4. Ранее установленный и лабораторно подтвержденный на базе Центра диагноз D 68.0.

Критерии невключения пациентов из исследования:

1. Наличие у пациентов другого заболевания свертывающей системы крови, не отвечающего критериям постановки диагноза БВ (vWF:RCo < 50%).

2. Вторичный синдром Виллебранда.

3. Сопутствующий прием лекарственных препаратов, влияющих на свертывающую систему крови.

Тяжесть геморрагического синдрома оценивалась с использованием педиатрического опросника оценки кровоточивости Pediatric Bleeding Questionnaire (PBQ) (Приложение А).

Кроме того, часть пациентов была обследована в связи с отягощенным семейным анамнезом. За наличие семейного геморрагического анамнеза принималось наличие клинических проявлений у родственников первой степени родства до 3 поколения.

2.2 Критерии постановки диагноза

Диагноз D 68.0 устанавливался на основании данных личного и семейного анамнеза и результатов лабораторных исследований согласно действующим Клиническим рекомендациям [2].

2.3 Методы обследования пациентов

Всем пациентам в рамках амбулаторного приема врача гематолога

проводился опрос об особенностях геморрагического личного и семейного анамнеза, оценивались физикальные данные, результаты лабораторных исследований, выполненные по месту жительства пациента. При сборе жалоб и анамнеза основное внимание обращалось на симптомы кровоточивости у пациентов (частота, интенсивность, степень выраженности, продолжительность, периодичность, собирались данные о факторах, провоцирующих кровотечения; факты обращения к врачам и сведения о госпитализациях в связи с развитием геморрагических проявлений; необходимость в проведении заместительной терапии концентратами факторов свертывания крови, компонентами крови; применение других гемостатических средств; необходимость пропускать занятия в учебных заведениях и др.). Также учитывалась локализация проявлений повышенной кровоточивости: кожный геморрагический синдром, носовые кровотечения, кровотечения со слизистых ротовой полости, в том числе при чистке зубов, желудочно-кишечные кровотечения, наличие крови в стуле, кровотечения из пуповинного остатка, кефалогематомы, внутричерепные кровоизлияния, обильные менструальные кровотечения, эпизоды присутствия крови в моче, наличие кровоточивости при медицинских манипуляциях и оперативных вмешательствах и др. Данные по клиническим проявлениям кровоточивости были получены от пациента или законного представителя и из медицинской документации. При физикальном осмотре особое внимание уделялось наличию геморрагических проявлений у пациента, для исключения локальных причин кровоточивости проводились консультации узких специалистов (ЛОР, гинеколог, хирург, ортопед и др.). Комплексная количественная оценка степени тяжести кровоточивости проводилась для систематизации клинико-анамнестических характеристик кровотечений с использованием детского стандартизированного опросника RBQ (полная версия опросника приведена в приложении А), с подсчетом итогового количества баллов. За наличие патологической кровоточивости принимались значения более 2 баллов [4]. Вне зависимости от количества баллов по данной шкале, всем пациентам было проведено лабораторное обследование. Также проводился сбор информации о наличии у пациента сопутствующих заболеваний, их терапии, наличие отягощенного семейного анамнеза.

2.4 Взятие образцов

Кровь на исследования набиралась из периферической вены с утра, строго натощак в вакуумные пробирки с 3,2% (0,109M) цитратом натрия и 3,6 этилендианинтетрауксусной кислотой (S-monovette КЗ-ЭДТА) с помощью закрытых систем в соответствии со стандартами [7]. Доставка в лабораторию осуществлялась в течение не более чем 30 минут после взятия в контейнере, строго в вертикальном положении. Образцы центрифугировались на центрифуге Labofuge 400 (Thermo Scientific, Германия) при 200g 10 минут для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОБТП) и при 1500g 15 минут, для получения бедной тромбоцитами плазмы (БТП). Агрегация тромбоцитов и скрининговые исследования выполнялись на свежих образцах плазмы. Часть БТП аликвотировалась в промаркированные вторичные криопробирки и замораживалась при -70°C для выполнения последующих дополнительных исследований типирования БВ – FVIII и коллаген связывающей способности vWF, мультимерного анализа.

2.5 Лабораторные исследования

Всем пациентам проводились лабораторные исследования на базе Центра в соответствии с принятым алгоритмом (Рисунок 2).

Исследования проводились на базе клинико-диагностической лаборатории и лаборатории клинического гемостаза, включали в себя:

- общеклинический анализ крови с подсчетом числа тромбоцитов;
- скрининговую коагулограмму, включающую исследования АЧТВ, ПВ, ПИ по Квику, ТВ, Фибриногена;
- определение антигена и активности vWF;
- агрегацию тромбоцитов с ристомицином в 2-х концентрациях;
- определение активности FVIII;
- определение FVIII и коллаген связывающей способности vWF;
- проведение мультимерного анализа vWF.

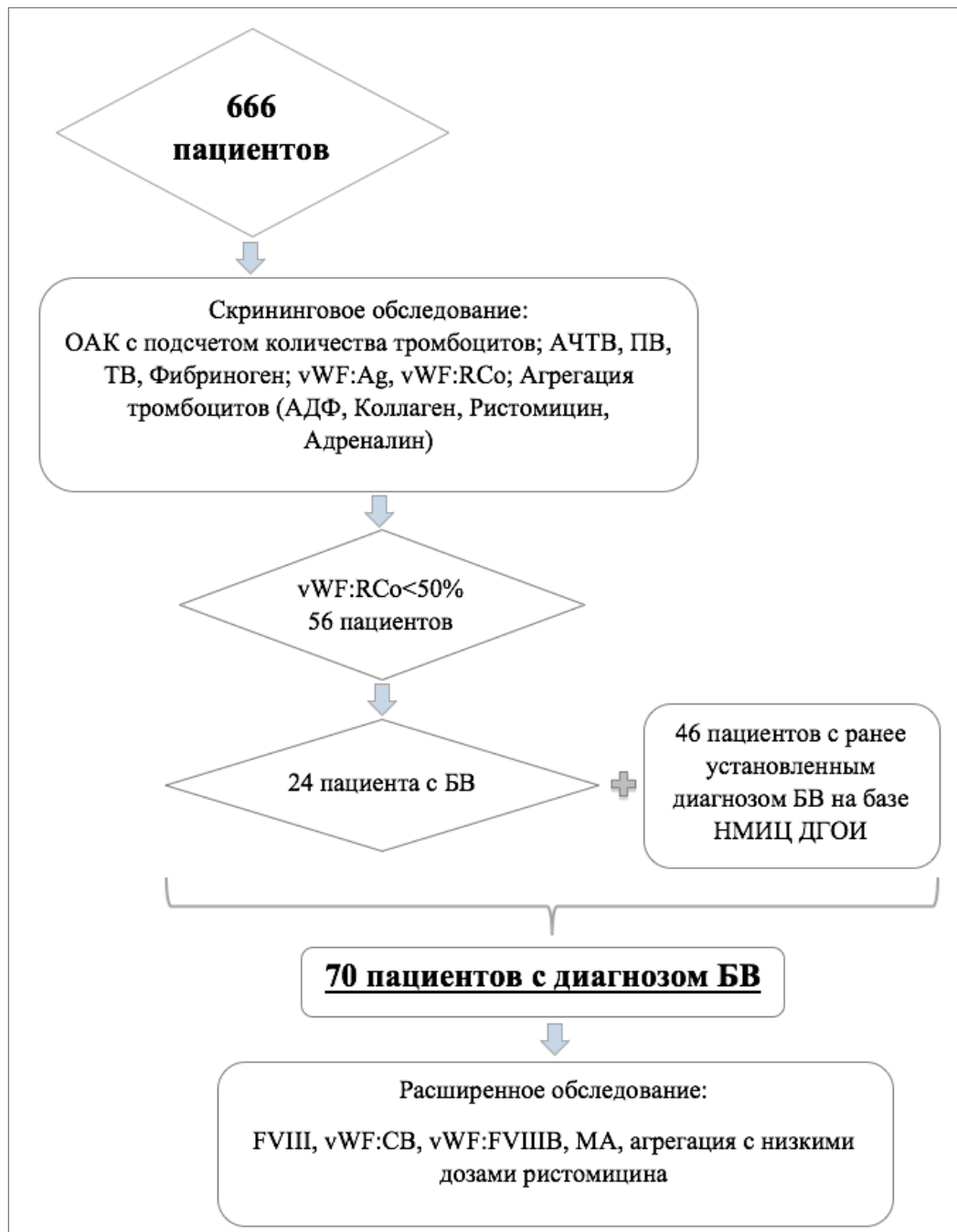


Рисунок 2 – Схема алгоритма исследования

Клинический анализ крови

Общий анализ крови с целью определения количества тромбоцитов выполнялся на гематологическом анализаторе Sysmex XT-4000i (Sysmex Corporation, Япония).

Скрининговые клоттинговые исследования

Скрининговые коагулологические исследования выполнялись на автоматическом коагулометре ACL TOP 700 (Instrumentation Laboratory, США). Использовались следующие реагенты: активированное частичное тромбопластиновое время (HemosIL SynThAsil, Instrumentation Laboratory, США), протромбиновое время (HemosIL RecombiPlasTin 2G, Instrumentation Laboratory, США), тромбиновое время (HemosIL Thrombin Time, Instrumentation Laboratory, США), фибриноген (HemosIL Q.F.A. Thrombin Bovine, Instrumentation Laboratory, США), антиген vWF (HemosIL vWF:Ag, Instrumentation Laboratory, США), ристомицин-кофакторная активность vWF (HemosIL vWF:RCo, Instrumentation Laboratory, США) активность фактора VIII (HemosIL FVIII Deficient plasma, Instrumentation Laboratory, США) с использованием стандартных наборов согласно рекомендациям производителя.

Коллаген-связывающая активность vWF (vWF:CB)

Коллаген-связывающая активность vWF (vWF:CB, Diagnostica Stago S.A.S, Франция) определялась методом твердофазного иммуноферментного анализа. Измерялось количество vWF, содержащегося в исследуемой плазме и способного при наличии в его структуре высокомолекулярных мультимеров связываться с коллагеном человека, нанесенным на внутреннюю поверхность лунок микропланшета. Далее, кроличьи антитела к vWF человека, конъюгированные с пероксидазой, связывались с оставшимися свободными антигенными детерминантами vWF, связанного с коллагеном. Связанный фермент пероксидаза обнаруживался по её действию на субстрат 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ). После остановки реакции с помощью концентрированной серной кислоты измерялась интенсивность окраски, которая прямо пропорциональна концентрации VWF:CB, изначально присутствовавшего в исследуемой плазме.

Фактор VIII – связывающая активность vWF (vWF:FVIII)

FVIII-связывающая активность vWF (vWF:FVIII, Diagnostica Stago S.A.S, Франция) определялась методом твердофазного иммуноферментного анализа.

vWF, определяемый в исследуемой плазме, захватывался F(ab')₂ фрагментами кроличьих антител к vWF человека, покрывающими внутреннюю поверхность лунок пластикового микропланшета. FVIII исследуемой плазмы, диссоциировавший на первой стадии исследования, удалялся с помощью промывки. Рекомбинантный FVIII, используемый в исследовании, связывался с vWF пациента. Затем, мышинные моноклональные антитела к FVIII человека, конъюгированные с пероксидазой, связывались с доступными антигенными детерминантами FVIII_r, связанными с vWF. Связанный фермент пероксидаза обнаруживался по его способности расщеплять хромогенный субстрат ТМБ. После остановки реакции с помощью концентрированной серной кислоты интенсивность окраски зависела от концентрации комплекса vWF:FVIII, изначально присутствовавшего в исследуемой плазме пациента.

Световая агрегометрия по Борну

Агрегация тромбоцитов проводилась на обогащенной тромбоцитами плазме (ОБТП) на лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов АЛАТ-2 (НПФ БИОЛА, Москва). Выполнялась агрегация с индуктором ристомицин (НПО «Ренам», Россия), в двух концентрациях. Стандартная постановка выполнялась с ристомицином 15 мг/мл, низкая доза с ристомицином 7 мг/мл, кривые агрегации записывались в течение 20 минут. Оценивалась степень изменения оптической плотности ОБТП по методу Борн/О'Браен в процентах [25].

Мультимерный анализ

Мультимерный анализ выполнялся с использованием набора Hydrigel 5 von Willebrand (МА, Hydrigel 5 von Willebrand, Sebia, Франция). Методика включала в себя следующие этапы: подготовка образца; миграция; иммунофиксация 1; иммунофиксация 2; визуализация: сушка геля; обесцвечивание геля; сканирование геля [99]. Набор включал в себя vWF multimer kit (Hydrigel 5 von Willebrand multimers). В состав входили агарозные гели (в буферном растворе pH 7,0±0,5), губки-стрипы (в буферном растворе pH 6,9±0,5), пластиковые маски, разбавитель

образцов (рН $5,0 \pm 0,5$), моющий раствор (рН $10,3 \pm 0,5$), промежуточный моющий раствор (рН $6,9 \pm 0,5$), регидратирующий раствор, тонкая и толстая фильтровальная бумага. vWF multimer visualization kit (5 von Willebrand multimer visualization kit, Sebia, Франция). В состав набора входил разбавитель антисыворотки, антитела anti-vWF (разбавлялись непосредственно перед использованием), вторичные антитела, меченые пероксидазой (разбавлялись непосредственно перед использованием), TTF1/TTF2 растворитель, исходный раствор TTF1 (разбавлялся непосредственно перед использованием), исходный раствор TTF2 (разбавлялся непосредственно перед использованием). TTF1 и TTF2 прогревались при комнатной температуре в течение 30 минут перед использованием. Дополнительные материалы и реагенты: Hydrasys 2 System (SEBIAPN: 1201, Sebia, Франция) включая направляющую планку, комплект принадлежностей vWFmultimer (SEBIAPN: 1651, Sebia, Франция), металлический груз (SEBIA PN: 1652, Sebia, Франция), перекись водорода (H_2O_2 , 30%), обесцвечивающий раствор (SEBIAPN: 4540, Sebia, Франция), разведённый 5 мл до 5 в дистиллированной воде (конечный рН~2), Промывающий раствор (SEBIAPN: 4541, Sebia, Франция), каждый флакон разведен до 5 л в дистиллированной воде (конечный рН $8,7 \pm 0,5$). Использовался готовый программный протокол постановки электрофореза мультимеров vWF, GELSCAN (SEBIAPN 1206, Sebia, Франция) программное обеспечение Phoresis software, Sebia, Франция.

Подготовка образцов:

Исследование выполнялось на бедной тромбоцитами цитратной плазме, образцы были заморожены при $-70^{\circ}C$, срок хранения не более 6 мес. Разморозка образцов осуществлялась непосредственно в день постановки на водяной бане, при температуре $37^{\circ}C$ в течение 5 минут. В дальнейшем, размороженные образцы плазмы разбавлялись в зависимости от уровня vWF:Ag [99] (Таблица 2).

Таблица 2 – Схема разбавления образцов

Концентрация vWF в плазме (ед/дл)	Разбавление рекомендуемое	Разбавление образца (мкл)	Плазма (мкл)
1	2	3	4
<20	1/4	30	10
20-150	1/6	50	10
150-300	1/10	90	10
>300	1/20	95	5

Разведенные образцы плазмы были загружены в мультимерные гели и подвергнуты этапу миграции с использованием системы Hydrasys 2, Sebia, Франция, при постоянной мощности 1 Вт, температуре 10⁰С и продолжительностью 115 минут. Мультимеры фиксировали в геле с помощью кроличьих антител против vWF, а затем исследовали с помощью иммунофиксации вторичными антителами, мечеными пероксидазой хрена. Визуализация мультимеров осуществлялась окрашиванием гелей коммерческими реагентами (TTF1/TTF2). Интерпретация полученных гелей проводилось визуально и с помощью программы Phoresis Software, Sebia, Франция (анализ денситограмм).

2.6 Оценка пропускной способности геля

Для определения пропускной способности геля проводилась укороченная постановка протокола электрофореза “vWF”, включающий в себя подготовку образцов, подготовка геля, нанесение на гель, этап миграции. В качестве образцов, для детекции и распределения белка на геле использовались молекулярные метки – Kb DNA Ladder M12 (Thermo Scientific, Германия) (12 меток, размеры от 250 до 10000 пар оснований (п.о.), и Thermo Scientific Fast Ruler DNA Radder 100-5000 (Thermo Scientific, Германия) (размеры 100 – 5000 п.о.). Молекулярные метки были выбраны в предпочтение белковым ввиду необходимости визуализации молекул молекулярной массой более 5000 кДа. Пересчет на кДа осуществлялся исходя из

средней массы пары нуклеотидов равной 649 Да [28]. Для визуального контроля миграции меток в геле к образцам был добавлен 1 мкл метиленового синего (Sigma Aldrich, Германия). После окончания этапа миграции гель помещался в раствор этидиума бромид (0,5 мкг/мл) на 1 час при комнатной температуре для окрашивания меток. После завершения окрашивания исследуемый гель был визуализирован с помощью гель-документирующей системы GelDoc (Bio-Rad Laboratories; США). Полученные изображения геля с визуализированными метками совмещались с изображениями гелей пациентов с помощью программы Adobe Photoshop CS5 (Microsoft corporation, США) для определения границ разделения мультимерных полос на геле на фракции – низкомолекулярные, средномолекулярные и высокомолекулярные. Для установления интервалов оптической плотности для различных мультимерных групп, по разработанному алгоритму количественной оценки, был проанализирован мультимерный профиль vWF восьми условно здоровых добровольцев, не имевших геморрагических проявлений в анамнезе, для каждой мультимерных групп. Учитывая отсутствие различий в структуре vWF у взрослых и детей старше 6 месяцев [12], группа условно здоровых добровольцев была представлена взрослыми, медиана возраста на момент обследования составила 27,5 лет, минимальный возраст 22 г., максимальный – 44 г. Распределение по полу мужчины:женщины – 3:5. В течении 14 дней до сдачи крови исключен прием лекарственных средств, влияющих на систему гемостаза. Отбор образцов проводился в соответствии с пунктом 2.4 работы. Все добровольцы были оценены с помощью опросника кровоточивости для подтверждения отсутствия отклонений в системе гемостаза, письменные информированные согласия об участии в исследовании получены.

2.7 Количественная оценка мультимерных форм vWF

Количественная оценка мультимеров vWF осуществлялась при помощи программы ImageJ. Программа ImageJ (США) – программа, написанная на языке Java программистами Национального Института Здоровья США. Программа представляет собой открытую научную платформу и позволяет, как одно из применений, проводить цифровую оценку оптической плотности областей

изображений [15]. ImageJ широко используется для оценки окрашенных образцов тканей, рентгеновских снимков и изображений, полученных на микроскопах [16]. Одним из возможных ее применений является, в том числе, обработка результатов гель-электрофореза. Инструменты программы позволяют измерить яркость полос электрофореграммы относительно фона самого геля, таким образом, была получена относительная цифровая оценка оптической плотности, которую за вычетом фона можно сравнивать между собой. Измерение оптической плотности выделенной области, в текущем исследовании, полосы электрофореза, было основано на измерении интенсивности уровня серого, поэтому для количественной оценки все изображения гелей были единообразно переведены в черно-белый формат. Говоря о числовой оценке, для примера: для 8-битного изображения имелось всего 256 оттенков серого, где пиксели с минимальным значением, равным 0, были черными, а со значением 255 – белыми, все остальные же пиксели (1-254) были представлены градациями оттенков серого. Таким образом, чем темнее полоса на геле (чем больше белка) тем меньше значение оптической плотности. Оптическая плотность измерялась для каждой группы мультимеров: для высокомолекулярных, средне- и низкомолекулярных. Также измерялась общая оптическая плотность дорожки каждого пациента. Вычесть фон программа позволяла автоматически.

2.8 Статистическая обработка данных

Для расчетов статистических данных была использована программа OriginPro 8,0 (Origin Lab Corporation, США) и Microsoft Exel (Microsoft Corporation, США). Для оценки корреляции между параметрами использовался критерий Пирсона, с уровнем статистической значимости $p < 0,05$. Для оценки силы корреляции применялась шкала Чеддока. Для сравнения данных использовался критерий Манна-Уитни.

Для оценки корреляции лабораторных параметров со степенью клинических проявлений была построена тепловая карта с использованием программы Microsoft Exel (Microsoft Corporation, США), где прямая зависимость отображалась красным

цветом, обратная зависимость – синим. Степень яркости окраски увеличивалась с увеличением силы связи.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общее количество пациентов, обратившихся в консультативное отделение с жалобами на кровоточивость или изменения в лабораторных анализах за период 2020 – 2022 гг., составило 666 человек. Из них диагноз D68.0 установлен 24 пациентам (3,6%). Также в исследование включено 46 пациентов, которым в период с 2017 по 2019гг. был установлен диагноз D68.0 на базе НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Таким образом, были проанализированны данные 70 пациентов с установленным диагнозом БВ.

3.1 Клинические проявления

Клиническая информация по пациентам представлена в таблице 3. Медиана дебюта геморрагических проявлений у пациентов с БВ составила 2 г. (0-16 лет) и отличалась между типами БВ ($p=0,05$, критерий Манна-Уитни). Так, медиана возраста дебюта для 1 типа БВ составила 3,25 г. (0 - 16 лет). Для 2 типа медиана возраста дебюта составила 1,25 лет (0 - 16 лет). Для 3 типа медиана возраста дебюта составила 0,1 г. (0 - 6 мес.) (Рисунок 3).

Таблица 3 – Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование

Показатель		Значение
1		2
Всего, <i>n</i> (%)		70 (100)
Пол, <i>n</i> (% от N)	М	39 (55,7)
	Ж	31 (44,3)
Возраст, лет (медиана, минимум-максимум)		8 (5 мес -17 лет)
Шкала RBQ, баллы (медиана, минимум-максимум)		4 (0 - 15)
	Менее 3	27

Продолжение таблицы 3

Показатель		Значение
1		2
	От 3 до 6	31
	От 6 и более	11
	Нет данных	1
Семейный анамнез <i>n</i> (%)	Отягощен	33 (47,1)
	Не отягощен	37 (52,9)

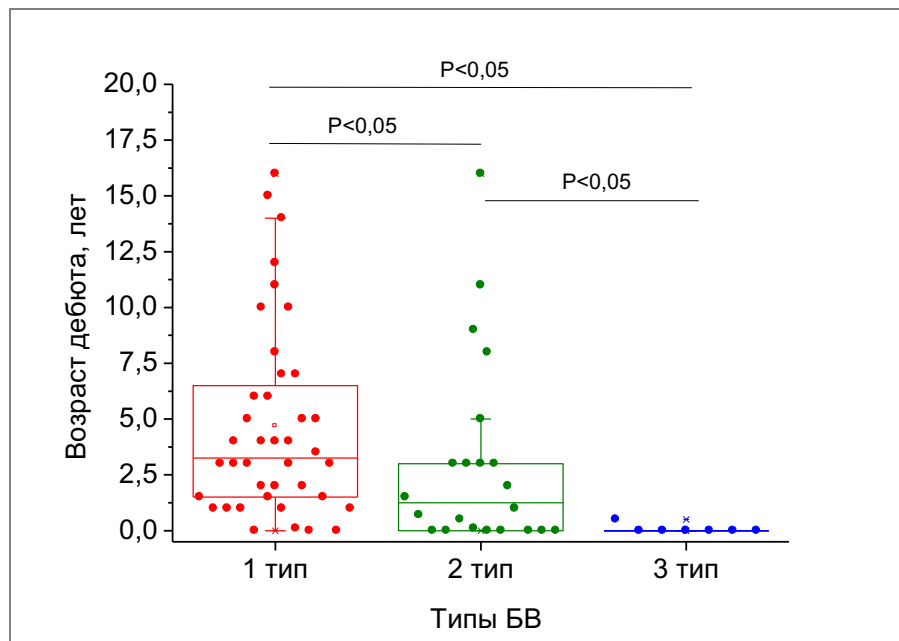


Рисунок 3 – Возраст дебюта в зависимости от типа у пациентов с БВ ($n=70$): для оценки статистической значимости различий между группами использовался U-критерий Манна-Уитни.

Была проведена оценка длительности отрезка времени с момента дебюта заболевания до постановки диагноза в зависимости от типа БВ с момента дебюта заболевания. Для 1 типа медиана длительности установления диагноза составила 3 г., (минимальная 0, максимальная 16 лет), для 2 типа – 2,25 лет (минимальная 1 мес., максимальная 14 лет), для 3 типа – 1 год (минимальная 1 мес., максимальная 3 года). Статистически значимые отличия наблюдались между 1 и 3 типами ($p=0,05$,

критерий Манна-Уитни), отличий между 1 и 2, 2 и 3 типами не выявлено (Рисунок 4).

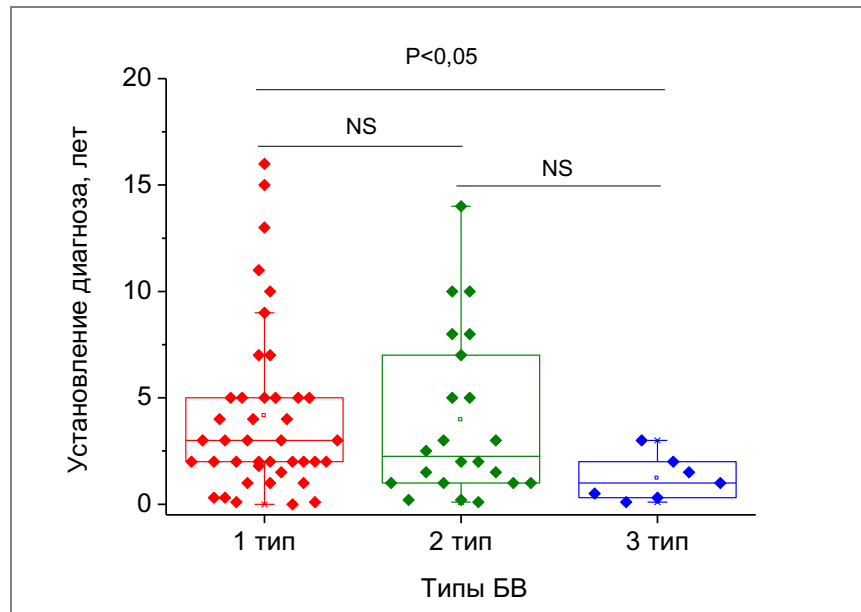


Рисунок 4 – Длительность отрезка времени с момента дебюта заболевания до постановки диагноза БВ в зависимости от типа ($n=70$): для оценки статистической значимости различий между группами использовался U-критерий Манна-Уитни; NS – статистически незначимо.

Выраженность кровоточивости оценивалась по шкале RBQ, с подсчетом итогового балла кровоточивости. Медиана баллов RBQ в исследуемой выборке обследованных пациентов составила 3 балла. Минимальный показатель RBQ составил 0 баллов, максимальный – 15 баллов. Менее 3 баллов наблюдалось у 27 (38,6%) пациентов, от 3 до 6 баллов у 31 (44,3%) пациентов, 6 и более баллов - у 11 (15,7%) пациентов. У одного пациента оценка тяжести клинических проявлений по шкале RBQ отсутствовала (Рисунок 5).

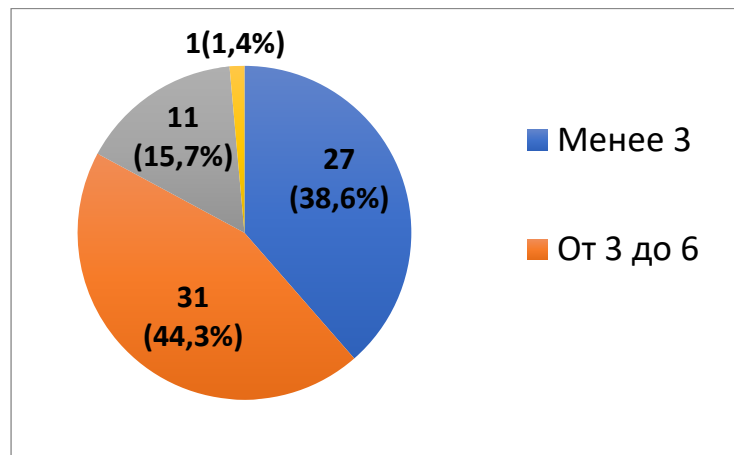


Рисунок 5 – Распределение баллов RBQ у пациентов с БВ

Семейный анамнез был отягощен у 33 (47,1%) пациентов, среди которых 1 типу соответствовали 19 пациентов, 2 типу – 13, 3 типу – 1 пациент. Не имели отягощенного семейного анамнеза 37 (52,9%) пациентов, среди которых 22 пациента с 1 типом, 7 – со 2 типом и 6 пациентов с 3 типом БВ (Рисунок 6).

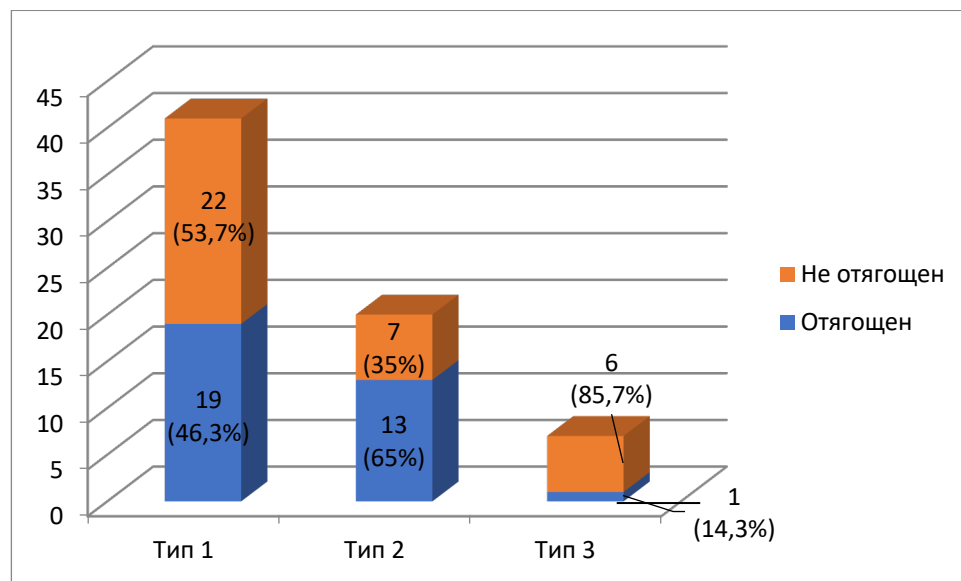


Рисунок 6 – Распределение пациентов по типу БВ в зависимости от семейного геморрагического анамнеза

Тяжесть геморрагических проявлений не отличалась между пациентами с отягощенным семейным анамнезом и без, медиана балла кровоточивости составила 4 (1-15) и 3 (0-12) баллов соответственно (Рисунок 7).

коровоточивости, у которой с рождения отмечалась длительная кровоточивость из мест инъекций, тромбоцитопения до $10-25 \times 10^9/\text{л}$, в связи с чем была госпитализирована по месту жительства, где был установлен диагноз иммунной тромбоцитопении. На фоне проведения терапии внутривенным иммуноглобулином в дозе 0,8 г/кг/курс был достигнут полный гематологический (тромбоциты $250 \times 10^9/\text{л}$) ответ. Через 1 мес. - $3 \times 10^9/\text{л}$, далее - $78-86-221 \times 10^9/\text{л}$. В повторных исследованиях концентрация антигена vWF = 71-85%. Впоследствии, с активизацией ребенка, у девочки отмечалось легкое появление экхимозов при травматизации. В марте 2015 г. (возраст ребенка 1 год и 9 мес.) на фоне ОРВИ - кровотечение из ранки языка, приведшее к анемизации до 58 г/л, однако родители пациентки отказались от госпитализации, получали пероральную ферротерапию в амбулаторных условиях. В ноябре 2015 г. в связи с выраженным кожным геморрагическим синдромом проведено исследование клинического анализа крови, количество тромбоцитов - $36 \times 10^9/\text{л}$. В дальнейшем у ребенка отмечались повторные носовые кровотечения, кровотечения из лунки зуба, гематома правого бедра, приводящие к анемизации. Заместительной терапии концентратом vWF не получала. Тромбоциты не ниже $150 \times 10^9/\text{л}$. В связи с сохраняющимся геморрагическим синдромом была направлена на консультацию гематолога в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. В ходе проведенного обследования выявлено снижение активности vWF до 18,9%, антигена vWF до 38,4%, активность FVIII - 26,9% при повышенной агрегации тромбоцитов с низкими дозами ристомидина (обычные дозы - норма). В ОАК количество тромбоцитов $180 \times 10^9/\text{л}$. У матери установлен диагноз БВ. Таким образом, на основании данных анамнеза, отягощенного семейного анамнеза, а также результатов проведенного лабораторного обследования, ребенку был установлен диагноз 2В типа БВ, были даны рекомендации по дообследованию (генетическая диагностика). Однако на повторную консультацию пациентка не прибыла.

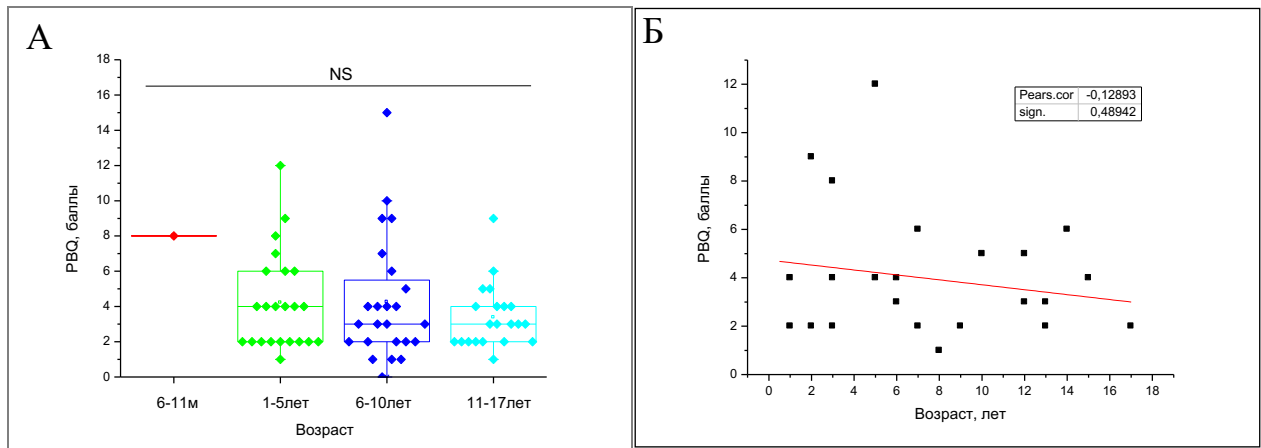


Рисунок 9 – Распределение балла РВQ в зависимости от возраста постановки диагноза (U-критерий Манна-Уитни; NS – статистически незначимо) (А); взаимосвязь балла РВQ и возраста (критерий Пирсона) (Б)

Тяжесть клинических проявлений достоверно ($p = 0,7$) не отличалась между мальчиками и девочками в разных возрастных группах (Рисунок 10).

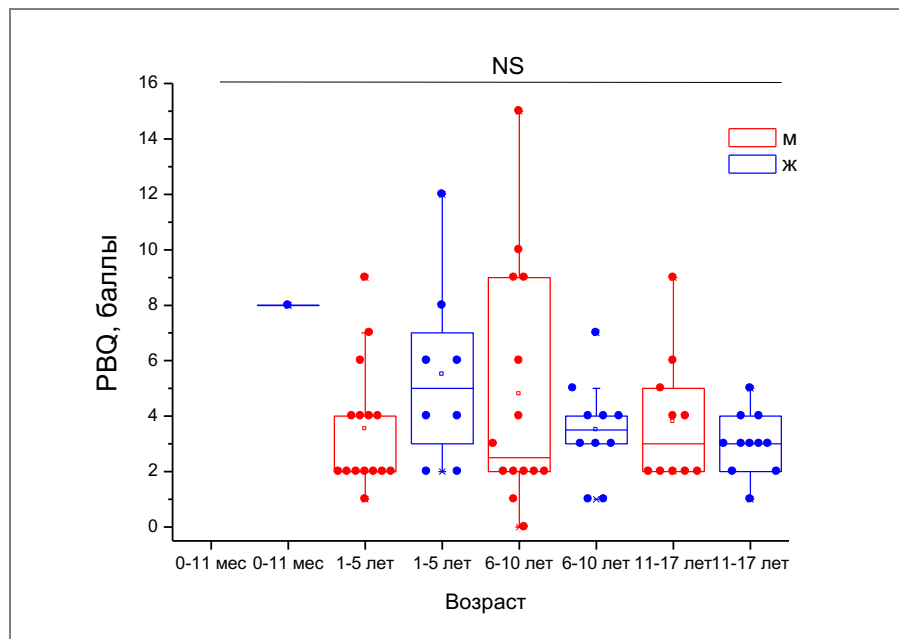


Рисунок 10 – Балл РВQ в зависимости от возрастных групп и пола больных: для оценки статистической значимости различий между группами использовался U-критерий Манна-Уитни; NS – статистически незначимо.

Также тяжесть клинических проявлений достоверно ($p = 0,5$) не отличалась между мальчиками и девочками для различных типов БВ. Медиана кровоточивости при типе 1 для мальчиков составила 2 (0-9) балла, для девочек 3 (1-5) балла. Для

типа 2 медиана кровоточивости у мальчиков составила 4 (2-10) у девочек 3 (1-12), для типа 3 – 7 и 6,5 соответственно (Рисунок 11).

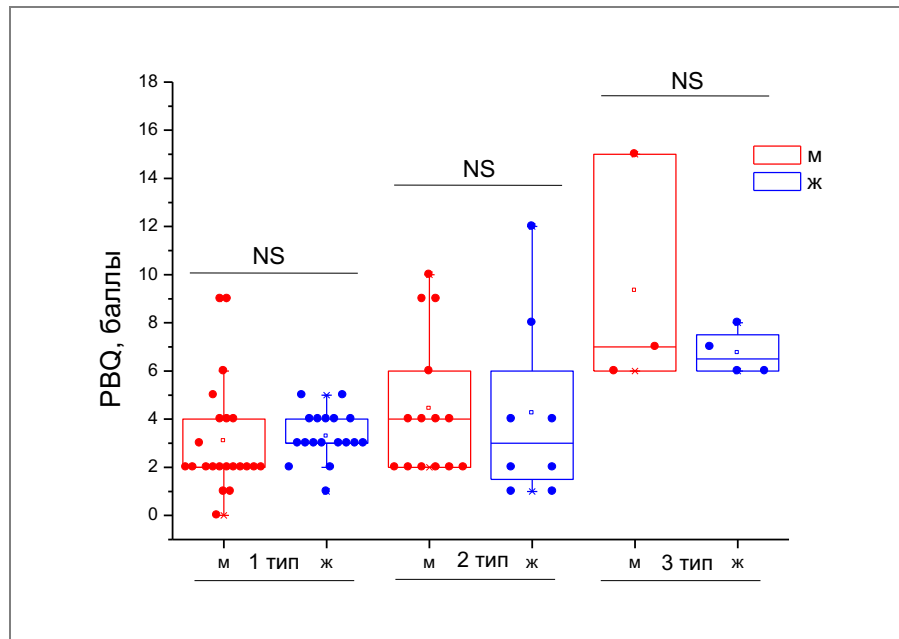


Рисунок 11 – Балл кровоточивости PBQ в группах мальчиков и девочек в зависимости от типа БВ: для оценки статистической значимости различий между группами использовался U-критерий Манна-Уитни; NS – статистически незначимо.

Наиболее частыми клиническими проявлениями геморрагического синдрома явились носовые кровотечения (74% случаев) и кожный геморрагический синдром (64% случаев). Среди менее частых проявлений оказались кровотечения со слизистой полости рта (16% случаев), мышечные гематомы (6% случаев), меноррагии (6% случаев), желудочно-кишечные кровотечения (3% случаев). Среди девочек в возрасте 11 – 18 лет частота меноррагий достигала 36,4%. У одной пациентки с 3 типом отмечались эпизоды отечности и болезненности суставов – левого голеностопного, правого голеностопного и коленного суставов, купирующиеся введением концентрата vWF+FVIII. Кровоизлияния в ЦНС не было отмечено ни у одного пациента (Рисунок 12).

У пациентов с типом 2В БВ отмечалось снижение количества тромбоцитов в дебюте заболевания: у 7 из 8 пациентов было установлено снижение количества тромбоцитов различной степени выраженности, четверем из которых был установлен диагноз иммунная тромбоцитопения (ИТП) с проведением первой

линии терапии - внутривенного иммуноглобулина (ВВИГ), гормональной терапии (ГКС). Среди получавших ВВИГ, 3 пациента достигли гематологического ответа, однако геморрагический синдром сохранялся.

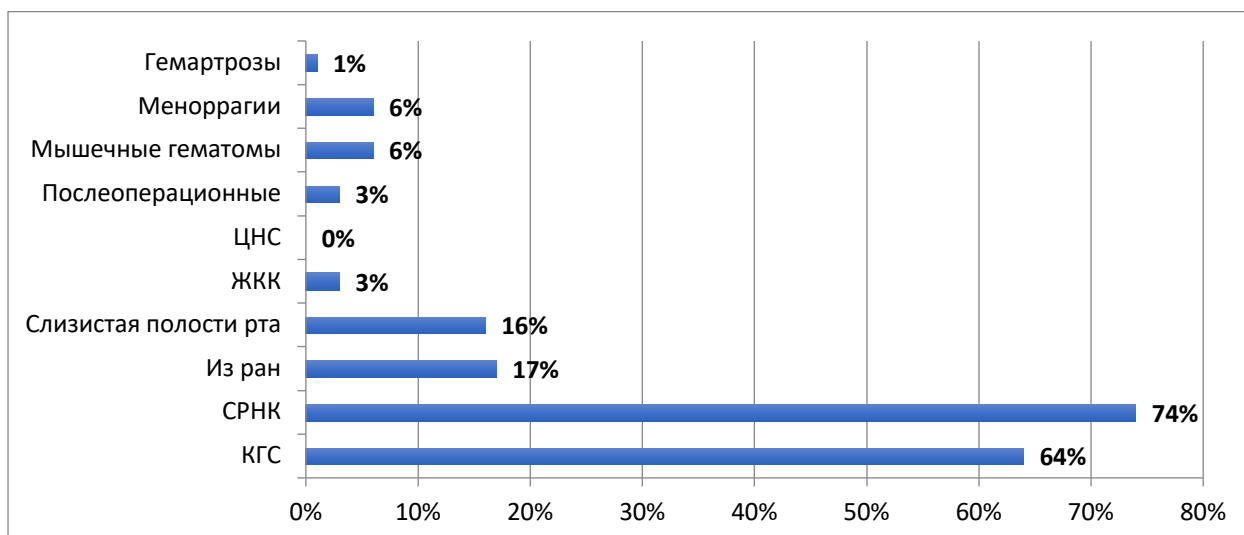


Рисунок 12 – Локализация клинических проявлений у пациентов с БВ: ЦНС – центральная нервная система, ЖКК – желудочно-кишечные кровотечения, СРНК – спонтанные рецидивирующие носовые кровотечения, КГС – кожный геморрагический синдром

Выраженность клинических проявлений зависела от типа БВ. Так, для типа 1 наиболее частыми клиническими проявлениями кровоточивости являлись спонтанные рецидивирующие носовые кровотечения (СРНК) – 78% и кожный геморрагический синдром (КГС) – 54%. Для типа 2 СРНК и КГС выявлены у 73% пациентов. У пациентов с типом 3 БВ КГС был отмечен у всех (100%) пациентов, тогда как СРНК лишь у 57% (Рисунок 13).

Треть случаев кровоточивости приводила к анемизации (30%), 34% пациентов потребовалась госпитализация, в 30% случаев кровотечения требовали проведения заместительной терапии компонентами крови – свежезамороженной плазмой (СЗП) и эритроцитной массой (ЭР-массой)

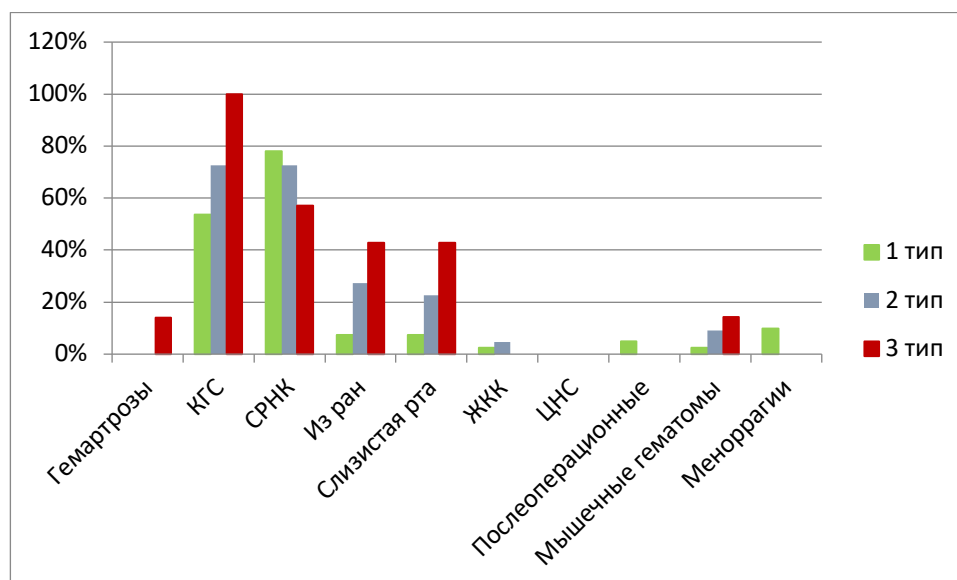


Рисунок 13 – Локализация клинических проявлений у пациентов с БВ в зависимости от типа. ЦНС – центральная нервная система, ЖКК – желудочно-кишечные кровотечения, СРНК – спонтанные рецидивирующие носовые кровотечения, КГС – кожный геморрагический синдром

3.2 Результаты лабораторных исследований

Снижение $vWF:RCo$ менее 50% наблюдалось у всех пациентов с БВ. Из 70 пациентов типу 1 соответствовали 41 (58,6%) пациентов, типу 3 – 7 (10%) пациентов, типу 2 – 22 (31,4%) пациентов. Нормальное значение АЧТВ наблюдалось у 34 (48,6%) пациентов, нормальное содержание $vWF:Ag$ – у 18 (25,7%) обследуемых пациентов с БВ (Рисунок 14).

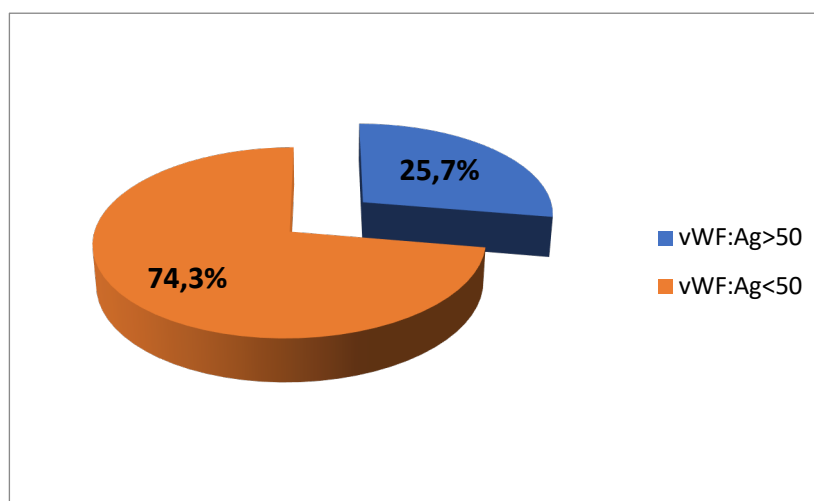


Рисунок 14 – Распределение пациентов с БВ по уровню антигена vWF

Исследования второго уровня для уточнения типа БВ были выполнены 54 пациентам из 70, для которых выполнялась количественная оценка мультимерного профиля. Коллаген связывающая способность vWF была снижена у 28 из 49 (57,1%) пациентов, среди которых у 4 (8,2%) пациентов был диагностирован 3 тип, у 10 (20,4%) пациентов тип 1, у 15 (30,6%) пациентов тип 2 БВ (Рисунок 15). У 29 (58,3%) пациентов с типом 1 БВ значение vWF:CB было в пределах референсного диапазона.

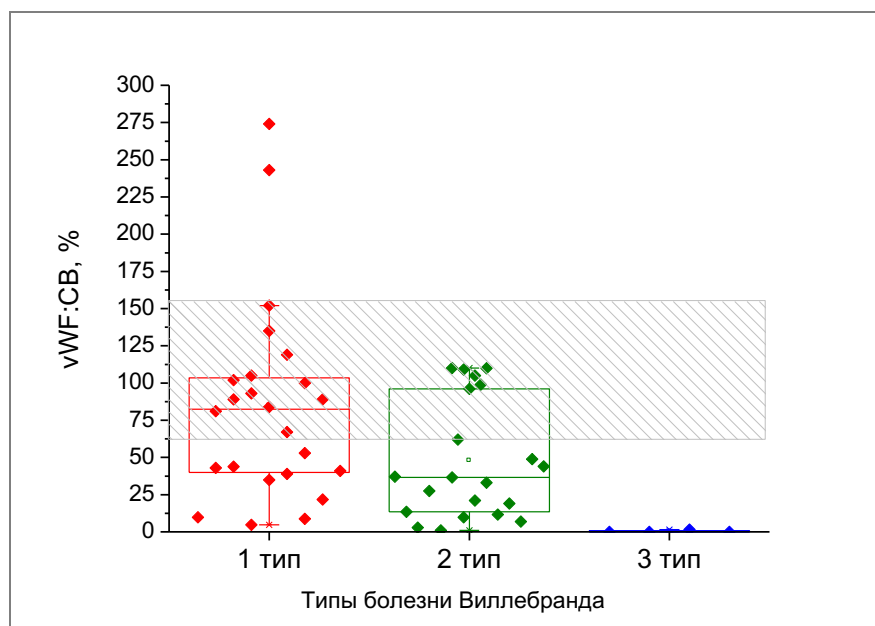


Рисунок 15 – Результаты определения коллаген-связывающей способности у пациентов в зависимости от типа БВ. Серым заштрихованным прямоугольником обозначен референсный диапазон vWF:CB (62 – 160%)

Сниженная активность FVIII была выявлена у 42,3% пациентов, большая часть из которых была представлена пациентами с типом 1 БВ. Для типа 3 было характерно значительное снижение активности FVIII (Рисунок 16).

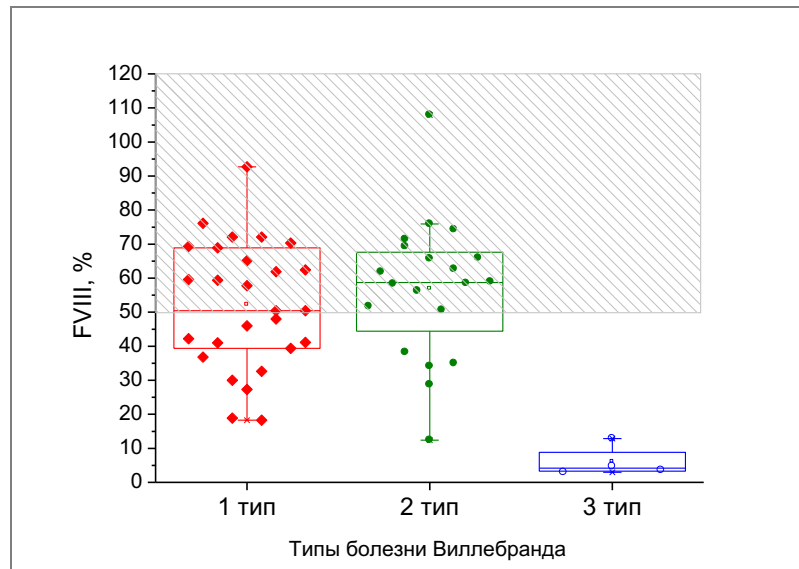


Рисунок 16 – Результаты определения активности FVIII у пациентов в зависимости от типа БВ. Серым заштрихованным прямоугольником обозначен референсный диапазон активности FVIII (50 – 150%)

У одного пациента со сниженным значением активности FVIII было выявлено снижение отношения активности FVIII к антигену vWF менее 0,6 (0,53), что позволило заподозрить наличие типа 2 N у данного пациента. Для всех остальных пациентов наблюдалась выраженная зависимость между уровнем vWF:Ag и активностью FVIII ($r_s = 0,74$, $p < 0,001$) (Рисунок 17).

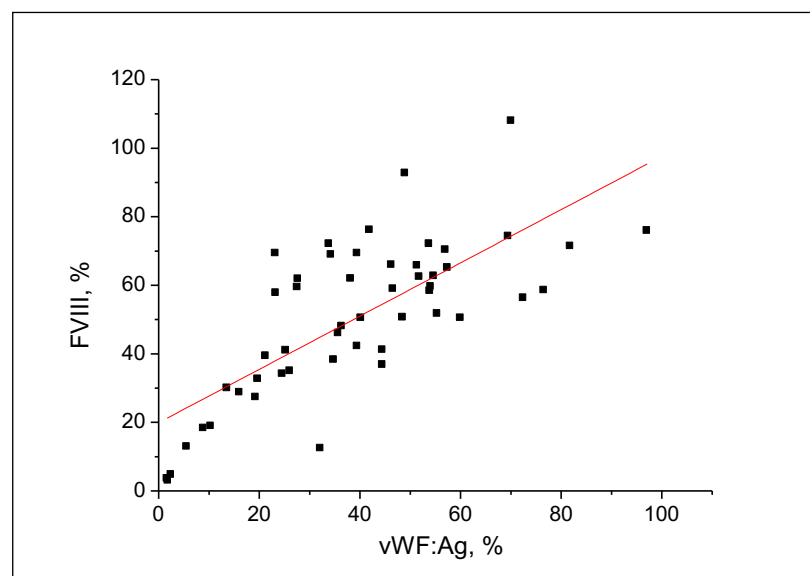


Рисунок 17 – Корреляция между уровнем vWF:Ag и активностью FVIII (критерий Пирсона)

Результаты лабораторных исследований у пациентов с БВ представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Лабораторная характеристика пациентов с различными типами БВ

Пациент, №	Возраст, лет	Пол	АЧТВ , с	vWF:Ag, %	vWF:Rco, %	vWF:Rco/ vWF:Ag	Тип БВ
1	2	3	4	5	6	7	8
1	4	Ж	52,1	2,5	10,2	4,1	3
2	1	м	39,8	24,6	3,1	0,1	2 В
3	0,4	Ж	74,7	1,9	1,1	0,6	3
4	12	ж	36,3	35,7	29,0	0,8	1
5	10	Ж	38,8	57,4	42,9	0,7	1
6	1	м	28,2	70,1	4,0	0,1	2 В
7	6	ж	32,9	33,9	38,1	1,1	1
8	1	м	34,0	51,1	44,7	0,9	1
9	9	М	36,8	53,9	28,8	0,5	2 М
10	2	М	35,4	48,5	12,8	0,3	2 А
11	5	ж	36,6	34,8	8,7	0,3	2 В
12	5	М	38,0	34,3	24,1	0,7	1
13	8	ж	34,8	72,5	31,6	0,4	2 А
14	6	Ж	48,5	8,9	11,2	1,3	1
15	8	М	39,7	19,3	21,0	1,1	1
16	9	ж	35,5	23,3	29,2	1,3	1
17	3	Ж	41,8	51,4	19,1	0,4	2 А
18	7	М	28,9	51,9	43,8	0,8	1
19	6	ж	41,6	19,7	16,4	0,8	1
20	2	М	41,7	26,0	14,7	0,6	2 А
21	14	М	33,2	46,6	14,0	0,3	2 М
22	15	м	34,2	97,1	24,9	0,3	2 М
23	7	М	36,4	53,8	45,0	0,8	1
24	12	м	37,0	27,6	17,0	0,6	1
25	6	ж	34,5	13,6	18,6	1,4	1
26	3	М	35,8	76,6	30,4	0,4	2 В
27	13	ж	43,6	54,7	32,4	0,6	2
28	7	ж	65,8	1,7	9,1	5,4	3
29	13	м	42,0	32,2	35,2	1,1	2 N
30	17	м	36,2	38,2	31,3	0,8	1
31	3	М	44,5	10,4	14,1	1,4	1
32	13	Ж	34,6	40,2	27,4	0,7	1
33	1	м	49,4	26,1	4,4	0,2	2 В
34	3	ж	38,9	39,5	17,9	0,5	2 А

Пациент, №	Возраст, лет	Пол	АЧТВ , с	vWF:Ag, %	vWF:Rco, %	vWF:Rco/ vWF:Ag	Тип БВ
1	2	3	4	5	6	7	8
34	3	ж	38,9	39,5	17,9	0,5	2 А
35	1	ж	48,2	16,1	11,8	0,7	2 А
36	9	ж	36,8	38,4	28,4	0,7	1
37	9	м	29,0	32,5	31,1	1,0	1
38	16	ж	35,7	52,0	47,6	0,9	1
39	4	м	35,7	52,2	14,1	0,3	2
40	8	м	40,8	45,2	42,7	0,9	1
41	16	м	34,5	51,5	40,6	0,8	1
42	3	ж	36,3	27,9	14,2	0,5	1
43	16	ж	49,9	43,9	33,8	0,8	1
44	11	ж	н/д	40,8	38,3	0,9	1
45	5	м	31,2	50,8	37,9	0,7	1
46	16	ж	30,9	36,4	28,8	0,8	1
47	1	м	55,9	4,0	0,1	0,0	3
48	8	м	37,7	28,6	5,2	0,2	2 В
49	2	м	72,3	2,0	1,5	0,8	3
50	8	м	34,3	48,7	25,0	0,5	2
51	8	м	44,5	23,7	7,0	0,3	3
52	3	ж	40,5	27,0	32,1	1,2	1
53	16	ж	28,5	48,6	17,1	0,4	2
54	9	м	н/д	39,5	29,3	0,7	1
55	11	м	36,7	37,1	34,2	0,9	1
56	8	м	38,5	12,5	2,5	0,2	1
57	6	ж	36,5	16,7	5,0	0,3	1
58	16	ж	34,1	44,5	38,3	0,9	1
59	17	м	42,6	43,6	32,6	0,7	1
60	10	м	39,9	42,8	34,0	0,8	1
61	6	ж	36,3	50,0	40,7	0,8	1
62	1	ж	68,1	4,5	0,5	0,1	3
63	14	м	34,4	28,7	24,4	0,9	1
64	4	м	31,5	23,2	19,1	0,8	1
65	17	м	35,4	29,0	23,2	0,8	1
66	1	м	44,1	52,9	43,2	0,8	1
67	16	ж	н/д	21,3	17,0	0,8	2 В
68	15	ж	30,8	48,6	42,2	0,9	1
69	6	м	34,9	53,6	39,2	0,7	1
70	8	м	29,2	33,6	0,7	0,0	2 В

3.3 Оценка пропускной способности геля

Учитывая расхождение между данными о количестве различных форм мультимеров vWF у здорового человека [182] и данными, представленными по распределению мультимеров на геле Sebia [13, 158], в соответствии с описанной в материалах и методах методикой, было проведено исследование пропускной способности коммерческого геля Hydrigel 5 vWF с помощью молекулярных лестниц. После постановки, окрашивания и сканирования, на геле с молекулярными лестницами визуализировались 8 меток тяжелой и 2 метки средней лестницы. Метка 8000 пар оснований (п.о.) соответствовала молекулярной массе в 5200 кДа, что позволило разделить высоко- и среднемолекулярные формы, граница между которыми проходила между 3 и 4 полосами на геле [129]. Метка 4000 п.о. соответствовала 2600 кДа, разделяя средне и низкомолекулярные формы между 1 и 2 полосой. Распределение молекулярных меток на геле HYDRAGEL представлено на Рисунке 18.

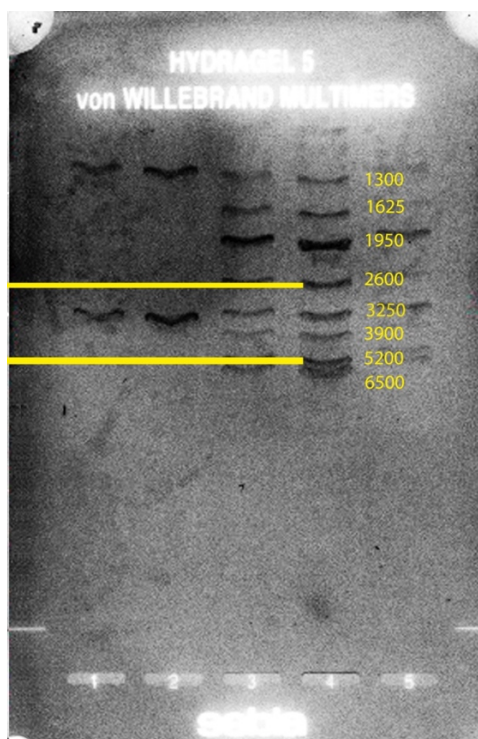


Рисунок 18 – Распределение молекулярных меток на геле HYDRAGEL. Дорожки 1,2 – метки Thermo Scientific Fast Ruler DNA Radder 100-5000 (Thermo Scientific, Германия) (размеры 100 – 5000 п.о.), дорожки 3-5 – метки Kb DNA Ladder M12 (Thermo Scientific, Германия) (12 меток, размеры от 250 до 10000 пар оснований (п.о.)). Желтыми цифрами отмечен молекулярный вес меток в кДа

При сопоставлении изображения геля с плазмой пациентов и геля с метками выявлено, что легкие формы мультимеров находятся в первой полосе, среднемолекулярные формы – в полосах 2 и 3, все остальные полосы соответствуют высокомолекулярным формам мультимеров vWF (более 5000 кДа) (Рисунок 19).

Количественная оценка осуществлялась с помощью программы ImageJ, по степени оптической плотности полос на геле, в относительных единицах (о.е.). Для установления интервалов оптической плотности группы сравнения, по разработанному алгоритму количественной оценки, был проанализирован мультимерный профиль vWF восьми условно здоровых добровольцев с подсчетом оптической плотности. Результаты представлены в Таблице 5.

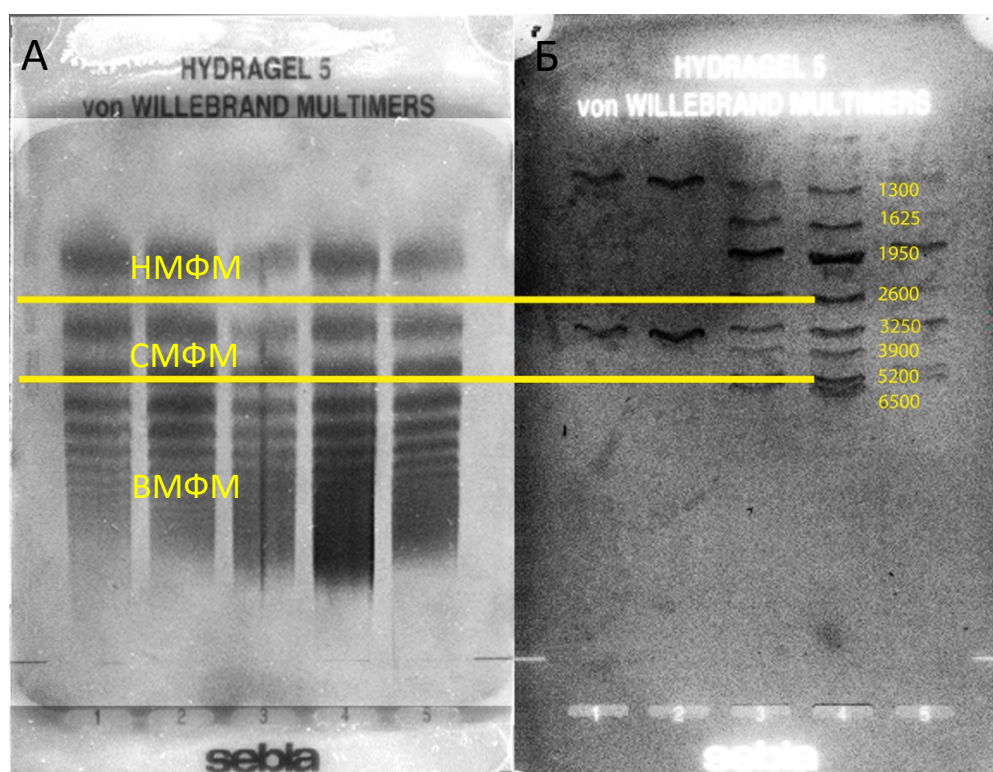


Рисунок 19 – Сопоставление геля с плазмой здоровых добровольцев (А) с гелем с молекулярными лестницами (Б) для определения границ разделения различных форм мультимеров vWF. НМФМ – низкомолекулярные формы мультимеров, СМФМ – среднемолекулярные формы мультимеров, ВМФМ – высокомолекулярные формы мультимеров vWF

Таблица 5 – Показатели оптической плотности условно здоровых добровольцев группы сравнения

Мультимеры	Оптическая плотность*, о.е.	SD	5% CI	95% CI
1	2	3	4	5
НМФМ	217,6	12,5	207,1	228
СМФМ	211,5	21,1	193,8	229,2
ВМФМ	186,4	17,3	171,9	200,9
Все	200,2	16,1	186,7	213,7

Примечания: * - представлены средние значения; НМФМ – низкомолекулярные формы мультимеров vWF, СМФМ – среднемолекулярные формы мультимеров vWF, ВМФМ – высокомолекулярные формы мультимеров vWF

Контрольные значения для всех форм мультимеров представлены как средние величины, стандартное отклонение и диапазон, включающий от 5 до 95 перцентилей значений. Зависимость результатов оптической плотности в о.е. и количества белка vWF обратная, в соответствии с алгоритмом расчета программы ImageJ ($r_s = -0,89$, $p < 0,001$). Таким образом, полученные в текущей работе результаты оказались отличны от данных, представленных в двух зарубежных исследованиях [13, 158].

3.4 Количественная оценка мультимеров vWF пациентов с различными типами БВ

Оптическая плотность полос мультимеров пациентов с БВ достоверно отличалась от здоровых добровольцев и контроля ($p < 0,05$). Выявлено, что результаты 70% пациентов с БВ находились за пределами диапазона оптической плотности группы сравнения. Это пациенты с типами 1 и 3 БВ, где увеличение значения цифровой оптической плотности являлось следствием снижения количества белка, или его полного отсутствия. Часть пациентов с типом 1 БВ находились в диапазоне нормальных значений, это пациенты с незначительно сниженным антигеном vWF, уровень которого был в диапазоне от 30 до 50%.

Также наблюдались изменения у пациентов с типами 2А и 2В БВ, у которых вследствие потери ВМФМ происходило увеличение оптической плотности количества мультимеров. Оставшиеся 30% проб, оптическая плотность которых не отличалась от значений группы сравнения, относились к пациентам с 2М типом (Рисунок 20).

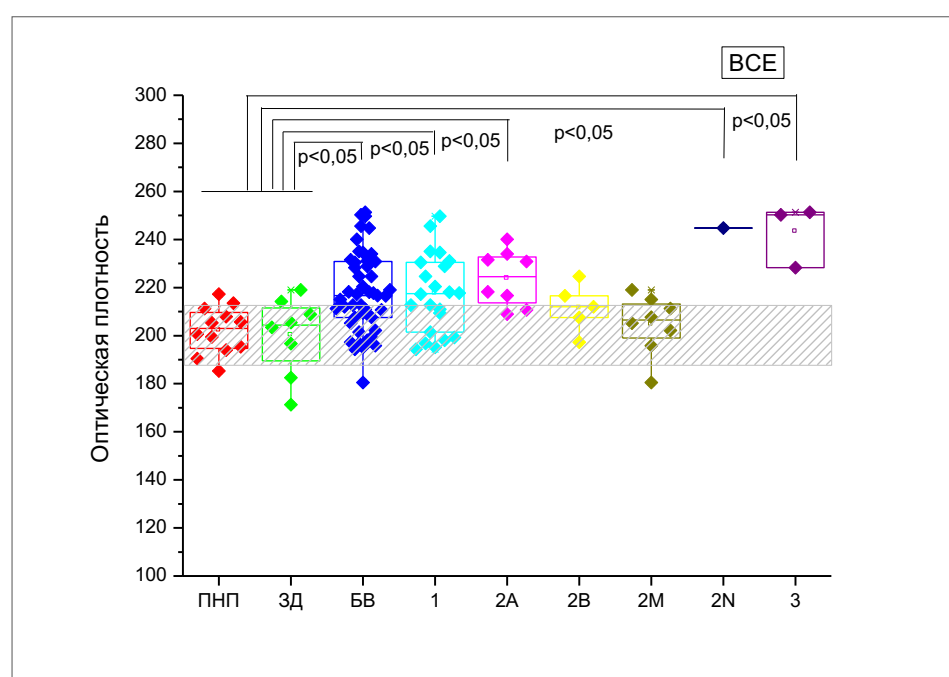


Рисунок 20 – Результаты количественной оценки мультимеров у пациентов с БВ по сравнению с контрольной группой. Серым заштрихованным прямоугольником обозначен нормальный диапазон группы сравнения. ПНП – пул нормальной плазмы, ЗД – здоровые добровольцы, БВ – болезнь Виллебранда, 1 – тип 1 БВ, 2А – тип 2А БВ, 2В – тип 2В БВ, 2М – тип 2М БВ, 2N – тип 2N БВ, 3 – тип 3 БВ

Количественная оценка ВМФМ выявила достоверные различия в группах пациентов с типами 1, 2А, 2В и 3 вследствие снижения общего количества мультимеров при типах 1 и 3 и потери ВМФМ при 2А и 2В по сравнению с группой сравнения. Достоверных различий при типах 2М и 2N в количестве ВМФМ не выявлено (Рисунок 21). Однако был выявлен один пациент с типом 2В БВ с нормальным уровнем ВМФМ. Среди пациентов с типом 2М количество ВМФМ варьировало в широком диапазоне в зависимости от количества антигена vWF в плазме.

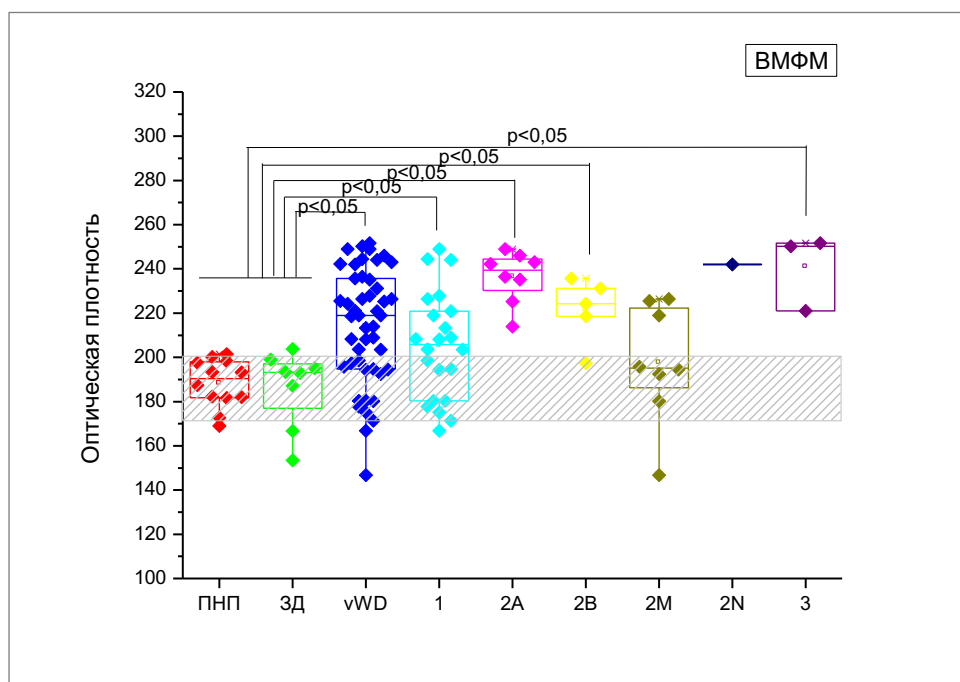


Рисунок 21 – Результаты количественной оценки высокомолекулярных форм мультимеров у пациентов с БВ по сравнению с контрольной группой. Серым заштрихованным прямоугольником обозначен нормальный диапазон группы сравнения. ПНП – пул нормальной плазмы, ЗД – здоровые добровольцы, БВ – болезнь Виллебранда, 1 – тип 1 БВ, 2А – тип 2А БВ, 2В – тип 2В БВ, 2М – тип 2М БВ, 2N – тип 2N БВ, 3 – тип 3 БВ

Оценка количества СМФМ выявила достоверное ($p < 0,05$) снижение средномолекулярных форм у пациентов с типами 1 и 3 (увеличение оптической плотности), и увеличение при типе 2В (снижение плотности). Различий между типом 2М и группой сравнения не выявлено. У пациента с 2N типом также выявлено снижение средних форм vWF (Рисунок 22).

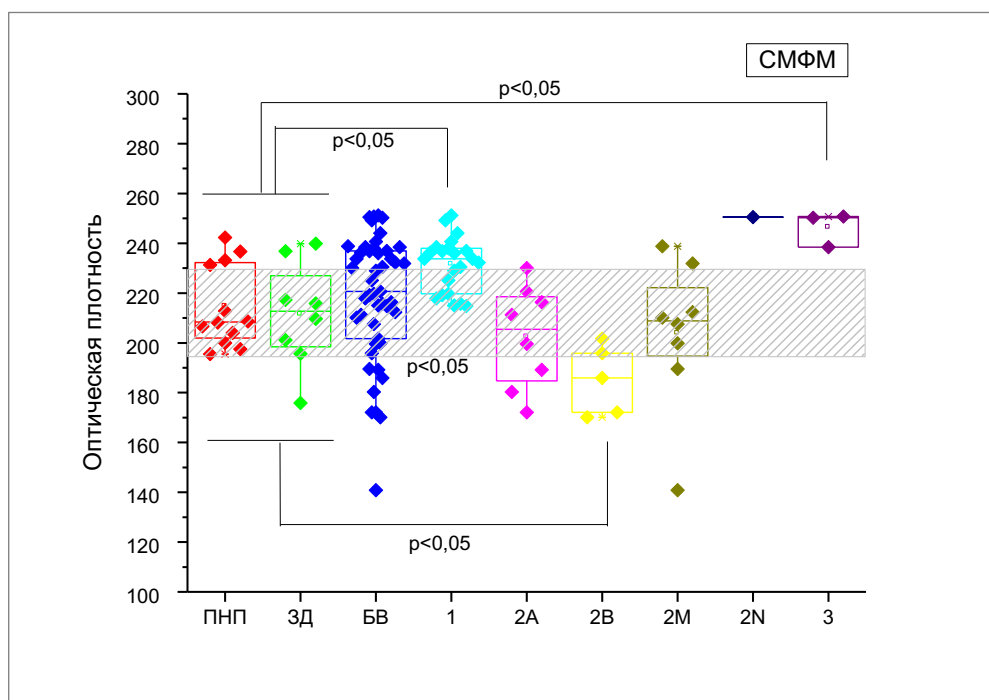


Рисунок 22 – Результаты количественной оценки среднемолекулярных форм мультимеров у пациентов с БВ по сравнению с контрольной группой. Серым заштрихованным прямоугольником обозначен нормальный диапазон группы сравнения. ПНП – пул нормальной плазмы, ЗД – здоровые добровольцы, БВ – болезнь Виллебранда, 1 – тип 1 БВ, 2А – тип 2А БВ, 2В – тип 2В БВ, 2М – тип 2М БВ, 2N – тип 2N БВ, 3 – тип 3 БВ

Количественная оценка НМФМ выявила достоверное снижение низкомолекулярных форм у части пациентов с типом 1 (увеличение оптической плотности), и увеличение при типах 2А и 2В (снижение плотности). Уровень НМФМ не отличался от группы сравнения у части пациентов с типами 1 и 2 М (Рисунок 23).

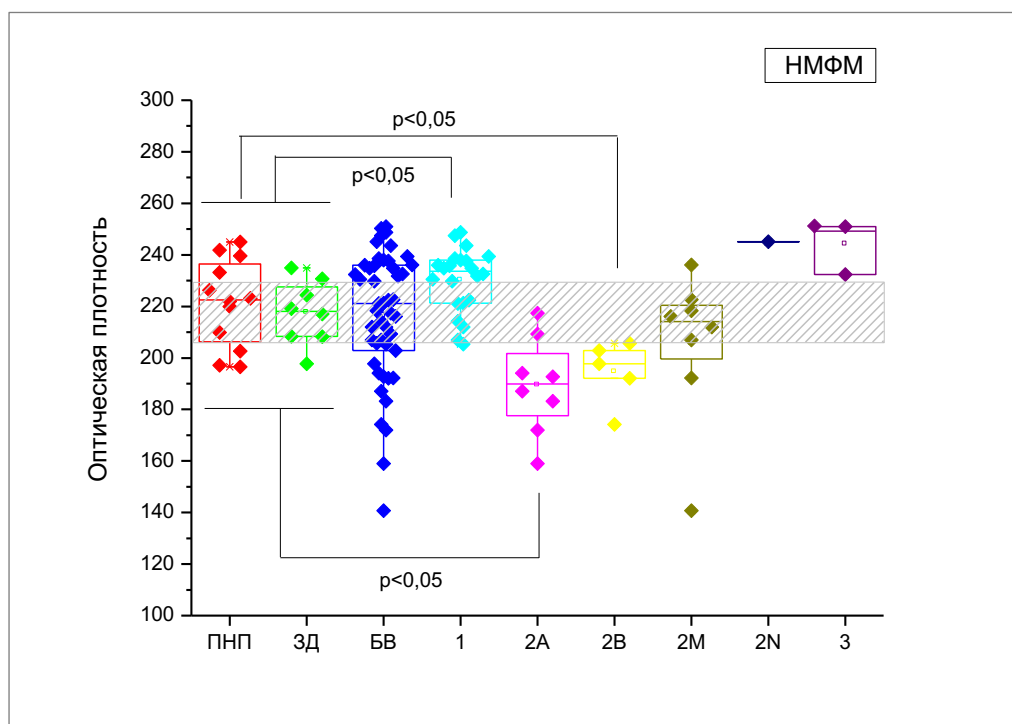


Рисунок 23 – Результаты количественной оценки низкомолекулярных форм мультимеров у пациентов с БВ по сравнению с контрольной группой. Серым заштрихованным прямоугольником обозначен нормальный диапазон группы сравнения. ПНП – пул нормальной плазмы, ЗД – здоровые добровольцы, БВ – болезнь Виллебранда, 1 – тип 1 БВ, 2А – тип 2А БВ, 2В – тип 2В БВ, 2М – тип 2М БВ, 2N – тип 2N БВ, 3 – тип 3 БВ

3.5 Оценка взаимосвязи клинических проявлений с лабораторными данными

Для оценки корреляции лабораторных параметров со степенью клинических проявлений была построена тепловая карта, где прямая зависимость отображается красным цветом, обратная зависимость – синим. Степень яркости окраски увеличивается с увеличением силы связи. При оценке наличия корреляции выраженности проявлений геморрагического синдрома со степенью снижения $vWF:Ag$ по результатам лабораторных исследований ($vWF:RCo$, $vWF:CB$) взаимосвязи выявлено не было (Таблица 6). Корреляционных связей между количеством ВМФМ vWF , рассчитанному по разработанному алгоритму оценки цифровой оптической плотности, как наиболее ключевых мультимеров в

осуществлении первичного гемостаза, и степенью кровоточивости также не было выявлено ($r_s = -0,2, p = 0,16$).

Количественная оценка мультимеров vWF продемонстрировала обратную корреляционную связь с уровнем антигена vWF ($r_s = -0,79, p < 0,001$) – чем меньше значение оптической плотности, тем выше концентрация фактора. Сильная корреляция наблюдалась между двумя функциональными тестами оценки vWF – vWF:RCo и vWF:CB ($r_s = 0,82, p < 0,001$). Обе эти методики оценивают функциональную активность высокомолекулярных форм мультимеров, что подтверждается наличием корреляционной зависимости между количеством ВМФМ и vWF: CB ($r_s = -0,73, p < 0,001$), между количеством ВМФМ и vWF:RCo ($r_s = -0,75, p < 0,001$).

При распределении пациентов на группы по типам БВ с учетом наличия или отсутствия нарушения мультимерного профиля, были проанализированы данные пациентов с типом 1 БВ, а также выделена группа пациентов с типами 2А и 2В, для которых характерна потеря части высокомолекулярных форм vWF.

При оценке группы пациентов с типом 1 БВ корреляционной зависимости между тяжестью кровоточивости по шкале RBQ и лабораторными данными, в том числе и количественной оценки мультимеров, не было выявлено (таблица 7). Корреляционная зависимость наблюдалась между результатами двух функциональных тестов оценки vWF – vWF:RCo и vWF:CB ($r_s = 0,76, p < 0,001$). Количественная оценка мультимерного профиля была сопоставима с уровнем vWF при типе 1, как и при оценке всех типов, но с менее выраженной степенью достоверности.

Таблица 6 – Тепловая диаграмма корреляций лабораторных показателей и шкалы кровоточивости PBQ пациентов с БВ

		PBQ	vWF:Ag	vWF:Rco	vWF:CB	НМФМ	СМФМ	ВМФМ	Все формы мультимеров
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBQ	P-test	1,000	0,211	-0,272	-0,324	-0,325	-0,243	0,022	-0,218
	Sign.	--	0,174	0,078	0,036	0,034	0,116	0,889	0,160
vWF:Ag	P-test	0,211	1,000	0,520	0,594	-0,409	-0,677	-0,590	-0,787
	Sign.	0,174	--	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
vWF:Rco	P-test	-0,272	0,520	1,000	0,820	0,179	-0,086	-0,750	-0,480
	Sign.	0,078	0,001	--	0,001	0,180	0,521	0,001	0,001
vWF:CB	P-test	-0,324	0,594	0,820	1,000	0,105	-0,192	-0,727	-0,551
	Sign.	0,036	0,001	0,001	--	0,444	0,161	0,001	0,001
НМФМ	P-test	-0,325	-0,409	0,179	0,105	1,000	0,854	0,057	0,575
	Sign.	0,034	0,001	0,180	0,444	--	0,000	0,670	0,001
СМФМ	P-test	-0,243	-0,677	-0,086	-0,192	0,854	1,000	0,375	0,817
	Sign.	0,116	0,001	0,521	0,161	0,000	--	0,004	0,001
ВМФМ	P-test	0,022	-0,590	-0,750	-0,727	0,057	0,375	1,000	0,777
	Sign.	0,889	0,001	0,001	0,001	0,670	0,004	--	0,001
Все формы мультимеров	P-test	-0,218	-0,787	-0,480	-0,551	0,575	0,817	0,777	1,000
	Sign.	0,160	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	--

Примечание: PBQ – выраженность клинических проявлений в баллах; vWF:Ag – антиген фактора Виллебранда; vWF:RCo – ристомицин-кофакторная активность фактора Виллебранда; vWF:CB – коллаген-связывающая активность фактора Виллебранда; НМФМ - низкомолекулярные формы мультимеров vWF; СМФМ - среднемолекулярные формы мультимеров vWF; ВМФМ - высокомолекулярные формы мультимеров vWF

Таблица 7 – Тепловая диаграмма корреляций лабораторных показателей и шкалы кровоточивости PBQ пациентов с типом 1 БВ

-	-	PBQ	vWF:Ag	vWF:Rco	vWF:CB	НМФМ	СМФМ	ВМФМ	Все формы мультимеров
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBQ	P-test	1,000	0,225	0,094	-0,087	-0,109	-0,066	-0,185	-0,159
	Sign.	--	0,327	0,684	0,709	0,639	0,777	0,423	0,492
vWF:Ag	P-test	0,225	1,000	0,871	0,850	-0,400	-0,696	-0,871	-0,841
	Sign.	0,327	--	0,001	0,001	0,039	0,001	0,001	0,001
vWF:Rco	P-test	0,094	0,871	1,000	0,759	-0,249	-0,517	-0,731	-0,681
	Sign.	0,684	0,001	--	0,000	0,210	0,006	0,001	0,001
vWF:CB	P-test	-0,087	0,850	0,759	1,000	-0,363	-0,684	-0,855	-0,821
	Sign.	0,709	0,001	0,001	--	0,068	0,001	0,001	0,001
НМФМ	P-test	-0,109	-0,400	-0,249	-0,363	1,000	0,687	0,451	0,607
	Sign.	0,639	0,039	0,210	0,068	--	0,001	0,018	0,001
СМФМ	P-test	-0,066	-0,696	-0,517	-0,684	0,687	1,000	0,835	0,916
	Sign.	0,777	0,001	0,006	0,000	0,000	--	0,001	0,001
ВМФМ	P-test	-0,185	-0,871	-0,731	-0,855	0,451	0,835	1,000	0,970
	Sign.	0,423	0,001	0,001	0,001	0,018	0,001	--	0,001
Все формы мультимеров	P-test	-0,159	-0,841	-0,681	-0,821	0,607	0,916	0,970	1,000
	Sign.	0,492	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	--

Примечание: PBQ – выраженность клинических проявлений в баллах; vWF:Ag – антиген фактора Виллебранда; vWF:RCo – ристомицин-кофакторная активность фактора Виллебранда; vWF:CB – коллаген-связывающая активность фактора Виллебранда; НМФМ - низкомолекулярные формы мультимеров vWF; СМФМ - среднемолекулярные формы мультимеров vWF; ВМФМ - высокомолекулярные формы мультимеров vWF

При оценке группы пациентов с типами 2А и 2В БВ (Таблица 8) выявлена умеренная, но не достоверная, корреляционная зависимость между степенью кровоточивости и ВМФМ ($r_s = -0,5, p = 0,07$). Обратная зависимость была выявлена между тяжестью кровоточивости по шкале РВQ и количеством низкомолекулярных форм мультимеров vWF ($r_s = -0,63, p = 0,02$) (таблица 8). Количественная оценка мультимерного профиля была сопоставима с антигеном vWF при типах 2А и 2В, между тестами выявлена сильная корреляционная зависимость ($r_s = -0,81, p = 0,001$). Обращает на себя внимание, что из двух функциональных тестов, оценивающих работу именно ВМФМ vWF, зависимости между количеством ВМФМ и vWF:CB ($r_s = -0,4, p = 0,09$), как и зависимость между ВМФМ и vWF:RCo была определена как умеренная и не достоверная ($r_s = -0,45, p = 0,06$).

Не было обнаружено корреляционной зависимости между снижением активности vWF и тяжестью клинических проявлений по опроснику РВQ ($r_s = -0,14, p = 0,7$). Однако обращают на себя внимание 5 пациентов с активностью vWF < 15% и низким баллом кровоточивости по стандартизированному опроснику РВQ. У троих пациентов при активности vWF 14,7%, 4,4% и 11,8% степень кровоточивости в баллах РВQ составила 2, у двух пациентов с более выраженными клиническими проявлениями, оцененными по опроснику в 4 балла, активность vWF составила 4% и 3,1% соответственно. Другие же пациенты со схожей активностью vWF и похожим лабораторным фенотипом демонстрировали 9 и 12 баллов соответственно (Рисунок 24).

Таблица 8 – Тепловая диаграмма корреляций лабораторных показателей и шкалы кровоточивости PBQ пациентов с типами 2А, 2В БВ

-	-	PBQ	vWF:Ag	vWF:Rco	vWF:CB	НМФМ	СМФМ	ВМФМ	Все формы мультимеров
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBQ	P-test	1,000	0,274	-0,014	-0,133	-0,626	-0,461	-0,495	-0,549
	Sign.	--	0,344	0,963	0,649	0,017	0,097	0,072	0,042
vWF:Ag	P-test	0,274	1,000	0,620	0,591	-0,672	-0,837	-0,679	-0,830
	Sign.	0,344	--	0,005	0,008	0,002	0,001	0,001	0,001
vWF:Rco	P-test	-0,014	0,620	1,000	0,617	-0,298	-0,441	-0,446	-0,454
	Sign.	0,963	0,005	--	0,005	0,216	0,058	0,056	0,051
vWF:CB	P-test	-0,133	0,591	0,617	1,000	0,082	-0,360	-0,396	-0,263
	Sign.	0,649	0,008	0,005	--	0,737	0,130	0,093	0,276
НМФМ	P-test	-0,626	-0,672	-0,298	0,082	1,000	0,786	0,523	0,846
	Sign.	0,017	0,002	0,216	0,737	--	0,001	0,022	0,001
СМФМ	P-test	-0,461	-0,837	-0,441	-0,360	0,786	1,000	0,781	0,961
	Sign.	0,097	0,001	0,058	0,130	0,001	--	0,001	0,001
ВМФМ	P-test	-0,495	-0,679	-0,446	-0,396	0,523	0,781	1,000	0,791
	Sign.	0,072	0,001	0,056	0,093	0,022	0,001	--	0,001
Все формы мультимеров в	P-test	-0,549	-0,830	-0,454	-0,263	0,846	0,961	0,791	1,000
	Sign.	0,042	0,001	0,051	0,276	0,001	0,001	0,001	--

Примечание: PBQ – выраженность клинических проявлений в баллах; vWF:Ag – антиген фактора Виллебранда; vWF:RCo – ристомицин-кофакторная активность фактора Виллебранда; vWF:CB – коллаген-связывающая активность фактора Виллебранда; НМФМ - низкомолекулярные формы мультимеров vWF; СМФМ - среднемолекулярные формы мультимеров vWF; ВМФМ - высокомолекулярные формы мультимеров vWF

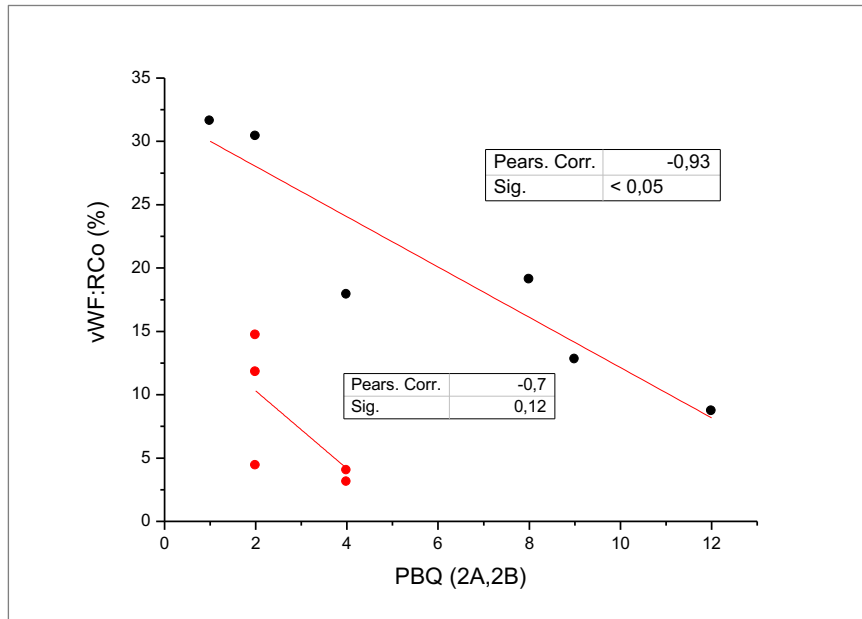


Рисунок 24 – Корреляция активности vWF и PBQ у пациентов с типами 2А и 2В БВ (критерий Пирсона). Красными точками выделены пациенты с низкими значениями vWF:RCo и низкими баллами кровоточивости. vWF:RCo – ристомицин-кофакторная активность фактора Виллебранда; PBQ – выраженность клинических проявлений в баллах; 2А – тип 2А болезни Виллебранда; 2В – тип 2В болезни Виллебранда

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

БВ является крайне разнообразной по клиническим проявлениям геморрагической коагулопатией. Причем разнообразие связано не только с наличием различных типов БВ, а также с высокой вариабельностью выраженности симптомов между различными типами и в рамках одного типа БВ у разных пациентов [8]. Лабораторная диагностика БВ осложняется размером самой молекулы vWF, состоящей из большого количества доменов, каждый из которых выполняет одну или более функций.

В обследованной группе пациентов тяжесть клинических проявлений оценивалась с использованием стандартизированного детского опросника RBQ, который позволяет в течение короткого промежутка времени количественно оценить выраженность анамнестических проявлений геморрагического синдрома, что особенно важно у детей. Данный опросник показал себя как хороший инструмент в диагностике нарушений свертывающей системы у детей благодаря высокой отрицательной прогностической ценности [171]. Однако, в зарубежной литературе встречается всего несколько исследований, валидирующих данный опросник. Самым крупным среди зарубежных работ является исследование Bowman M. et al, 2009 г., в котором приняли участие 151 ребенок в возрасте от 8 мес. до 18 лет, обратившихся с жалобами на геморрагические проявления к гематологу. Пороговое значение было определено в 2 балла. Из 36 пациентов с положительным баллом кровотечения (больше 2), диагноз БВ был установлен только у 5. Чувствительность и специфичность были определены 83% и 79% соответственно [66]. Данное исследование сильно ограничено в плане валидации опросника, поскольку лабораторная диагностика была выполнена только для верификации БВ. Другие исследования, направленные на выявление иных патологий системы гемостаза в рамках работы Bowman M. et al. не проводились. Прогностическая способность опросника также была оценена Marcus P.D. et al. 2011. В исследование были включены дети в возрасте от 0 до 17 лет, обратившиеся с жалобами на кровоточивость к гематологу. В отличие от Bowman M. et al., помимо лабораторной диагностики БВ, пациентам были проведены тесты оценки

функциональной активности тромбоцитов (PFA100, световая агрегометрия), чувствительность и специфичность опросника были признаны неудовлетворительными, хотя отрицательная прогностическая ценность в диагностике БВ 1 типа была высокой [171].

Яфошкиной Т.Ю. и соавт. была проведена более подробная оценка предиктивной способности опросника. В исследование были включены 346 пациентов в возрасте до 18 лет, которым помимо диагностики БВ были проведены лабораторные исследования плазменного и тромбоцитарного звена, позволяющие диагностировать большую часть геморрагических болезней. Из 346 пациентов диагноз был установлен у 174, среди которых 34 пациента с БВ. При использовании порогового значения в 2 балла, чувствительность метода составляла 98%, специфичность – 12%. Наиболее оптимальное соотношение чувствительности и специфичности достигалось при использовании порогового значения в 4 балла, однако, как демонстрирует текущее исследование, более трети пациентов (38,6%) имеют балл кровоточивости 2 и менее и могут быть упущены в диагностике при применении порогового уровня в 4 балла [4].

Степень выраженности клинических проявлений, которая была оценена с помощью опросника RBQ, различалась для разных типов БВ. Вполне закономерно, средний балл был выше у пациентов с типом 3 БВ, в то время как для типа 2 характерна высокая вариабельность клинических проявлений от незначительных до тяжелых, требующих обращения за медицинской помощью и медикаментозной коррекции кровотечений. Тяжесть клинических проявлений по шкале кровоточивости RBQ в зависимости от типа БВ достоверно не отличалась среди пациентов с первым (медиана 3 балла) и вторым (медиана 4 балла) типами БВ ($p = 0,5$). Достоверно отличалась группа пациентов с тяжелым типом 3 БВ (медиана 7 баллов) от второго и первого типов соответственно ($p = 0,02$). При сравнении с опубликованными данными по взрослым пациентам, мы наблюдаем значительно более низкий балл кровоточивости для всех типов БВ. Так, для взрослых пациентов с первым типом БВ медиана баллов кровоточивости составила 9 баллов, со вторым типом - 13 баллов, с третьим типом – 19,5 баллов по стандартизированному опроснику для взрослых ISTH BAT [56].

Лица мужского и женского пола в равной степени подвержены риску развития БВ, однако частота развития геморрагических проявлений у женщин несколько выше, чем у мужчин. Связано это с менструацией и родами, выявляемость БВ типа 1 почти в 3 раза выше у женщин по сравнению с мужчинами [23]. В текущей работе среди пациентов до 18 лет распределение по полу составило: 31 (44,3%) девочек и 39 (55,7%) мальчиков, что подчеркивает одинаковую выявляемость данного заболевания у детей вне зависимости от пола.

В настоящем исследовании распределение пациентов по типу БВ несколько отличалось от литературных данных – тип 1 был установлен у 41 (58,6%) детей, тип 2 выявлен у 22 (31,4%) детей, тип 3, наиболее тяжелый клинически, выявлен у 7 (10%) пациентов [32]. Увеличение количества выявленных больных с типами 2 и 3 БВ связано с более выраженными клиническими проявлениями, вынуждающими пациентов раньше обращаться за медицинской помощью. С другой стороны, уменьшение типа 1 БВ относительно литературных данных, связано с отсутствием серьезных клинических проявлений, низкой настороженностью родителей пациентов и специалистов в регионах, низкие диагностические возможности лабораторий, либо же их полное отсутствие. Кроме того, необходимо учитывать и тот факт, что направление пациентов осуществлялось в том числе и в тех случаях, когда региональные лабораторные возможности не позволяли уточнить тип заболевания. Также снижение количества диагностированных пациентов с типом 1 может быть связано с носительством мутаций в гене vWF , которые фенотипически являются бессимптомными. Таким образом, в ходе данного исследования продемонстрирована не истинная распространенность типов БВ. Полученные данные по распределению типов БВ у детей отчасти сходны с результатами крупнейшего зарубежного исследования, где были проанализированы данные 664 взрослых пациентов с установленной БВ, из которых типу 1 соответствовали 59 % пациентов, типу 2 – 37 % и типу 3 – 4 % [56]. Ведущими симптомами кровоточивости в нашей группе детей оказались СРНК и КГС (74% случаев и 64% случаев соответственно), в отличие от группы взрослых пациентов, где наиболее часто встречались меноррагии у пациентов женского пола (85% среди женщин с БВ), КГС (77%), кровотечения после удаления зубов (63%), послеоперационные

кровотечения (58%) [9, 186]. Была проведена оценка возраста дебюта заболевания в зависимости от типа БВ и длительность постановки диагноза. Ожидается, что наиболее рано, в большинстве случаев сразу после рождения, проявляет себя тип 3 БВ, что позволяет за короткий промежуток времени (медиана 1 г., минимально 1 мес., максимально 3 г.) поставить диагноз и начать профилактику жизнеугрожающих кровотечений. Для большинства пациентов со 2 типом БВ возраст дебюта не превышал 5-ти лет, за исключением 4 пациентов, для которых возраст дебюта составил от 8 до 16 лет. Первый тип БВ оказался наиболее вариативным по возрасту дебюта – клинические проявления у пациентов могли начинаться с рождения, или же только в подростковом возрасте. Длительность постановки диагноза для типов 1 и 2 БВ достоверно ($p = 0,64$) не отличалась и было связано со схожим средним возрастом дебюта для этих типов, так и зависело от настороженности родителей, диагностических возможностей в регионах проживания пациентов и характера клинических проявлений. Так, для большинства пациентов 2В типа характерно снижение количества тромбоцитов различной степени выраженности. На основании снижения количества тромбоцитов 4 из 7 пациентов был установлен диагноз иммунная тромбоцитопеническая пурпура (ИТП), и была проведена терапия первой линии лечения, включающая внутривенный иммуноглобулин и глюкокортикостероиды. Несмотря на наличие гематологического ответа у 3 из 4 пациентов на проводимую терапию, геморрагический синдром сохранялся, диагностический поиск возобновлялся до постановки диагноза БВ. Также показано, что с возрастом средний балл кровоточивости увеличивается у взрослых пациентов – каждые 10 лет жизни увеличивает балл кровоточивости на 0,8 (95% ДИ 0,4-1,1) [56]. У детей, медиана баллов кровоточивости имеет незначительную тенденцию к снижению с увеличением возраста пациентов в момент постановки диагноза, хотя достоверных отличий между группами детей до 1 года, от 1 года до 5 лет, от 6 лет до 10 лет и от 11 до 18 лет не выявлено (рисунок 9 А,Б). Однако, стоит отметить, что в текущей работе не проводилось динамическое исследование РВQ. С одной стороны, чем тяжелее протекает заболевание, тем раньше родители пациента обращаются к гематологу с жалобами на клинические проявления геморрагического синдрома, а

чем легче тяжесть БВ – тем дольше пациенты могут жить бессимптомно, вследствие отсутствия тех или иных пусковых факторов развития кровоточивости. С другой стороны, чем взрослее ребенок, тем больше добавляется факторов риска развития клинических проявлений, таких как физическая активность, травмы, оперативные вмешательства, смена зубов, менструации у девушек. Так, среди группы обследуемых пациентов 15,6% составили девушки старше 11 лет, при этом у 36,4% этих девушек отмечались полименоррагии. Частота меннорагий же среди всех девушек ($n = 31$) составила 12,9 %. Кроме того, не менее трети пациентов с клиническими проявлениями кровоточивости требуют госпитализации для купирования геморрагических проявлений, проведения заместительной трансфузионной терапии СЗП, ЭР-массой, концентратом vWF+FVIII.

Лабораторная диагностика БВ осуществлялась с использованием всех доступных коагулологических методик. Снижение активности vWF менее 50% наблюдалось у всех пациентов, включенных в исследование, тогда как антиген vWF был снижен только у 72,4% (Рисунок 15). Нормальное значение количества vWF имели более четверти пациентов (25,7%), из них 52% - пациенты с типом 1 БВ и 48% - пациенты с различными типами 2 (2А, 2В, 2М). Использование скрининговых коагулологических методик, таких, как АЧТВ, малоэффективно ввиду нечувствительности последнего к дефектам молекулы vWF, за исключением тяжелых форм и типа 2N, при которых значимо снижается активность FVIII плазмы крови, что приводит к удлинению АЧТВ. Полученные нами данные демонстрируют, что определение антигена vWF не позволяет диагностировать качественные дефекты молекулы vWF у части пациентов, несмотря на рекомендации различных сообществ [164]. При отсутствии диагностических возможностей одновременно проводить исследование как антигена, так и ристомицин-кофакторной активности vWF, тестом выбора, безусловно, будет являться функциональный тест, позволяющий с большей вероятностью исключить или заподозрить у пациента БВ, в дальнейшем направив образцы плазмы в лаборатории, имеющие диагностические возможности по постановке и типированию БВ. Мультимерный анализ структуры vWF у пациентов соответствовал установленными типами БВ у 98,6% пациентов, а у 1,4%

мультимерный анализ позволил уточнить подтип заболевания. Так, у пациента №21 лабораторная картина соответствовала типу 2А БВ, ввиду значительного снижения результата $vWF:CB$, что характерно для отсутствия ВМФМ. Однако, при проведении МА был установлен нормальный мультимерный состав vWF , а снижение $vWF:CB$ в данном случае связано с нарушением функциональных свойств домена А3 vWF . Таким образом, у пациента №21 (Таблица 4) наиболее вероятен тип 2М БВ. Полученные данные по способности МА диагностировать БВ и полезность в типировании БВ согласуется с данными, полученными на большой группе пациентов с БВ в Испании [137].

Мультимерный анализ, как и коллаген-связывающая способность vWF , относится к группе уточняющих тестов, позволяющих, согласно последним рекомендациям по диагностике и лечению БВ, дифференцировать между собой типы 2А, 2В и 2М по наличию или отсутствию высокомолекулярных форм мультимеров vWF [45]. Выбор теста между МА и $vWF:CB$ на данный момент остается за лабораторией, по имеющимся диагностическим возможностям, вклад МА в диагностический процесс БВ значительно выше $vWF:CB$ [137; 180]. При сравнении двух диагностических алгоритмов, включающих МА в одном и $vWF:CB$ в другом, диагноз был установлен у 50,4% (242 пациента) с помощью МА и у 33,1% (159 пациентов) с помощью $vWF:CB$ соответственно [137].

Проведя исследование пропускной способности геля Sebia с помощью молекулярных меток, были установлены границы разделения различных форм мультимеров vWF : низкомолекулярных, средних и тяжелых. Оценка пропускной способности геля Hydragel 5 была выполнена ввиду отсутствия достоверных источников в литературе относительно распределения мультимерных форм vWF в геле Sebia. Полученные в текущей работе результаты оказались отличны от данных, представленных в двух зарубежных исследованиях [129; 180]. Так, НМФМ соответствовала первая полоса сверху на геле, СМФМ – вторая и третья полоса. ВМФМ были представлены полосами 4 и далее. Такое распределение хорошо согласуется с известным фактом, что ВМФМ должны составлять у здорового человека не менее 70% от всех форм мультимеров vWF [55].

В текущей работе были определены интервалы для оптической плотности количества различных форм мультимеров vWF группы сравнения на образцах плазм здоровых добровольцев: 186,4 о.е. (171,9 – 200,9) для ВМФМ, 211,5 о.е. (193,8 – 229,2) для СМФМ и 217,6 о.е. (207,1 – 228) для НМФМ соответственно. Зависимость между количеством мультимеров и единицами оптической плотности обратная – чем ниже значение плотности, тем больше количество. Выявлены достоверные отличия ($p < 0,05$) в оптической плотности у пациентов с типами 1 (239,2 о.е.), 2А (223,9 о.е.), 2В (211,5 о.е.) и типом 3 БВ (239,8 о.е.) по сравнению с здоровыми добровольцами при оценке количества всех мультимерных форм. Учитывая тот факт, что большая часть vWF представлена высокомолекулярными формами, выявлены достоверные отличия в группах пациентов с типами 1, 2А, 2В и типом 3 по результатам количественной оценки ВМФМ vWF. При оценке количества СМФМ выявлено достоверное ($p < 0,05$) отличие между пациентами с типом 1 и 3 БВ по сравнению с контрольной группой и связано со снижением общего количества белка по сравнению с нормой. Также у пациентов с типами 2В и у части пациентов с 2А было выявлено повышение количества СМФМ и НМФМ, что связано с относительным преобладанием данных мультимерных форм у этих пациентов, вследствие повышенной продукции и ускоренной элиминации ВМФМ при типе 2В БВ [175], нарушения мультимеризации, димеризации, либо ускоренного протеолиза vWF ферментом ADAMTS13 при типе 2А БВ [33].

Выявленные изменения мультимерного профиля при различных типах БВ соотносятся с результатами других лабораторных исследований. Так, при 1 типе БВ наблюдалось снижение количества всех мультимерных форм без нарушения соотношения по сравнению с нормальным профилем. Анализ визуальной оценки результатов исследования мультимеров vWF продемонстрировала обратную корреляционную связь с уровнем антигена vWF ($r_s = -0,79, p < 0,001$) – чем меньше яркость полос, тем выше концентрация vWF. Также была отмечена корреляционная зависимость между количеством ВМФМ и vWF:СВ ($r_s = -0,73, p < 0,001$), между количеством ВМФМ и vWF:RCo ($r_s = -0,75, p < 0,001$). Как известно, VWF:СВ и vWF:RCo оценивают функциональную активность молекулы vWF в связывании с коллагеном и тромбоцитами, и именно ВМФМ играют

ключевую роль в данном механизме [71]. Полученные данные хорошо согласуются с проведенными ранее исследованиями, направленными на количественную оценку мультимеров vWF, однако данные исследования проводились лишь с целью использования количественной оценки мультимерного профиля как дополнительного инструмента в диагностике БВ, а также поиск новых нарушений со стороны молекулы vWF, без учета клинических проявлений [132; 180]. В текущем исследовании впервые была предпринята попытка оценки взаимосвязи количественного распределения мультимеров vWF и тяжести клинических проявлений. При оценке данных пациентов со всеми типами БВ не было выявлено связи между тяжестью кровоточивости по шкале PBQ с результатами оценки vWF (vWF:Ag, vWF:RCo, vWF:CB), не установлено связи также и для группы пациентов с типом 1 БВ. Для подгруппы пациентов с типами 2А и 2В БВ, для которых характерна потеря ВМФМ, корреляционная зависимость между шкалой PBQ и количеством ВМФМ установлена как умеренная, и выявлен тренд ($r_s = -0,5$, $p = 0,07$). Интересно, что было выявлено наличие обратной корреляционной зависимости между тяжестью кровоточивости по шкале PBQ и количеством низкомолекулярных форм мультимеров vWF ($r_s = -0,63$, $p = 0,02$). Соответственно, чем больше НМФМ у пациента с типом 2А или 2В, тем тяжелее протекает заболевание. Возможно, данная зависимость связана с малой выборкой пациентов и не в полной мере отражает реальную картину, необходимо исследовать большее количество пациентов и независимую сплошную выборку для подтверждения полученной закономерности. Также нами были исследованы взаимосвязи между клиническими проявлениями и стандартными лабораторными тестами оценки БВ. В отличие от когорты взрослых пациентов, где наблюдалась обратная линейная корреляция количества баллов по шкале кровоточивости и активности vWF [56; 163]. В исследуемой группе пациентов детского возраста наблюдалось несоответствие между степенью тяжести клинических проявлений и уровнем снижения активности vWF. При, казалось бы, значительном снижении активности vWF менее 5%, количество баллов по шкале PBQ у отдельных пациентов составляет 2 - 4 балла. Это пациенты в возрасте 1 г., 4 мальчика и одна девочка, и низкий балл кровоточивости связан, скорее всего, со сниженной физической

активностью детей до года и малым количеством провоцирующих факторов (травмы). При исключении данных пациентов из анализа, vWF:RCo демонстрирует выраженную обратную корреляционную зависимость со шкалой кровоточивости PBQ ($r_s = -0,93, p < 0,05$).

Учитывая особенности лабораторной диагностики в нашей стране, был разработан алгоритм диагностики БВ, основанный на определении активности vWF у детей с геморрагическим синдромом (Рисунок 25).

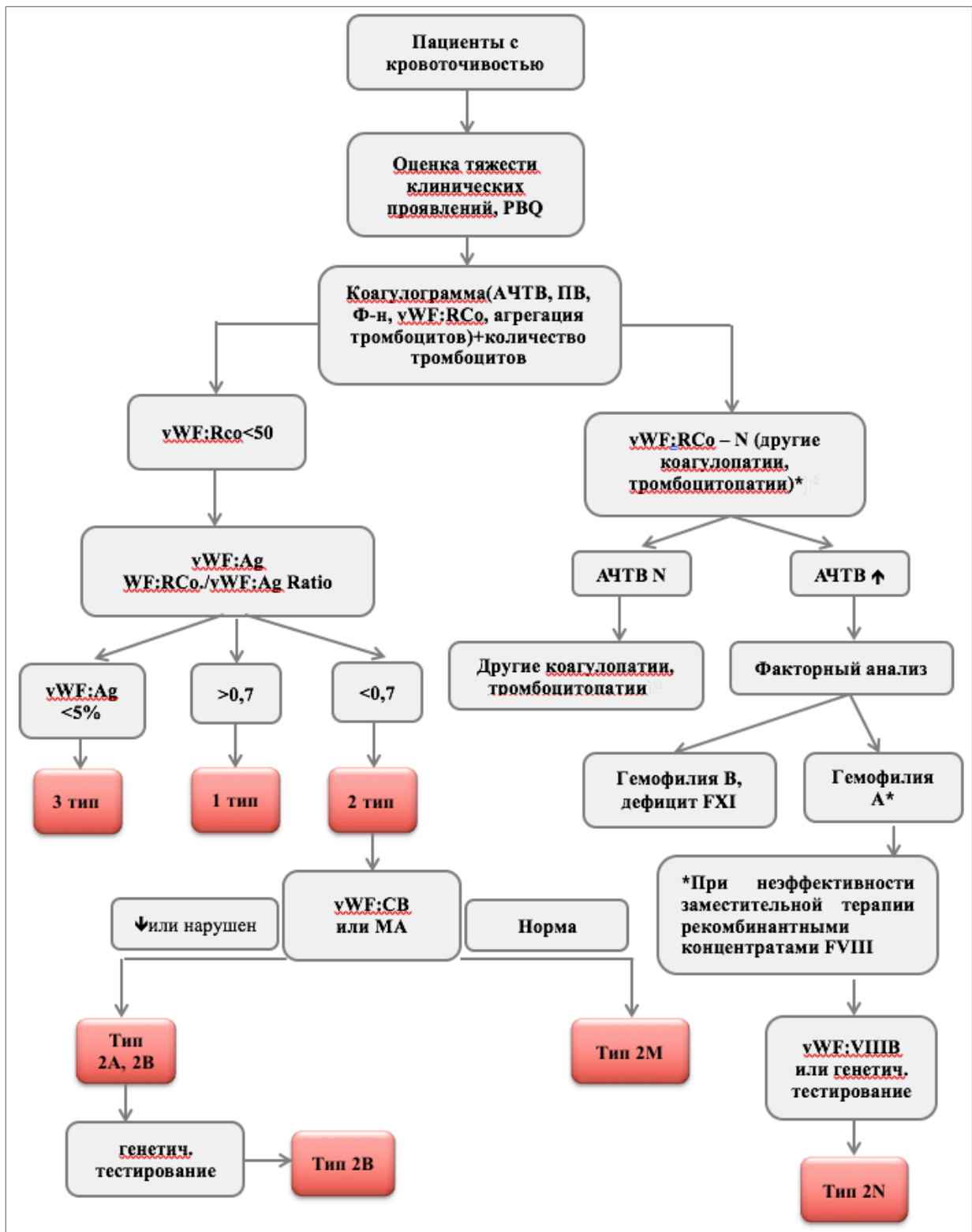


Рисунок 25 – Алгоритм диагностики болезни Виллебранда

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного исследования можно заключить, что клинические проявления БВ у детей полиморфны, но в большинстве своем носят нетяжелый характер, медиана баллов кровоточивости валидированного ранее опросника RBQ составила 3 балла, более трети пациентов (38,6%) имели минимальные проявления геморрагического синдрома. Несмотря на это, значимая часть пациентов имела выраженные проявления геморрагического синдрома, потребовавшие госпитализации. Было показано, что возраст дебюта заболевания зависит от типа болезни, ожидаемо, наиболее тяжелый по клиническим проявлениям 3 тип дебютирует в первые месяцы жизни ребенка (медиана 0,1 г.). Несмотря на раннее появление клинических проявлений кровоточивости, окончательный диагноз у некоторых пациентов был установлен только в 3 г. Для второго и первого типов БВ наблюдался достаточно широкий разброс в дебюте геморрагических проявлений – от 6 мес. до 16 лет, некоторым пациентам окончательный диагноз БВ устанавливался только спустя 10 лет от момента дебюта заболевания.

Отсутствие у пациента, отягощенного по геморрагическим проявлениям, семейного анамнеза не исключает наличие БВ: по данным проведенного исследования, отягощенный семейный анамнез отмечен у 47,3% пациентов, в то время как большая часть пациентов (85,7%) с тяжелым 3 типом не имели отягощенного геморрагического анамнеза. Ведущими клиническими проявлениями геморрагического синдрома у детей явились спонтанные рецидивирующие носовые кровотечения и кожный геморрагический синдром. В отличие от взрослых пациентов, частота меноррагий составила 6%, что связано с возрастом обследования и постановки диагноза. У детей не отмечено случаев кровоизлияния в ЦНС. Желудочно-кишечные и послеоперационные кровотечения наблюдались у детей с 1 и 2 типами БВ, и не отмечены у пациентов с 3 типом БВ, что возможно связано с более ранней постановкой диагноза и адекватной заместительной профилактикой.

В ходе анализа данных были установлены особенности течения для 2В типа БВ. Так, у 7 из 8 пациентов отмечено снижение количества тромбоцитов различной степени выраженности в дебюте заболевания. Четверым пациентам был установлен диагноз ИТП и проведена терапия первой линии (ВВИГ, ГКС), трое пациентов достигли кратковременного гематологического ответа, однако клинические проявления геморрагического синдрома сохранялись даже на фоне нормализации количества тромбоцитов.

В ходе проведенного исследования, с использованием молекулярных лестниц, были установлены границы распределения различных мультимерных форм vWF в зависимости от размера молекулы, которые значительно отличались от границ, указанных производителем. С учетом полученных данных, установлены референсные интервалы для различных мультимерных групп – НМФМ, СМФМ и ВМФМ. Дальнейшая количественная оценка позволила проанализировать связь количества мультимерных форм с тяжестью клинических проявлений. Текущее исследование показало отсутствие зависимости между количеством ВМФМ vWF, как основных функционально активных форм, и степенью тяжести геморрагического синдрома. Также не было отмечено корреляционных связей между клиническими проявлениями и результатами лабораторных исследований БВ: АЧТВ, vWF:Ag, vWF:RCo. Таким образом, БВ остается сложным для диагностики заболеванием, требующим проведения большого количества лабораторных исследований различного уровня. Учитывая полученные данные, наибольшей диагностической ценностью обладает активность vWF, так как результаты данного исследования снижаются при большинстве случаев течения БВ и является методикой выбора для исключения заболевания. Однако результаты активности vWF не позволяют оценить степень тяжести геморрагического синдрома и риск развития кровотечений при различных стимулирующих факторах, таких как травма или оперативное вмешательство.

Мультимерный анализ, используемый в ходе текущего исследования, остается сложной и редкой методикой, требующей большого количества времени для выполнения по сравнению с другими методиками оценки vWF. Однако вклад в диагностический процесс постановки БВ остается востребованным, но только в

редких спорных случаях, как например, в описанном в ходе исследования случае пациента с 2М типом БВ.

5.1 Перспективы дальнейшего развития темы диссертации

В перспективе развития темы планируется исследовать количество мультимерных изоформ у пациентов с приобретенной формой БВ, а именно с эссенциальной тромбоцитемией, истинной полицитемией. Изучение изменения количества высокомолекулярных форм мультимеров vWF у этих пациентов позволит лучше понять механизмы развития приобретенной БВ, оценить возможные связи нарушений структуры vWF и клиническими проявлениями. Также, для оптимизации процедуры алгоритма количественной оценки мультимеров vWF, целесообразно использовать элементы искусственного интеллекта для автоматизации процессов обработки изображений гелей на программном обеспечении ImageJ. Это позволит в значительной мере стандартизировать методику, снизив зависимость получаемых результатов от оператора.

ВЫВОДЫ

1. Медиана возраста дебюта БВ составила 2 года (0-16 лет). Среди геморрагических проявлений преобладали носовые кровотечения (74%) и КГС (64%), медиана балла РВQ составила 3 балла, 30% случаев кровоточивости приводили к анемизации, 34% пациентов потребовалась госпитализация для купирования геморрагического синдрома, в 30% случаев потребовалось проведение заместительной терапии СЗП/концентратами FVIII+vWF. У 47,1% детей с БВ был отягощенный по геморрагическим эпизодам семейный анамнез.

2. Установлены границы распределения мультимерных форм vWF для различных мультимерных форм в группе условно здоровых взрослых.

3. Выявлена сильная корреляционная зависимость антигена vWF и количества мультимеров ($r_s = -0,79, p < 0,001$). Выявленное распределение мультимеров vWF соответствовало ранее установленному типу у 98,6% пациентов, и у 1,4% позволило уточнить тип заболевания.

4. Для 2А и 2В типов выявлена обратная ($-0,63 p = 0,02$) связь НМФМ и степенью кровоточивости РВQ. Для ВМФМ корреляция отмечена как умеренная и не достоверная ($-0,46, p = 0,97$). Для других групп БВ выраженной корреляции между клиническими проявлениями и результатами количественной оценки мультимерного профиля, а также данными других лабораторных исследований не выявлено.

5. Разработан алгоритм диагностики БВ, основанный на определении активности vWF у детей с геморрагическим синдромом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Отсутствие отягощенного семейного анамнеза, а также $PVQ \leq 2$ баллов, не является критерием, исключающим БВ у ребенка.
2. Наличие анамнестического ответа на терапию ВВИГ или ГКС у пациента с ИТП не является критерием исключения БВ у ребенка. При сохранении геморрагических проявлений необходимо исключить БВ.
3. Исследование показателей АЧТВ и $vWF:Ag$ не позволяют полностью исключить БВ у детей. В качестве скринингового метода для выявления БВ рекомендуется использовать исследование активности vWF .
4. Исследование активности и мультимерного состава vWF не может служить единственным критерием для оценки тяжести и прогноза клинического течения БВ у детей.
5. Для оценки мультимерного профиля vWF с помощью набора Sebia необходимо использовать результаты распределения мультимерных форм vWF , полученные при обследовании группы здоровых взрослых.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ADAMTS-13 – металлопротеиназа (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13)

ASGPR-рецептор – (asialoglycoprotein receptor, или рецептор Эшвелла-Морелла)

CV – коэффициент вариации

FVIII – фактор VIII

FVIII:C – активность фактора FVIII

GP1b α – рецептор на мембране тромбоцитов

ISTH – the International Society of Thrombosis and Homeostasis

PBQ – pediatric bleeding questionnaire

RIPA – ристоцетин-зависимая агрегация тромбоцитов

vWF – фактор Виллебранда

VWF – ген, кодирующий VWF

vWF:RC₀ – ристоцетин кофакторная активность фактора Виллебранда

vWF :Ag– антиген фактора Виллебранда

vWF:CB – коллагенсвязывающая активность фактора Виллебранда

vWF:FVIII – FVIII-связывающая способность фактор Виллебранда

БВ – болезнь Виллебранда

ВВИГ – внутривенный иммуноглобулин

ВМФМ – высокомолекулярные формы мультимеров vWF

ГКС – глюкокортикостероиды

ЖКК – желудочно-кишечные кровотечения

ИТП – иммунная тромбоцитопения

КГС – кожный геморрагический синдром

МА – мультимерный анализ

НМФМ – низкомолекулярные формы мультимеров

ОБТП – обогащенная тромбоцитами плазма

п.о. – пара оснований

СЗП – свежезамороженная плазма

СМФМ – среднемолекулярные формы мультимеров

СРНК – спонтанные рецидивирующие носовые кровотечения

ФС – фосфатидилсерин

ЦНС – центральная нервная система

ЭР-масса – эритроцитная масса

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зозуля Н.И., Аль-Ради Л.С., Андреева Т.А., Галстян Г.М., Жарков П.А., Мамаев А.Н., Петров В.Ю., Полянская Т.Ю. Российские клинические рекомендации по лечению гемофилии / Зозуля Н.И., Аль-Ради Л.С., Андреева Т.А., Галстян Г.М., Жарков П.А., Мамаев А.Н., Петров В.Ю., Полянская Т.Ю. – 2023.
2. Клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Виллебранда / Зозуля Н.И., Кумскова М.А., Лихачева Е.А., Свирин П.В. – 2018.
3. Мультимерный анализ фактора Виллебранда: новые диагностические возможности / А. В. Полетаев, Е. А. Серегина, А. В. Пшонкин [и др.] // Российский журнал детской гематологии и онкологии. – 2021. – Т. 8. – Von Willebrand factor multimeric assay. – № 2. – С. 35-41.
4. Оценка чувствительности и специфичности детского опросника кровоточивости при различных геморрагических заболеваниях / Т. Ю. Яфошкина, Д. Б. Флоринский, А. В. Пшонкин [и др.] // Педиатрия им. Г.Н. Сперанского. – 2021. – Т. 100. – № 3. – С. 35-41.
5. Папаян Л. П. Болезнь Виллебранда: структура и функция фактора Виллебранда, классификация, клиническая картина и основные принципы диагностики / Л. П. Папаян. – 2012. – Т. 11. – № 4. – С. 5-11.
6. Современные возможности дистанционной диагностики болезни Виллебранда у детей, проживающих на территории Российской Федерации / А. В. Полетаев, Е. А. Серегина, Д. В. Федорова, П. А. Жарков // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2020. – Т. 19. – № 3. – С. 54-60.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays (5th edn., H21-A5). Wayne, PA: CLSI. – 2008.
8. Laboratory phenotype variability in genetically proven von Willebrand disease type 2B / S. Marten, R. Knöfler, K. Trautmann, O. Tiebel. – Текст : электронный. – 2021. – URL: <http://rgdoi.net/10.13140/RG.2.2.30111.48800> (дата обращения: 14.05.2024).

9. Reevaluation of von Willebrand disease diagnosis in a Croatian paediatric cohort combining bleeding scores, phenotypic laboratory assays and next generation sequencing: a pilot study / R. Zadro, D. Rogić, D. Coen-Herak [и др.] // *Biochemia medica*. – 2022. – Т. 32. – Reevaluation of von Willebrand disease diagnosis in a Croatian paediatric cohort combining bleeding scores, phenotypic laboratory assays and next generation sequencing. – № 1. – С. 85-97.
10. [Von Willebrand disease in the Netherlands: the WiN study] / Y. V. Sanders, E. M. de Wee, K. Meijer [и др.] // *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde*. – 2014. – Т. 158. – [Von Willebrand disease in the Netherlands. – С. A6518.
11. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions / J. Dong, J. L. Moake, L. Nolasco [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol. 100. – № 12. – P. 4033-4039.
12. Age dependency for coagulation parameters in paediatric populations: Results of a multicentre study aimed at defining the age-specific reference ranges / P. Toulon, M. Berruyer, M. Brionne-François [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2016. – Vol. 116. – Age dependency for coagulation parameters in paediatric populations. – № 07. – P. 9-16.
13. Altered glycosylation of platelet-derived von Willebrand factor confers resistance to ADAMTS13 proteolysis / R. T. McGrath, M. Van Den Biggelaar, B. Byrne [et al.] // *Blood*. – 2013. – Vol. 122. – № 25. – P. 4107-4110.
14. Bowen D. J. An amino acid polymorphism in von Willebrand factor correlates with increased susceptibility to proteolysis by ADAMTS13 / D. J. Bowen, P. W. Collins // *Blood*. – 2004. – Vol. 103. – № 3. – P. 941-947.
15. Collins T. J. ImageJ for microscopy / T. J. Collins // *BioTechniques*. – 2007. – Vol. 43. – № 1S. – P. S25-S30.
16. Creation of DICOM—Aware Applications Using ImageJ / D. P. Barboriak, A. O. Padua, G. E. York, J. R. MacFall // *Journal of Digital Imaging*. – 2005. – Vol. 18. – № 2. – P. 91-99.
17. Founder von Willebrand factor haplotype associated with type 1 von Willebrand disease / L. A. O'Brien, P. D. James, M. Othman [et al.] // *Blood*. – 2003. – Vol. 102. – № 2. – P. 549-557.

18. GIBLIN J. P. Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells / J. P. Giblin, L. J. Hewlett, M. J. Hannah // *Blood*. – 2008. – Vol. 112. – № 4. – P. 957-964.
19. GPIb potentiates GPVI-induced responses in human platelets / J. Baker, R. K. L. Griggs, S. Falati, A. W. Poole // *Platelets*. – 2004. – Vol. 15. – № 4. – P. 207-214.
20. Haemostatic variables during normal menstrual cycle: A systematic review / H. Knol, R. F. J. Kemperman, H. C. Kluin-Nelemans [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2012. – Vol. 107. – Haemostatic variables during normal menstrual cycle. – № 01. – P. 22-29.
21. *In vitro* sensitivity of different activated partial thromboplastin time reagents to mild clotting factor deficiencies / P. Toulon, Y. Eloit, M. Smahi [et al.] // *International Journal of Laboratory Hematology*. – 2016. – Vol. 38. – № 4. – P. 389-396.
22. Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII in vivo / C. J. Van Schooten, S. Shahbazi, E. Groot [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 112. – № 5. – P. 1704-1712.
23. Occurrence rates of von Willebrand disease among people receiving care in specialized treatment centres in the United States / J. M. Soucie, C. H. Miller, V. R. Byams [et al.] // *Haemophilia*. – 2021. – Vol. 27. – № 3. – P. 445-453.
24. Real-Time Imaging of the Dynamics and Secretory Behavior of Weibel-Palade Bodies / T. Romani De Wit, M. G. Rondaij, P. L. Hordijk [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2003. – Vol. 23. – № 5. – P. 755-761.
25. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH / M. Cattaneo, C. Cerletti, P. Harrison [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2013. – Vol. 11. – Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry. – № 6. – P. 1183-1189.
26. Reduced ADAMTS13 levels in patients with acute and chronic cerebrovascular disease / F. Denorme, P. Kraft, I. Pareyn [et al.] // *PLOS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – № 6. – P. e0179258.

27. Ruggeri Z. M. Variant von Willebrand's Disease / Z. M. Ruggeri, T. S. Zimmerman // *Journal of Clinical Investigation*. – 1980. – Vol. 65. – № 6. – P. 1318-1325.
28. Stephenson F. H. Quantitation of Nucleic Acids / F. H. Stephenson. – Text : electronic // *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology*. – Elsevier, 2003. – P. 90-108. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780126657517500469> (date accessed: 15.05.2024).
29. The prevalence of the cysteine1584 variant of von Willebrand factor is increased in type 1 von Willebrand disease: co-segregation with increased susceptibility to ADAMTS13 proteolysis but not clinical phenotype / D. J. Bowen, P. W. Collins, W. Lester [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 2005. – Vol. 128. – The prevalence of the cysteine1584 variant of von Willebrand factor is increased in type 1 von Willebrand disease. – № 6. – P. 830-836.
30. von Willebrand Disease in Children: Diagnosis and Management of a Pediatric Cohort in One Single Center in Argentina / M. Bonduel, J. Frontroth, M. Hepner [et al.] // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – 2011. – Vol. 37. – № 05. – P. 560-567.
31. Van Der Meijden P. E. J. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives / P. E. J. Van Der Meijden, J. W. M. Heemskerk // *Nature Reviews Cardiology*. – 2019. – Vol. 16. – Platelet biology and functions. – № 3. – P. 166-179.
32. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA) ¹ / W. L. Nichols, M. B. Hultin, A. H. James [et al.] // *Haemophilia*. – 2008. – Vol. 14. – von Willebrand disease (VWD). – № 2. – P. 171-232.
33. A cluster of mutations in the D3 domain of von Willebrand factor correlates with a distinct subgroup of von Willebrand disease: type 2A/IIIE / R. Schneppenheim, J. J. Michiels, T. Obser [и др.] // *Blood*. – 2010. – T. 115. – A cluster of mutations in the D3 domain of von Willebrand factor correlates with a distinct subgroup of von Willebrand disease. – № 23. – C. 4894-4901.
34. A comparative analysis of different automated von Willebrand factor glycoprotein Ib-binding activity assays in well typed von Willebrand disease patients / I.

Vangenechten, K. Mayger, P. Smejkal [и др.] // Journal of thrombosis and haemostasis: JTH. – 2018. – Т. 16. – № 7. – С. 1268-1277.

35. A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity / A. S. Lawrie, F. Stufano, M. T. Canciani [и др.] // Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia. – 2013. – Т. 19. – № 2. – С. 338-342.

36. A modified SDS agarose gel method for determining factor VIII von Willebrand factor multimers using commercially available reagents / M. A. Miller, J. E. Palascak, M. R. Thompson, O. J. Martelo // Thrombosis Research. – 1985. – Т. 39. – № 6. – С. 777-780.

37. A new variant of dominant type II von Willebrand's disease with aberrant multimeric pattern of factor VIII-related antigen (type IID) / S. Kinoshita, J. Harrison, J. Lazerson, C. F. Abildgaard // Blood. – 1984. – Т. 63. – № 6. – С. 1369-1371.

38. A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD) / A. Toso, F. Rodeghiero, G. Castaman [и др.] // Journal of thrombosis and haemostasis: JTH. – 2006. – Т. 4. – A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease. – № 4. – С. 766-773.

39. A two-centre comparative evaluation of new automated assays for von Willebrand factor ristocetin cofactor activity and antigen / F. Stufano, A. S. Lawrie, S. La Marca [и др.] // Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia. – 2014. – Т. 20. – № 1. – С. 147-153.

40. A web-based registry of inherited bleeding disorders in the region of Emilia-Romagna: results at three and a half years / A. Tagliaferri, G. F. Rivolta, C. Biasoli [и др.] // Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia. – 2008. – Т. 14. – A web-based registry of inherited bleeding disorders in the region of Emilia-Romagna. – № 2. – С. 343-354.

41. Aberrant multimeric structure of von Willebrand factor in a new variant of von Willebrand's disease (type IIC) / Z. M. Ruggeri, I. M. Nilsson, R. Lombardi [и др.] // The Journal of Clinical Investigation. – 1982. – Т. 70. – № 5. – С. 1124-1127.

42. Abnormal VIII: von Willebrand factor patterns in the plasma of patients with the hemolytic-uremic syndrome / J. L. Moake, J. J. Byrnes, J. H. Troll [и др.] // *Blood*. – 1984. – Т. 64. – Abnormal VIII. – № 3. – С. 592-598.
43. An optimized electrophoresis method for high-resolution imaging of von-Willebrand multimers / D. R. Weiss, C. Thiel, E. F. Strasser [и др.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2008. – Т. 100. – № 5. – С. 949-951.
44. Analysis of von Willebrand factor multimers by simultaneous high- and low-resolution vertical SDS-agarose gel electrophoresis and Cy5-labeled antibody high-sensitivity fluorescence detection / H. W. Ott, A. Griesmacher, M. Schnapka-Koepf [и др.] // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2010. – Т. 133. – № 2. – С. 322-330.
45. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease / P. D. James, N. T. Connell, B. Ameer [и др.] // *Blood Advances*. – 2021. – Т. 5. – № 1. – С. 280-300.
46. Bleeding spectrum in children with moderate or severe von Willebrand disease: Relevance of pediatric-specific bleeding / Y. V. Sanders, K. Fijnvandraat, J. Boender [и др.] // *American Journal of Hematology*. – 2015. – Т. 90. – Bleeding spectrum in children with moderate or severe von Willebrand disease. – № 12. – С. 1142-1148.
47. Blenner M. A. Structural basis of regulation of von Willebrand factor binding to glycoprotein Ib / M. A. Blenner, X. Dong, T. A. Springer // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Т. 289. – № 9. – С. 5565-5579.
48. Characterization of VWF gene conversions causing von Willebrand disease / F. Ahmad, M. Kannan, T. Obser [и др.] // *British Journal of Haematology*. – 2019. – Т. 184. – № 5. – С. 817-825.
49. Clearance of von Willebrand factor / C. Casari, P. J. Lenting, N. Wohner [и др.] // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2013. – Т. 11 Suppl 1. – С. 202-211.
50. Common VWF exon 28 polymorphisms in African Americans affecting the VWF activity assay by ristocetin cofactor / V. H. Flood, J. C. Gill, P. A. Morateck [и др.] // *Blood*. – 2010. – Т. 116. – № 2. – С. 280-286.
51. Comorbidities associated with higher von Willebrand factor (VWF) levels may explain the age-related increase of VWF in von Willebrand disease / F. Atiq, K. Meijer,

- J. Eikenboom [и др.] // *British Journal of Haematology*. – 2018. – Т. 182. – № 1. – С. 93-105.
52. Complement Component C3 Binds to the A3 Domain of von Willebrand Factor / J. G. Nolasco, L. H. Nolasco, Q. Da [и др.] // *TH open: companion journal to thrombosis and haemostasis*. – 2018. – Т. 2. – № 3. – С. e338-e345.
53. Crucial role for the VWF A1 domain in binding to type IV collagen / V. H. Flood, A. C. Schlauderaff, S. L. Haberichter [и др.] // *Blood*. – 2015. – Т. 125. – № 14. – С. 2297-2304.
54. Defective dimerization of von Willebrand factor subunits due to a Cys-> Arg mutation in type IID von Willebrand disease / R. Schneppenheim, J. Brassard, S. Krey [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1996. – Т. 93. – № 8. – С. 3581-3586.
55. Detailed von Willebrand factor multimer analysis in patients with von Willebrand disease in the European study, molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 von Willebrand disease (MCMDM-1VWD) / U. Budde, R. Schneppenheim, J. Eikenboom [и др.] // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2008. – Т. 6. – № 5. – С. 762-771.
56. Determinants of bleeding phenotype in adult patients with moderate or severe von Willebrand disease / E. M. de Wee, Y. V. Sanders, E. P. Mauser-Bunschoten [и др.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2012. – Т. 108. – № 4. – С. 683-692.
57. Disulfide bond reduction of von Willebrand factor by ADAMTS-13 / H.-C. Yeh, Z. Zhou, H. Choi [и др.] // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2010. – Т. 8. – № 12. – С. 2778-2788.
58. Diurnal variation of von Willebrand factor in plasma: the Bispebjerg study of diurnal variations / A. Timm, J. Fahrenkrug, H. L. Jørgensen [и др.] // *European Journal of Haematology*. – 2014. – Т. 93. – Diurnal variation of von Willebrand factor in plasma. – № 1. – С. 48-53.
59. Effects of the mutant von Willebrand factor gene in von Willebrand disease / Z. Zhang, M. Lindstedt, M. Blombäck, M. Anvret // *Human Genetics*. – 1995. – Т. 96. – № 4. – С. 388-394.

60. Eikenboom J. C. Congenital von Willebrand disease type 3: clinical manifestations, pathophysiology and molecular biology / J. C. Eikenboom // Best Practice & Research. Clinical Haematology. – 2001. – Т. 14. – Congenital von Willebrand disease type 3. – № 2. – С. 365-379.
61. Electroblot and immunoperoxidase staining for rapid screening of the abnormalities of the multimeric structure of von Willebrand factor in von Willebrand's disease / R. Lombardi, C. Gelfi, P. G. Righetti [и др.] // Thrombosis and Haemostasis. – 1986. – Т. 55. – № 2. – С. 246-249.
62. Epidemiology and general guidelines of the management of acquired haemophilia and von Willebrand syndrome / P. Collins, U. Budde, J. H. Rand [и др.] // Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia. – 2008. – Т. 14 Suppl 3. – С. 49-55.
63. Evaluation of a new commercial method for von Willebrand factor multimeric analysis / R. A. Crist, N. M. Heikal, G. M. Rodgers [и др.] // International Journal of Laboratory Hematology. – 2018. – Т. 40. – № 5. – С. 586-591.
64. Evaluation of an automated method for measuring von Willebrand factor activity in clinical samples without ristocetin / L. Graf, K. A. Moffat, S. A. Carlino [и др.] // International Journal of Laboratory Hematology. – 2014. – Т. 36. – № 3. – С. 341-351.
65. Evaluation of an automated method for the quantification of von Willebrand factor antigen. Its application in the study of vascular dysfunction / P. Villa, J. Iborra, J. Serra [и др.] // Haematologica. – 2001. – Т. 86. – № 11. – С. 1180-1185.
66. Evaluation of the diagnostic utility for von Willebrand disease of a pediatric bleeding questionnaire / M. Bowman, J. Riddel, M. L. Rand [и др.] // Journal of thrombosis and haemostasis: JTH. – 2009. – Т. 7. – № 8. – С. 1418-1421.
67. Evaluation of the von Willebrand factor antigen (vWF-Ag) assay using an immuno-turbidimetric method (STA Liatest vWF) automated on the MDA 180 coagulometer / K. Sukhu, P. G. Martin, L. Cross [и др.] // Clinical and Laboratory Haematology. – 2000. – Т. 22. – № 1. – С. 29-32.
68. Expression of human factor VIII under control of the platelet-specific alphaIIb promoter in megakaryocytic cell line as well as storage together with VWF / Q. Shi, D.

- A. Wilcox, S. A. Fahs [и др.] // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2003. – Т. 79. – № 1. – С. 25-33.
69. Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5 / J. N. Pegon, M. Kurdi, C. Casari [и др.] // *Haematologica*. – 2012. – Т. 97. – № 12. – С. 1855-1863.
70. Favaloro E. J. An update on the von Willebrand factor collagen binding assay: 21 years of age and beyond adolescence but not yet a mature adult / E. J. Favaloro // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – 2007. – Т. 33. – An update on the von Willebrand factor collagen binding assay. – № 8. – С. 727-744.
71. Favaloro E. J. Appropriate laboratory assessment as a critical facet in the proper diagnosis and classification of von Willebrand disorder / E. J. Favaloro // *Best Practice & Research. Clinical Haematology*. – 2001. – Т. 14. – № 2. – С. 299-319.
72. Favaloro E. J. Lower limit of assay sensitivity: an under-recognised and significant problem in von Willebrand disease identification and classification / E. J. Favaloro, R. Bonar, K. Marsden // *Clinical Laboratory Science: Journal of the American Society for Medical Technology*. – 2008. – Т. 21. – Lower limit of assay sensitivity. – № 3. – С. 178-183.
73. Favaloro E. J. Identification and prevalence of von Willebrand disease type 2N (Normandy) in Australia / E. J. Favaloro, S. Mohammed, J. Koutts // *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*. – 2009. – Т. 20. – № 8. – С. 706-714.
74. Favaloro E. J. Laboratory tests used to help diagnose von Willebrand disease: an update / E. J. Favaloro, L. Pasalic, J. Curnow // *Pathology*. – 2016. – Т. 48. – Laboratory tests used to help diagnose von Willebrand disease. – № 4. – С. 303-318.
75. Fogarty H. New developments in von Willebrand disease / H. Fogarty, D. Doherty, J. S. O'Donnell // *British Journal of Haematology*. – 2020. – Т. 191. – № 3. – С. 329-339.
76. Franchini M. Advances in hematology. Etiology and diagnosis of acquired von Willebrand syndrome / M. Franchini, G. Lippi, E. J. Favaloro // *Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O*. – 2010. – Т. 8. – № 1. – С. 20-24.

77. Furlan M. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis / M. Furlan, R. Robles, B. Lämmle // *Blood*. – 1996. – Т. 87. – № 10. – С. 4223-4234.
78. Furlan M. Von Willebrand factor: molecular size and functional activity / M. Furlan // *Annals of Hematology*. – 1996. – Т. 72. – Von Willebrand factor. – № 6. – С. 341-348.
79. Furlong B. L. An electroblotting technique for the detection of factor VIII/von Willebrand factor multimers in plasma / B. L. Furlong, I. R. Peake // *British Journal of Haematology*. – 1983. – Т. 53. – № 4. – С. 641-653.
80. Gain-of-function GPIb ELISA assay for VWF activity in the Zimmerman Program for the Molecular and Clinical Biology of VWD / V. H. Flood, J. C. Gill, P. A. Morateck [и др.] // *Blood*. – 2011. – Т. 117. – № 6. – С. e67-74.
81. Galen K. P. M. van. Hemophilic arthropathy in patients with von Willebrand disease / K. P. M. van Galen, E. P. Mauser-Bunschoten, F. W. G. Leebeek // *Blood Reviews*. – 2012. – Т. 26. – № 6. – С. 261-266.
82. Gaucher C. Characterization of von Willebrand factor gene defects in two unrelated patients with type IIC von Willebrand disease / C. Gaucher, J. Diéval, C. Mazurier // *Blood*. – 1994. – Т. 84. – № 4. – С. 1024-1030.
83. Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease / J.-M. Chen, D. N. Cooper, N. Chuzhanova [и др.] // *Nature Reviews. Genetics*. – 2007. – Т. 8. – Gene conversion. – № 10. – С. 762-775.
84. Genetic heterogeneity of severe von Willebrand disease type III in the German population / R. Schneppenheim, S. Krey, F. Bergmann [и др.] // *Human Genetics*. – 1994. – Т. 94. – № 6. – С. 640-652.
85. Gershoni J. M. Protein blotting: principles and applications / J. M. Gershoni, G. E. Palade // *Analytical Biochemistry*. – 1983. – Т. 131. – Protein blotting. – № 1. – С. 1-15.
86. Ginsburg D. von Willebrand disease: a database of point mutations, insertions, and deletions. For the Consortium on von Willebrand Factor Mutations and Polymorphisms, and the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis / D. Ginsburg,

J. E. Sadler // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1993. – Т. 69. – von Willebrand disease. – № 2. – С. 177-184.

87. Goodeve A. C. The genetic basis of von Willebrand disease / A. C. Goodeve // *Blood Reviews*. – 2010. – Т. 24. – № 3. – С. 123-134.

88. Heightened interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand's disease / Z. M. Ruggeri, F. I. Pareti, P. M. Mannucci [и др.] // *The New England Journal of Medicine*. – 1980. – Т. 302. – № 19. – С. 1047-1051.

89. High-resolution analysis of von Willebrand factor multimeric composition defines a new variant of type I von Willebrand disease with aberrant structure but presence of all size multimers (type IC) / G. Ciavarella, N. Ciavarella, S. Antoncecchi [и др.] // *Blood*. – 1985. – Т. 66. – № 6. – С. 1423-1429.

90. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction / D. J. Mancuso, E. A. Tuley, L. A. Westfield [и др.] // *Biochemistry*. – 1991. – Т. 30. – Human von Willebrand factor gene and pseudogene. – № 1. – С. 253-269.

91. Identification of a candidate missense mutation in a family with von Willebrand disease type IIC / R. Schneppenheim, K. B. Thomas, S. Krey [и др.] // *Human Genetics*. – 1995. – Т. 95. – № 6. – С. 681-686.

92. Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor / T. Marti, S. J. Rösselet, K. Titani, K. A. Walsh // *Biochemistry*. – 1987. – Т. 26. – № 25. – С. 8099-8109.

93. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease / J. E. Sadler, P. M. Mannucci, E. Berntorp [и др.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2000. – Т. 84. – № 2. – С. 160-174.

94. Impaired intracellular transport produced by a subset of type IIA von Willebrand disease mutations / S. E. Lyons, M. E. Bruck, E. J. Bowie, D. Ginsburg // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – Т. 267. – № 7. – С. 4424-4430.

95. Implications for collagen I chain registry from the structure of the collagen von Willebrand factor A3 domain complex / T. H. C. Brondijk, D. Bihan, R. W. Farndale, E.

G. Huizinga // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2012. – Т. 109. – № 14. – С. 5253-5258.

96. Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor that interact with fibrillar collagen types I and III / F. I. Pareti, K. Niiya, J. M. McPherson, Z. M. Ruggeri // The Journal of Biological Chemistry. – 1987. – Т. 262. – № 28. – С. 13835-13841.

97. Italian Registry of Haemophilia and Allied Disorders. Objectives, methodology and data analysis / A. Iorio, E. Oliovecchio, M. Morfini [и др.] // Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia. – 2008. – Т. 14. – № 3. – С. 444-453.

98. James P. D. von Willebrand disease / P. D. James, A. C. Goodeve // Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics. – 2011. – Т. 13. – № 5. – С. 365-376.

99. Laboratory Testing for Von Willebrand Factor Multimers / S. Oliver, K. K. E. Lau, K. Chapman, E. J. Favaloro // Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.). – 2017. – Т. 1646. – С. 495-511.

100. Laboratory tests for measurement of von Willebrand factor show poor agreement among different centers: results from the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation / S. Kitchen, I. Jennings, T. A. L. Woods [и др.] // Seminars in Thrombosis and Hemostasis. – 2006. – Т. 32. – Laboratory tests for measurement of von Willebrand factor show poor agreement among different centers. – № 5. – С. 492-498.

101. Ledford M. R. A comparative study of three methods for the visualization of von Willebrand factor (vWF) multimers / M. R. Ledford, J. W. Kent, F. Civantos // Thrombosis and Haemostasis. – 1990. – Т. 64. – № 4. – С. 569-575.

102. Ledford-Kraemer M. R. Analysis of von Willebrand factor structure by multimer analysis / M. R. Ledford-Kraemer // American Journal of Hematology. – 2010. – Т. 85. – № 7. – С. 510-514.

103. Leebeek F. W. G. Von Willebrand's Disease / F. W. G. Leebeek, J. C. J. Eikenboom // The New England Journal of Medicine. – 2016. – Т. 375. – № 21. – С. 2067-2080.

104. Lenting P. J. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends / P. J. Lenting, O. D. Christophe, C. V. Denis // *Blood*. – 2015. – Т. 125. – von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance. – № 13. – С. 2019-2028.
105. Lillicrap D. von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy / D. Lillicrap // *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. – 2013. – Т. 2013. – von Willebrand disease. – С. 254-260.
106. Localization of disulfide bonds in the cystine knot domain of human von Willebrand factor / A. Katsumi, E. A. Tuley, I. Bodó, J. E. Sadler // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Т. 275. – № 33. – С. 25585-25594.
107. Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor / G. Rastegarlar, J. N. Pegon, C. Casari [и др.] // *Blood*. – 2012. – Т. 119. – № 9. – С. 2126-2134.
108. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor / X. Zhang, K. Halvorsen, C.-Z. Zhang [и др.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2009. – Т. 324. – № 5932. – С. 1330-1334.
109. Miller J. L. Platelet-type von Willebrand's disease: characterization of a new bleeding disorder / J. L. Miller, A. Castella // *Blood*. – 1982. – Т. 60. – Platelet-type von Willebrand's disease. – № 3. – С. 790-794.
110. Mohammed S. Laboratory Testing for von Willebrand Factor: Factor VIII Binding (for 2N VWD) / S. Mohammed, E. J. Favaloro // *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. – 2017. – Т. 1646. – Laboratory Testing for von Willebrand Factor. – С. 461-472.
111. Molecular modeling of the von Willebrand factor A2 Domain and the effects of associated type 2A von Willebrand disease mutations / J. J. Sutherland, L. A. O'Brien, D. Lillicrap, D. F. Weaver // *Journal of Molecular Modeling*. – 2004. – Т. 10. – № 4. – С. 259-270.
112. Molecular pathogenesis and heterogeneity in type 3 VWD families in U.S. Zimmerman program / P. A. Christopherson, S. L. Haberichter, V. H. Flood [и др.] // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2022. – Т. 20. – № 7. – С. 1576-1588.
113. Montgomery R. R. Interactions between von Willebrand factor and Factor VIII: where did they first meet / R. R. Montgomery, J. C. Gill // *Journal of Pediatric*

Hematology/Oncology. – 2000. – Т. 22. – Interactions between von Willebrand factor and Factor VIII. – № 3. – С. 269-275.

114. Moser K. A. Chromogenic factor VIII activity assay / K. A. Moser, D. M. Adcock Funk // American Journal of Hematology. – 2014. – Т. 89. – № 7. – С. 781-784.

115. Multimeric analysis of von Willebrand factor by molecular sieving electrophoresis in sodium dodecyl sulphate agarose gel / G. Raines, H. Aumann, S. Sykes, A. Street // Thrombosis Research. – 1990. – Т. 60. – № 3. – С. 201-212.

116. Mutation in the gene encoding the alpha chain of platelet glycoprotein Ib in platelet-type von Willebrand disease / J. L. Miller, D. Cunningham, V. A. Lyle, C. N. Finch // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1991. – Т. 88. – № 11. – С. 4761-4765.

117. Myosin Va acts in concert with Rab27a and MyRIP to regulate acute von-Willebrand factor release from endothelial cells / I. Rojo Pulido, T. D. Nightingale, F. Darchen [и др.] // Traffic (Copenhagen, Denmark). – 2011. – Т. 12. – № 10. – С. 1371-1382.

118. New variant of von Willebrand disease type II with markedly increased levels of von Willebrand factor antigen and dominant mode of inheritance: von Willebrand disease type IIC Miami / M. R. Ledford, I. Rabinowitz, J. E. Sadler [и др.] // Blood. – 1993. – Т. 82. – New variant of von Willebrand disease type II with markedly increased levels of von Willebrand factor antigen and dominant mode of inheritance. – № 1. – С. 169-175.

119. New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII / M. Nishino, J. P. Girma, C. Rothschild [и др.] // Blood. – 1989. – Т. 74. – № 5. – С. 1591-1599.

120. Nilsson I. M. Commentary to Erik von Willebrand's original paper from 1926 «Hereditär pseudohefili» / I. M. Nilsson // Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia. – 1999. – Т. 5. – № 3. – С. 220-221.

121. Optimization of von Willebrand factor multimer analysis in vertical mini-gel electrophoresis systems: A rapid procedure / C. M. Thomazini, R. de P. S. Soares, T. R. F. da Rocha [и др.] // Thrombosis Research. – 2019. – Т. 175. – Optimization of von Willebrand factor multimer analysis in vertical mini-gel electrophoresis systems. – С. 76-83.

122. Patterns of expression of factor VIII and von Willebrand factor by endothelial cell subsets in vivo / J. Pan, T. T. Dinh, A. Rajaraman [и др.] // *Blood*. – 2016. – Т. 128. – № 1. – С. 104-109.
123. Performance evaluation and multicentre study of a von Willebrand factor activity assay based on GPIb binding in the absence of ristocetin / J. Patzke, U. Budde, A. Huber [и др.] // *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*. – 2014. – Т. 25. – № 8. – С. 860-870.
124. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD) / A. Goodeve, J. Eikenboom, G. Castaman [и др.] // *Blood*. – 2007. – Т. 109. – № 1. – С. 112-121.
125. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin) / E. U. Saelman, H. K. Nieuwenhuis, K. M. Hese [и др.] // *Blood*. – 1994. – Т. 83. – № 5. – С. 1244-1250.
126. Platelet aggregation induced by 1-desamino-8-D-arginine vasopressin (DDAVP) in Type IIB von Willebrand's disease / L. Holmberg, I. M. Nilsson, L. Borge [и др.] // *The New England Journal of Medicine*. – 1983. – Т. 309. – № 14. – С. 816-821.
127. Platelet-dependent von Willebrand factor activity. Nomenclature and methodology: communication from the SSC of the ISTH / I. Bodó, J. Eikenboom, R. Montgomery [и др.] // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2015. – Т. 13. – Platelet-dependent von Willebrand factor activity. Nomenclature and methodology. – № 7. – С. 1345-1350.
128. Platelets adhered to endothelial cell-bound ultra-large von Willebrand factor strings support leukocyte tethering and rolling under high shear stress / A. Bernardo, C. Ball, L. Nolasco [и др.] // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2005. – Т. 3. – № 3. – С. 562-570.
129. Preclinical evaluation of a semi-automated and rapid commercial electrophoresis assay for von Willebrand factor multimers / M. Pikta, G. Zemtsovskaja, H. Bautista [и др.] // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. – 2018. – Т. 32. – № 6. – С. e22416.

130. Predictors of von Willebrand disease in children / R. F. Sidonio, S. Gunawardena, P. H. Shaw, M. Ragni // *Pediatric Blood & Cancer*. – 2012. – Т. 58. – № 5. – С. 736-740.
131. Pseudo-von Willebrand's disease. An intrinsic platelet defect with aggregation by unmodified human factor VIII/von Willebrand factor and enhanced adsorption of its high-molecular-weight multimers / H. J. Weiss, D. Meyer, R. Rabinowitz [и др.] // *The New England Journal of Medicine*. – 1982. – Т. 306. – № 6. – С. 326-333.
132. Quantification and facilitated comparison of von Willebrand factor multimer patterns by densitometry / J. D. Studt, U. Budde, R. Schneppenheim [и др.] // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2001. – Т. 116. – № 4. – С. 567-574.
133. Rao E. S. Current approaches to diagnostic testing in von Willebrand Disease / E. S. Rao, C. J. Ng // *Transfusion and Apheresis Science: Official Journal of the World Apheresis Association: Official Journal of the European Society for Haemapheresis*. – 2018. – Т. 57. – № 4. – С. 463-465.
134. Results of a screening for von Willebrand disease type 2N in patients with suspected haemophilia A or von Willebrand disease type 1 / R. Schneppenheim, U. Budde, S. Krey [и др.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1996. – Т. 76. – № 4. – С. 598-602.
135. Ristocetin-dependent, but not botrocetin-dependent, binding of von Willebrand factor to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex correlates with shear-dependent interactions / J. F. Dong, M. C. Berndt, A. Schade [и др.] // *Blood*. – 2001. – Т. 97. – № 1. – С. 162-168.
136. Rodeghiero F. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease / F. Rodeghiero, G. Castaman, E. Dini // *Blood*. – 1987. – Т. 69. – № 2. – С. 454-459.
137. Role of multimeric analysis of von Willebrand factor (VWF) in von Willebrand disease (VWD) diagnosis: Lessons from the PCM-EVW-ES Spanish project / A. Pérez-Rodríguez, J. Batlle, I. Corrales [и др.] // *PloS One*. – 2018. – Т. 13. – Role of multimeric analysis of von Willebrand factor (VWF) in von Willebrand disease (VWD) diagnosis. – № 6. – С. e0197876.

138. Ruggeri Z. M. The complex multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor / Z. M. Ruggeri, T. S. Zimmerman // *Blood*. – 1981. – T. 57. – № 6. – С. 1140-1143.
139. Sadler J. E. A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis / J. E. Sadler // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1994. – T. 71. – № 4. – С. 520-525.
140. Sadler J. E. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor / J. E. Sadler // *Annual Review of Biochemistry*. – 1998. – T. 67. – С. 395-424.
141. Sadler J. E. Low von Willebrand factor: sometimes a risk factor and sometimes a disease / J. E. Sadler // *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. – 2009. – Low von Willebrand factor. – С. 106-112.
142. Sadler J. E. New concepts in von Willebrand disease / J. E. Sadler // *Annual Review of Medicine*. – 2005. – T. 56. – С. 173-191.
143. Savage B. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow / B. Savage, F. Almus-Jacobs, Z. M. Ruggeri // *Cell*. – 1998. – T. 94. – № 5. – С. 657-666.
144. Schneppenheim R. A molecular approach to the classification of von Willebrand disease / R. Schneppenheim, U. Budde, Z. M. Ruggeri // *Best Practice & Research. Clinical Haematology*. – 2001. – T. 14. – № 2. – С. 281-298.
145. Schneppenheim R. Luminography--an alternative assay for detection of von Willebrand factor multimers / R. Schneppenheim, H. Plendl, U. Budde // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1988. – T. 60. – № 2. – С. 133-136.
146. Semi-automated von Willebrand factor multimer assay for von Willebrand disease: Further validation, benefits and limitations / S. Oliver, T. Vanniasinkam, S. Mohammed [и др.] // *International Journal of Laboratory Hematology*. – 2019. – T. 41. – Semi-automated von Willebrand factor multimer assay for von Willebrand disease. – № 6. – С. 762-771.
147. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor / Y.-F. Zhou, E. T. Eng, J. Zhu [и др.] // *Blood*. – 2012. – T. 120. – № 2. – С. 449-458.

148. Ser968Thr mutation within the A3 domain of von Willebrand factor (VWF) in two related patients leads to a defective binding of VWF to collagen / A. S. Ribba, I. Loisel, J. M. Lavergne [и др.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2001. – Т. 86. – № 3. – С. 848-854.
149. Sharma R. Advances in the diagnosis and treatment of Von Willebrand disease / R. Sharma, V. H. Flood // *Blood*. – 2017. – Т. 130. – № 22. – С. 2386-2391.
150. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor / C. A. Siedlecki, B. J. Lestini, K. K. Kottke-Marchant [и др.] // *Blood*. – 1996. – Т. 88. – № 8. – С. 2939-2950.
151. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers / S. W. Schneider, S. Nuschele, A. Wixforth [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – Т. 104. – № 19. – С. 7899-7903.
152. Sialyltransferase ST3Gal-IV operates as a dominant modifier of hemostasis by concealing asialoglycoprotein receptor ligands / L. G. Ellies, D. Ditto, G. G. Levy [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2002. – Т. 99. – № 15. – С. 10042-10047.
153. Sivaraman B. Delineating the roles of the GPIIb/IIIa and GP-Ib-IX-V platelet receptors in mediating platelet adhesion to adsorbed fibrinogen and albumin / B. Sivaraman, R. A. Latour // *Biomaterials*. – 2011. – Т. 32. – № 23. – С. 5365-5370.
154. Sixma J. J. The hemostatic plug / J. J. Sixma, J. Wester // *Seminars in Hematology*. – 1977. – Т. 14. – № 3. – С. 265-299.
155. Solution structure of the major factor VIII binding region on von Willebrand factor / N. Shiltagh, J. Kirkpatrick, L. D. Cabrita [и др.] // *Blood*. – 2014. – Т. 123. – № 26. – С. 4143-4151.
156. Springer T. A. von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream / T. A. Springer // *Blood*. – 2014. – Т. 124. – № 9. – С. 1412-1425.
157. Stocksclaeder M. Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis / M. Stocksclaeder, R. Schneppenheim, U. Budde // *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*. – 2014. – Т. 25. – Update on von Willebrand factor multimers. – № 3. – С. 206-216.

158. Structure of the gene for human von Willebrand factor / D. J. Mancuso, E. A. Tuley, L. A. Westfield [и др.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1989. – Т. 264. – № 33. – С. 19514-19527.
159. Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain / E. G. Huizinga, S. Tsuji, R. A. P. Romijn [и др.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2002. – Т. 297. – № 5584. – С. 1176-1179.
160. Substructure of human von Willebrand factor / W. E. Fowler, L. J. Fretto, K. K. Hamilton [и др.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 1985. – Т. 76. – № 4. – С. 1491-1500.
161. Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (types IIC, IID, and IIE) / T. S. Zimmerman, J. A. Dent, Z. M. Ruggeri, L. H. Nannini // *The Journal of Clinical Investigation*. – 1986. – Т. 77. – № 3. – С. 947-951.
162. The affinity and stoichiometry of binding of human factor VIII to von Willebrand factor / A. J. Vlot, S. J. Koppelman, M. H. van den Berg [и др.] // *Blood*. – 1995. – Т. 85. – № 11. – С. 3150-3157.
163. The bleeding score predicts clinical outcomes and replacement therapy in adults with von Willebrand disease / A. B. Federici, P. Bucciarelli, G. Castaman [и др.] // *Blood*. – 2014. – Т. 123. – № 26. – С. 4037-4044.
164. The diagnosis and management of von Willebrand disease: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology / M. A. Laffan, W. Lester, J. S. O'Donnell [и др.] // *British Journal of Haematology*. – 2014. – Т. 167. – The diagnosis and management of von Willebrand disease. – № 4. – С. 453-465.
165. The discriminant power of bleeding history for the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: an international, multicenter study / F. Rodeghiero, G. Castaman, A. Tosetto [и др.] // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2005. – Т. 3. – The discriminant power of bleeding history for the diagnosis of type 1 von Willebrand disease. – № 12. – С. 2619-2626.

166. The effect of plasma von Willebrand factor on the binding of human factor VIII to thrombin-activated human platelets / M. Nesheim, D. D. Pittman, A. R. Giles [и др.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1991. – Т. 266. – № 27. – С. 17815-17820.
167. The endothelial glycocalyx anchors von Willebrand factor fibers to the vascular endothelium / T. Kalagara, T. Moutsis, Y. Yang [и др.] // *Blood Advances*. – 2018. – Т. 2. – № 18. – С. 2347-2357.
168. The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein / P. J. Lenting, J. G. Neels, B. M. van den Berg [и др.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Т. 274. – № 34. – С. 23734-23739.
169. The multimeric structure of plasma F VIII:RAg studied by electroelution and immunoperoxidase detection / A. Bukh, J. Ingerslev, S. Stenbjerg, N. P. Møller // *Thrombosis Research*. – 1986. – Т. 43. – The multimeric structure of plasma F VIII. – № 5. – С. 579-584.
170. The natural history of occult or angiodysplastic gastrointestinal bleeding in von Willebrand disease / M. Makris, A. B. Federici, P. M. Mannucci [и др.] // *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*. – 2015. – Т. 21. – № 3. – С. 338-342.
171. The power of a standardized bleeding score in diagnosing paediatric type 1 von Willebrand's disease and platelet function defects / P. D. Marcus, K. G. Nire, L. Grooms [и др.] // *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*. – 2011. – Т. 17. – № 2. – С. 223-227.
172. Tomita Y. von Willebrand factor multimer analysis using a sensitive peroxidase staining method / Y. Tomita, J. Harrison, C. F. Abildgaard // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1989. – Т. 62. – № 2. – С. 781-783.
173. Towbin H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1979. – Т. 76. – Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. – № 9. – С. 4350-4354.
174. Type 1 von Willebrand disease mutation Cys1149Arg causes intracellular retention and degradation of heterodimers: a possible general mechanism for dominant mutations

of oligomeric proteins / I. Bodó, A. Katsumi, E. A. Tuley [и др.] // *Blood*. – 2001. – Т. 98. – Type 1 von Willebrand disease mutation Cys1149Arg causes intracellular retention and degradation of heterodimers. – № 10. – С. 2973-2979.

175. Type 2B von Willebrand disease with or without large multimers: A distinction of the two sides of the disorder is long overdue / A. Casonato, V. Daidone, E. Galletta, A. Bertomoro // *PloS One*. – 2017. – Т. 12. – Type 2B von Willebrand disease with or without large multimers. – № 6. – С. e0179566.

176. Type 2N von Willebrand disease: Characterization and diagnostic difficulties / A. Casonato, E. Galletta, L. Sarolo, V. Daidone // *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*. – 2018. – Т. 24. – Type 2N von Willebrand disease. – № 1. – С. 134-140.

177. Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology / C. Mazurier, J. Goudemand, L. Hilbert [и др.] // *Best Practice & Research. Clinical Haematology*. – 2001. – Т. 14. – Type 2N von Willebrand disease. – № 2. – С. 337-347.

178. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor / J. E. Sadler, U. Budde, J. C. J. Eikenboom [и др.] // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2006. – Т. 4. – Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease. – № 10. – С. 2103-2114.

179. Use of a new enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of type 2N von Willebrand disease and its prevalence in an Indian population / K. Ghosh, S. Trasi, S. Shetty, D. Mohanty // *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*. – 2006. – Т. 17. – № 1. – С. 7-11.

180. Vangenechten I. Improving diagnosis of von Willebrand disease: Reference ranges for von Willebrand factor multimer distribution / I. Vangenechten, A. Gadisseur // *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – Т. 4. – Improving diagnosis of von Willebrand disease. – № 6. – С. 1024-1034.

181. Visualization of von Willebrand factor multimers by immunoenzymatic stain using avidin-biotin peroxidase complex / M. Aihara, Y. Sawada, K. Ueno [и др.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1986. – Т. 55. – № 2. – С. 263-267.

182. von Willebrand disease and aging: an evolving phenotype / Y. V. Sanders, M. A. Giezenaar, B. a. P. Laros-van Gorkom [и др.] // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* – 2014. – Т. 12. – von Willebrand disease and aging. – № 7. – С. 1066-1075.
183. von Willebrand disease «Vicenza» with larger-than-normal (supranormal) von Willebrand factor multimers / P. M. Mannucci, R. Lombardi, G. Castaman [и др.] // *Blood.* – 1988. – Т. 71. – № 1. – С. 65-70.
184. Von Willebrand factor assay proficiency testing. The North American Specialized Coagulation Laboratory Association experience / W. L. Chandler, E. I. B. Peerschke, D. D. Castellone [и др.] // *American Journal of Clinical Pathology.* – 2011. – Т. 135. – № 6. – С. 862-869.
185. von Willebrand factor propeptide and the phenotypic classification of von Willebrand disease / Y. V. Sanders, D. Groeneveld, K. Meijer [и др.] // *Blood.* – 2015. – Т. 125. – № 19. – С. 3006-3013.
186. Von Willebrand's disease caused by compound heterozygosity for a substitution mutation (T1156M) in the D3 domain of the von Willebrand factor and a stop mutation (Q2470X) / S. Lethagen, C. Isaksson, C. Schaedel, L. Holmberg // *Thrombosis and Haemostasis.* – 2002. – Т. 88. – № 3. – С. 421-426.
187. VWF mutations and new sequence variations identified in healthy controls are more frequent in the African-American population / D. B. Bellissimo, P. A. Christopherson, V. H. Flood [и др.] // *Blood.* – 2012. – Т. 119. – № 9. – С. 2135-2140.
188. Wagner D. D. Cell biology of von Willebrand factor / D. D. Wagner // *Annual Review of Cell Biology.* – 1990. – Т. 6. – С. 217-246.
189. Yee A. Von Willebrand factor: form for function / A. Yee, C. A. Kretz // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* – 2014. – Т. 40. – Von Willebrand factor. – № 1. – С. 17-27.
190. Zaleski A. Visualization of the multimeric structure of von Willebrand factor using a peroxidase-conjugated second antibody / A. Zaleski, R. A. Henriksen // *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* – 1986. – Т. 107. – № 2. – С. 172-175.
191. Zimmerman T. S. Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor 8 deficiency) and von Willebrand's disease, with observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proaccelerin (factor V) and on an acquired circulating

anticoagulant against antihemophilic factor / T. S. Zimmerman, O. D. Ratnoff, A. E. Powell // *The Journal of Clinical Investigation*. – 1971. – T. 50. – № 1. – C. 244-254.

192. [Type 2N von Willebrand disease (Normandy)] / A. Morales-De la Vega, E. Reyes-Maldonado, C. Martínez-Murillo, S. Quintana-González // *Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*. – 2008. – T. 46. – № 1. – C. 55-62.

114
ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А1 – Педиатрический опросник PBQ score

Симптомы	Баллы					
	-1	0	1	2	3	4
Носовые кровотечения	-	Нет/тривиальные (<5 эпизодов в год)	Более 5 раз в год или продолжительностью более 10 минут	Только консультация	Тампонада носовых ходов или коагуляция сосудов зоны Киссельбаха или антифибринолитики	Трансфузии компонентов крови (ТКК) /концентраты факторов свертывания (КФС) /десмопрессина
Кожный геморрагический синдром	-	Нет/тривиальный (диаметр экхимозов ≤ 1 см)	Диаметр экхимозов >1см без явной травмы	Только консультация	-	-
Кровотечения из мелких ран	-	Нет/тривиальные (<5 эпизодов в год)	Более 5 раз в год или продолжительностью более 10 минут	Только консультация или наложение пластырного шва	Хирургический гемостаз или антифибринолитики	ТКК или использование КФС или десмопрессина

Симптомы	Баллы					
	-1	0	1	2	3	4
Кровотечения со слизистой рот. полости	-	Нет	Было хотя 1 раз	Только консультация	Хирургический гемостаз или антифибринолитики	ТКК или использование КФС или десмопрессина
Кровотечения из желудочно-кишечного тракта	-	Нет	Ассоциировано с анатомической причиной	Только консультация или без идентифицированной причины	Хирургический гемостаз /антифибринолитики /ТКК /использование КФС /десмопрессина	-
Кровотечения при удалении зубов	Без кровотечения при ≥ 2 удалениях зубов	Нет/не было в 1 случае	Было, за консультацией не обращались	Только консультация	Тампонада или ушивание лунки	ТКК или использование КФС или десмопрессина

Симптомы	Баллы					
	-1	0	1	2	3	4
Кровотечения при хир. операциях	Отсутствие кровотечения при ≥ 2 операциях	Нет/не было при 1 операции	Было, за консультацией не обращались	Только консультация	Хирургический гемостаз, антифибринолитики	ТКК или использование КФС или десмопрессина
Меноррагии	-	Нет	Есть жалобы или только консультация	Антифибринолитики или КОК	Кюретаж ли прием препарата железа	ТКК/ КФС/ десмопрессин /гистерэктомия
Послеродовые кровотечения	Не было как минимум в 2 родах	Не было родов/не было кровотечения в 1 родах	Было, за консультацией не обращались	Кюретаж/ препараты железа /антифибринолитики	ТКК/использование КФС/ десмопрессина	-
Межмышечные гематомы	-	Не было	Посттравматические, за консультацией не обращались	Спонтанные, за консультацией не обращались	Требующие КФС/ десмопрессина	Требующие хирургического вмешательства или ТКК

Симптомы	Баллы					
	-1	0	1	2	3	4
Гемартрозы	-	Никогда	Посттравматические, не требующие специальной терапии	Спонтанные, не требующие специальной терапии	Требующие КФС/ десмопрессина	Требующие хирургического вмешательства или ТКК
Кровоизлияния в ЦНС	-	Никогда	-	-	Субдуральные, любая терапия	Интрацеребральные, любая терапия
Другие кровотечения*		Нет	Были	Только консультация	Хирургический гемостаз, антифибринолитики	ТКК /использование КФС/десмопрессина