

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Чернецкая Дарья Михайловна

Молекулярно-генетическая диагностика болезни Виллебранда

3.1.28. – Гематология и переливание крови

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук Зозуля Надежда Ивановна

Москва – 2023

Оглавление

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	11
Болезнь Виллебранда.....	11
1.1 Фактор фон Виллебранда.....	12
1.1.1 Синтез и сборка мультимеров vWF.....	13
1.1.2 Катаболизм плазматического vWF.....	13
1.2 Генетика заболевания.....	15
1.3 Классификация типов болезни Виллебранда.....	16
1.3.1 Тип 1 болезни Виллебранда.....	18
1.3.2 Тип 2 болезни Виллебранда.....	21
1.3.3 Тип 3 болезни Виллебранда.....	25
1.4 Установление диагноза болезни Виллебранда.....	26
1.5 Лечение и профилактика кровотечений при болезни Виллебранда.....	29
Глава 2. Материалы и методы.....	32
2.1 Характеристика пациентов и дизайн исследования.....	32
2.2 Лабораторное исследование.....	35
2.2.1 Экстракция геномной ДНК из периферической крови.....	35
2.2.2 Постановка полимеразной цепной реакции.....	36
2.2.3 Очистка продуктов амплификации.....	37
2.2.4 Секвенирование по Сэнгеру и анализ мутаций.....	38
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	40
3.1 Спектр мутаций российской выборки пациентов.....	40
3.2 Анализ патогенности новых вариантов гена <i>VWF</i>	44
3.3 ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 1.....	47
3.4 ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 2А.....	51
3.5 ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 2В.....	53
3.6 ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 2М.....	56
3.7 ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 2N.....	58
3.8 ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 3.....	60
3.9 Анализ сложных случаев, не вошедших в предыдущие главы.....	63
3.10 ДНК-диагностика родственников пациентов.....	65
3.11 Разработанный алгоритм анализа.....	68

3.12 Сопоставление клинического диагноза и результатов молекулярно-генетического анализа.....	70
3.13 Генная конверсия.....	72
3.14 Ограничения методов.....	75
Заключение.....	76
Выводы.....	78
Практические рекомендации.....	79
Список сокращений.....	81
Список литературы.....	82
Приложение А.....	100
Приложение Б.....	103
Приложение В.....	107
Приложение Г.....	109

Введение

Актуальность темы исследования

Болезнь Виллебранда (БВ) – одно из самых распространённых заболеваний, связанных со снижением свертывания крови. БВ проявляется у обоих полов и наследуется аутосомно. Это заболевание обусловлено нарушениями в гене *VWF*, кодирующем фактор фон Виллебранда (vWF) – высокомолекулярный гликопротеид, имеющий две основные функции: защиту фактора свертываемости VIII (FVIII) от распада и связь тромбоцитов с поврежденным участком эндотелия сосуда [100].

Выделяют качественные и количественные нарушения vWF, в соответствии с чем БВ делят на типы и подтипы. При качественных нарушениях vWF имеет место тип 2 БВ. При снижении концентрации vWF в крови диагностируют тип 1 БВ, при отсутствии фактора vWF и значительном недостатке фактора VIII (FVIII) определяют тип 3. В типе 1 выделяют отдельно подтип 1С, связанный с ускоренным выведением фактора из кровяного русла [28]. Тип 2 делят на подтипы в зависимости от нарушения vWF. При типе 2А наблюдается снижение тромбоцит-зависимой активности vWF (vWF:RCo) и потеря высокомолекулярных мультимеров. Тип 2В характеризуется повышением аффинности vWF к рецепторам GPIb тромбоцитов и избыточным связыванием vWF с тромбоцитами. При типе 2М наблюдается снижение vWF:RCo с сохранением мультимерного распределения. Для типа 2N характерно снижение аффинности к FVIII, поэтому симптомы и данные коагулологических тестов могут совпадать с таковыми при гемофилии А [29].

Ген *VWF*, кодирующий фактор vWF, локализован в прителомерной области короткого плеча 12-й хромосомы (12p13.31), занимает на ней около 178 тысяч пар нуклеотидов (тпн) и состоит из 52 экзонов [78].

Наследование типа 1 доминантное с неполной пенетрантностью, типов 2А, 2В и 2М доминантное, а типов 2N и 3 рецессивное [28]. Распределение мутаций по гену неравномерное и зависит от типа БВ. Так, например, мутации, вызывающие тип 2В, локализованы только в экзоне 28, а соответствующие типам 1 и 3 могут быть обнаружены в любом экзоне [97].

Для установления диагноза БВ используется ряд анализов. В рутинной практике это прокагулянтная активность фактора FVIII (FVIII:C), антиген vWF (vWF:Ag), ристоцетин кофакторная активность vWF (vWF:RCo) и агрегация тромбоцитов с ристоцетином (RIPA) [1]. Также используются дополнительные исследования для определения типа БВ такие как: электрофорез мультимеров vWF (для типов 2А/2М), связывание vWF с FVIII (для типа 2N и его

дифференцировки от гемофилии А), связывание vWF с коллагеном (для типа 2М) и агрегация тромбоцитов с низкими дозами ристоцетина (для типа 2В) [28].

Актуально определение типа БВ молекулярно-генетическими методами, так как такие анализы как электрофорез мультимеров vWF, а также связывание vWF с FVIII, не выполняются в рутинной практике.

Анализ связывания vWF с коллагеном, который используется для диагностики типа 2М, не позволяет отличить его от фенотипически идентичного состояния, связанного с нарушениями структуры тромбоцитов, это можно сделать только молекулярно-генетическими методами [28].

Для выбора терапии важно диагностировать типы 2В и 2N БВ. Верифицировать данные типы позволяет молекулярно-генетическое исследование. В случае типа 2В велик риск тромбозов, а тип 2N важно дифференцировать от гемофилии А для подбора препарата с подходящим соотношением FVIII/vWF [29].

Мутационный анализ гена *VWF* позволяет верифицировать диагноз пациента и определить носительство нарушений для его родственников. В первую очередь это важно для установления наследования заболевания при ЭКО для выбора донора или эмбриона.

Таким образом, молекулярно-генетическая диагностика БВ и типов БВ важна для выбора терапии и для планирования семьи пациентами.

Степень разработанности темы исследования

Классификация БВ базируется на выделении ее типов и подтипов, характеризующихся разными клиническими картинами и разными структурными особенностями строения vWF [4]. Типы и подтипы БВ обусловлены нарушениями в разных частях гена и имеют различный характер наследования [79].

Информацию о мутациях и полиморфизмах в гене *VWF* можно найти в ряде баз данных. Так, HGMD [83] насчитывает 1131 патогенный вариант, из них 740 миссенс-мутаций, 156 небольших делеций, инсерций, и их сочетаний; NCBI Clinvar [46] насчитывает 1101 вариант и NCBI SNP [184] 3113 полиморфизмов; LOVD3 [163] содержит 708 вариантов. Накопленные к настоящему времени генетические данные позволили ISTH рекомендовать в случае необходимости подтверждения типов 2В и 2N использовать молекулярно-генетический анализ в качестве первого и основного доказательства [28].

Не смотря на огромное количество информации, исследование гена *VWF* продолжается, базы данных не перестают пополняться. Это связано с тем, что на данный момент исследован ряд популяций и список популяций растет. Так, исследований для российской популяции

пациентов с БВ еще не проводилось и мы поставили своей целью изучить ее. Кроме того, для новых нарушений в гене и для части уже известных, не до конца ясен патогенный эффект. Новые пациенты помогают прояснять связь мутации с клинической картиной пациента, поэтому новые пациенты нашей выборки важны для интерпретации уже известных вариантов гена и для описания новых.

Цели исследования

Определить спектр мутаций гена *VWF* в российской популяции пациентов с болезнью Виллебранда/подозрением на болезнь Виллебранда, сопоставить генетические нарушения с клиническими и коагулологическими данными.

Задачи исследования

1. Провести мутационный анализ всех функционально важных последовательностей гена *VWF* для российской выборки пациентов с болезнью Виллебранда или подозрением на болезнь Виллебранда и определить спектр генетических нарушений, вызывающих данное заболевание. Сравнить спектр выявленных нарушений, характерный для отечественной популяции, с мировыми данными.
2. В случае обнаружения новых вариантов гена *VWF* проанализировать их патогенность согласно критериям, приведенным в руководстве по интерпретации данных.
3. Определить тип болезни Виллебранда для исследованных пациентов в соответствии с результатами молекулярно-генетического анализа и оценить соответствие полученных результатов входящим диагнозам, установленным на основании клинических и коагулологических данных.
4. Разработать оптимальный алгоритм анализа гена *VWF*.

Научная новизна исследования

Впервые проведена оценка распределения патогенных вариантов гена *VWF*, характерного для российской популяции. Показана высокая гетерогенность полученного мутационного спектра. Выявлено 37 разных вариантов гена *VWF*, 11 из которых ранее в мировой популяции

не встречались. Показано, что микроделеция с.2435delC, являющаяся мажорной для ряда европейских популяций, преобладает и в отечественной популяции (25%).

Новые варианты гена *VWF* вместе с оценкой их патогенности с использованием предсказательных пополнили мировые данные.

Полученные в ходе анализа гена *VWF* патогенные варианты сопоставлены с коагулологическими данными по каждому пациенту, что позволило расширить и уточнить клинический диагноз и понимание клинической картины для каждого пациента в отдельности.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты, полученные автором в ходе исследований, дают представление о спектре мутаций в российской выборке пациентов с БВ или подозрением на БВ. Новые варианты гена *VWF* и их интерпретация протеомными программами пополняют международные базы данных. Полученные в результате работы данные расширяют знания о соотношении генотипа и фенотипа при БВ.

Практическая значимость исследования состоит в разработке и внедрении алгоритма молекулярно-генетической диагностики БВ и ее типов в рутинную практику. Данная работа позволяет скорректировать планирование экспериментов и клинических исследований БВ. Уточнены диагнозы пациентов, вошедших в эту работу. Проверено наличие патогенных вариантов гена *VWF* у родственников пациентов.

Методология и методы исследования

Работа выполнена в лаборатории генной инженерии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Образцы периферической крови пациентов были предоставлены клиничко-диагностическим отделением гематологии и нарушений гемостаза ФГБУ «НМИЦ Гематологии» Минздрава России, Москва; ГАУЗ СО Центр детской онкологии и гематологии, Екатеринбург; ФГБОУ ВО "СЗГМУ им И.И. Мечникова" Минздрава России, Санкт-Петербург.

Молекулярно-генетический анализ гена *VWF* проведен для 50 пациентов с БВ/подозрением на БВ и их 8-ми родственников (женщин 36, мужчин 22).

Из периферической крови пациентов выделяли тотальную ДНК фенол-хлороформным методом. Для анализа последовательности гена *VWF* амплифицировали экзоны и прилегающие к ним участки интронов методом ПЦР с помощью праймеров, разработанных в лаборатории. Полученные ПЦР-продукты очищали с использованием наборов Wizard® PCR Preps DNA

Purification System (Promega) и проводили секвенирование по методу Сэнгера. В случае отсутствия найденного генного варианта в международных базах данных (NCBI Clinvar, NCBI SNP, HGMD, LOVD3) патогенность новых мутаций оценивали согласно критериям, приведенным в руководстве по интерпретации данных, полученных методом массового параллельного секвенирования [11]. В качестве одного из критериев (PP3) использованы протеомные программы MutationTaster, Polyphen, SIFT, PROVEAN.

Все пациенты были разделены на 4 группы в соответствии с предполагаемым диагнозом, для каждой группы анализ проводили по своему алгоритму.

В случае недифференцированного диагноза БВ, диагноза тип 1 БВ, диагноза тип 3 БВ, а также при запросе исключить БВ анализу подвергались все экзоны в порядке, соответствующем убыванию количества мутаций, согласно статье [78].

При запросе дифференцировать 2N тип и гемофилию А анализировали экзоны 17–28.

При диагнозе тип 2 БВ недифференцированный, тип 2А/2М БВ анализировали экзоны 12, 14–28, 30–31, 51, 52.

При запросе дифференцировать 2В тип БВ и тромбоцитопению анализировали экзон 28.

Положения, выносимые на защиту

1. Для спектра мутаций в гене *VWF*, характерного для российской популяции, свойственна гетерогенность. Среди 67-ми выявленных дефектных аллелей было 37 разных, из них 11 не были известны ранее.
2. Мажорной мутацией, как и в целом ряде европейских популяций, оказалась микроделеция с.2435delC (25 %).
3. Молекулярно-генетический анализ во многих случаях позволяет уточнить диагноз БВ. Это особенно важно в случае типа 2N БВ, который иногда ошибочно диагностируется как легкая форма гемофилии А (и наоборот).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных выводов обеспечена тщательной проработкой литературных данных по теме диссертации, детальной разработкой экспериментов. В работе подробно освещен каждый этап исследования. Все данные, использованные для анализа, приведены в приложении. Все это делает работу воспроизводимой и проверяемой.

Апробация работы состоялась «19» июня 2023 года на заседании проблемной комиссии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России «Фундаментальные и клинические исследования в гематологии» (протокол № 6).

Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования (основные положения, материалы и промежуточные данные) были представлены в виде устных и постерных докладов, тезисов на отечественных конференциях и конгрессах:

1. IX съезде Российского общества медицинских генетиков в 2021 году (РФ, г. Москва, 1–2 июля);
2. VI Конгрессе гематологов России в 2022 году (РФ, г. Москва, 21–23 апреля);
3. международном конгрессе EAHAD в 2020 году (Нидерланды, г. Гаага, 5–7 февраля);
4. международном конгрессе EAHAD в 2022 году (онлайн, 2–4 февраля);
5. международном конгрессе ISTH в 2021 году (онлайн, 17–21 июля).

Личный вклад

Основной массив работы, весь анализ мутаций и интерпретацию данных, в том числе выступления на конференциях выполнены лично диссертантом.

В статьях за первым авторством была основным исполнителем как получения молекулярно-генетических данных, так и их обработки и написания текста. В статье, опубликованной в журнале «Genes», выполняла молекулярно-генетический анализ гена *VWF* для четверых пациентов.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 работ, из них 2 статьи в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных журналов, рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией Российской Федерации, 1 статья зарубежной печати, журнал индексируется в реферативных базах Scopus и Web of Science.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 111 страницах машинописного текста и включает «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение»,

«Заключение», «Выводы», «Практические рекомендации», «Список сокращений», «Список литературы» и «Приложения А-Г». Работа иллюстрирована 12 рисунками и содержит 20 таблиц. Список литературы включает 189 работ, из них 11 на русском языке, 178 на английском.

Глава 1. Обзор литературы

Болезнь Виллебранда

БВ названа в честь финского врача Эрика фон Виллебранда, который описал ее в 1926 году, заинтересовавшись случаем массивного кровотечения у девочки, носящего наследственный характер. Врач изучил родословную девочки и назвал заболевание «наследственной псевдогемофилией» [117]. От гемофилии болезнь отличалась проявлением и у мужчин, и у женщин, а также отсутствием типичных для гемофилии кровоизлияний в мышцы и суставы. Для членов семьи этой девочки были свойственны десневые, носовые, желудочно-кишечные кровотечения и меноррагии. Эти проявления (желудочно-кишечные кровотечения и меноррагии) стали причиной смерти многих членов семьи [30].

В дальнейшем изучение причин БВ развивалось следующим образом. В 1971 году Теодор Самуэль Циммерман открыл гликопротеин [138; 189], который впоследствии был назван фактором Виллебранда vWF. В 1985 году была получена последовательность комплементарной ДНК (кДНК) для vWF, то есть кодирующая последовательность гена фактора фон Виллебранда (*VWF*) [47; 105]. В 1994 году была разработана близкая к современной классификация типов БВ [116], в 2006 она была дополнена [174], а последняя общепринятая классификация представлена в руководствах International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) 2021 года [28; 29].

По результатам эпидемиологического исследования [137], частота встречаемости БВ со сниженной активностью vWF в различных популяциях может достигать 1%, хотя по оценкам специализированных медицинских центров, основанным на данных более детального анализа, включающего коагулологические и генетические тесты, частота встречаемости БВ с клиническими проявлениями не превышает 1:10 000 (0,01%) [127]. Основным проявлением БВ являются различные кровотечения. Болезнь может возникнуть у пациентов обоего пола [140].

БВ фенотипически гетерогенна, что связано с нарушениями работы vWF. Классификация заболевания включает ряд типов и подтипов. Описывая каждый тип, приходится учитывать черты заболевания на уровне симптомов пациента, его коагулологических данных, видимой на электрофорезе мультимерной структуры vWF и на молекулярно-генетическом уровне.

1.1 Фактор фон Виллебранда

VWF – это мультимерный гликопротеид, субъединицы которого практически идентичны, их масса около 250 kDa. Мультимеры варьируются от димеров массой в 500 kDa до конструкций размером более 40 субъединиц, достигающих в длину 2 мкм [151]. VWF выполняет две основные функции:

- обеспечивает связь эндотелия сосуда в месте его повреждения с тромбоцитами;
- связывается с фактором VIII (FVIII), играющим ведущую роль в свертывании крови, и обеспечивает его стабильность [5].

Соответственно, нарушения в структуре vWF ведут либо к симптомам, характерным для тромбоцитарных дисфункций, либо к симптомам легкой или умеренно тяжелой гемофилии А, либо к совокупности этих проявлений [141].

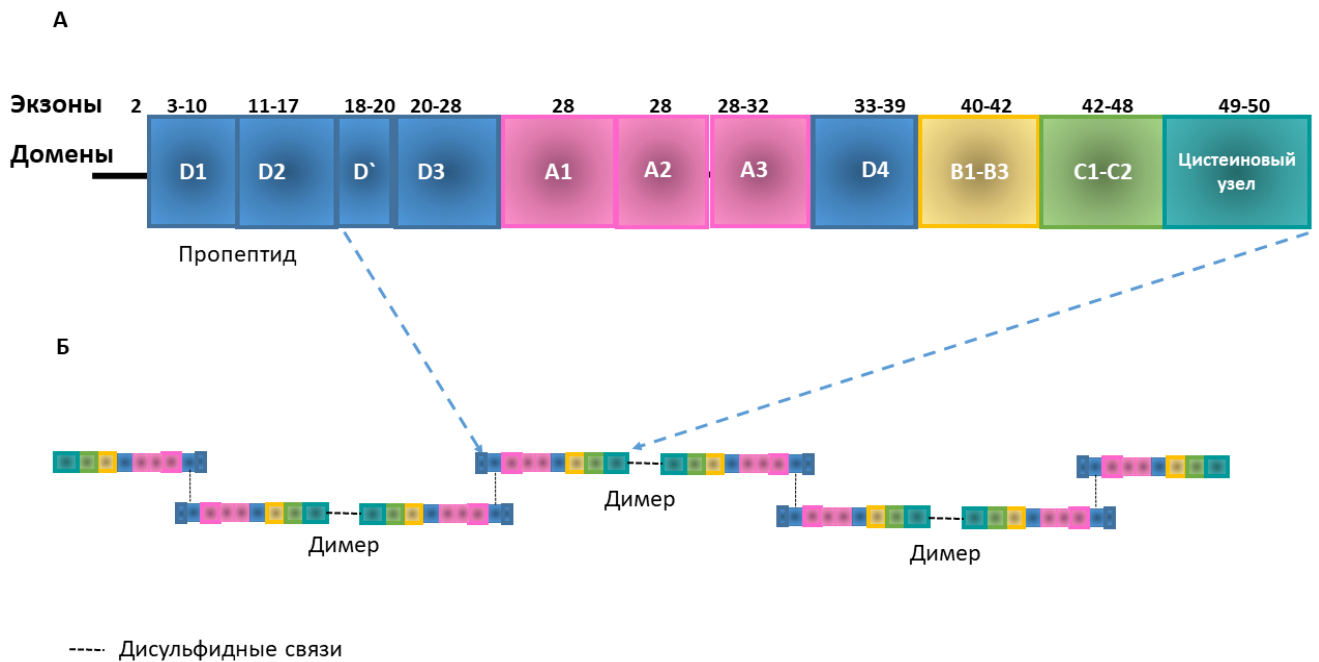


Рисунок 1 – Структура vWF; А – Доменная структура vWF и экзоны, кодирующие домены; Б – схема мультимеризации vWF; адаптировано по [78; 185]

vWF имеет доменную структуру (Рисунок 1А). Функции, локализованные в разных доменах, в основном изучены. GPIb на поверхности тромбоцитов взаимодействует с доменом A1, интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ взаимодействует с последовательностью аминокислот Arg-Gly-Asp в домене C1. Фибриллярный коллаген взаимодействует в основном с доменом D3, а коллаген VI типа связывается с доменом A1. FVIII связывается с D'D3 доменами [141].

1.1.1 Синтез и сборка мультимеров vWF

Эндотелиальные клетки и мегакариоциты синтезируют субъединицы, из которых будет образован vWF. Субъединицы димеризуются в эндоплазматическом ретикулуме «дисульфидными мостиками» между С-концевыми доменами с цистеиновыми узлами (ЦУ) («хвост к хвосту») (Рисунок 1Б). Из димеров формируются мультимеры в аппарате Гольджи тоже «дисульфидными мостиками» между доменами D3 («голова к голове») (Рисунок 1Б). Формирование мультимера зависит от строения пропептида и от кислотности (pH) в аппарате Гольджи. Мультимеры могут секретироваться или храниться для последующей секреции в тельцах Вайбеля – Паладе эндотелиальных клеток, откуда будут высвобождены при их повреждении, или в α -гранулах в тромбоцитах [185].

1.1.2 Катаболизм плазматического vWF

Что произойдет с мультимером vWF после секреции зависит от его размера, взаимодействия с тромбоцитами и другими клетками, подверженности протеолизу при помощи ADAMTS-13, а также скорости выведения из циркуляции vWF в крови (Рисунок 2). Под действием высокого напряжения сдвига в жидкости достаточно крупные для взаимодействия с тромбоцитами мультимеры могут развернуться и обнажить связь Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ в домене A2, что сделает его уязвимым для протеазы ADAMTS-13. При помощи этого механизма ADAMTS-13 изменяет исходное распределение мультимеров vWF, которые секретированы в кровь, превращая большие мультимеры в более мелкие и производя характерные продукты расщепления. Поэтому на электрофорезе плазматического vWF будут присутствовать более бледные полосы, обрамляющие яркую полосу, соответствующую vWF в эндотелии (Рисунок 2). Время полураспада vWF в крови 12–20 часов [54; 120], этот процесс не зависит от размера мультимеров [27]. Концентрация vWF в крови зависит от скорости секреции и скорости выведения vWF. Распределение мультимеров при электрофорезе отражает баланс между синтезом vWF, выведением его из кровотока и расщеплением с помощью ADAMTS-13. Изменения генотипа, влияющие на эти процессы, порождают различные фенотипы БВ [174].

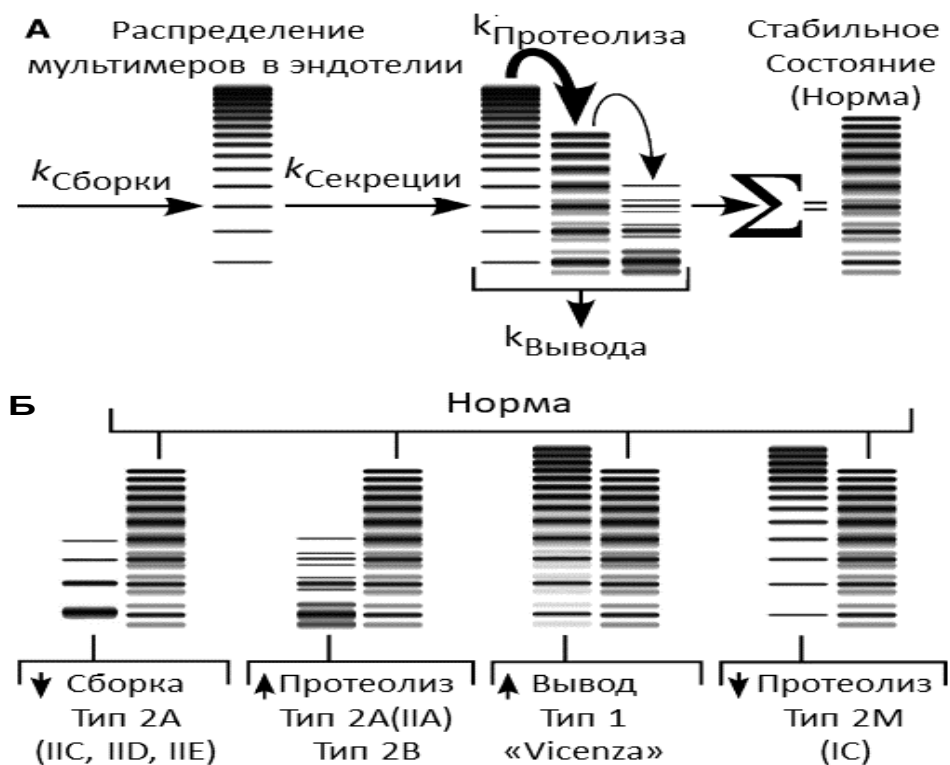


Рисунок 2 – Синтез и катаболизм мультимеров vWF; А – изначальное распределение мультимеров в эндотелии определяется скоростью сборки ($k_{\text{сборки}}$) мультимеров; Б – патологические изменения скорости сборки, секреции, вывода из кровотока или протеолиза мультимеров определяют картину распределения мультимеров при разных типах БВ; адаптировано по [174]

На Рисунке 2 показан синтез и катаболизм мультимеров vWF (А). Изначальное распределение мультимеров в эндотелии определяется скоростью сборки ($k_{\text{сборки}}$) мультимеров. Концентрация vWF в крови и картина распределения мультимеров в плазме определяется скоростью секреции их в кровь ($k_{\text{секреции}}$), скоростью выведения из кровеносного русла ($k_{\text{выведения}}$), протеолиза под действием ADAMTS-13 ($k_{\text{протеолиза}}$). В стабильном состоянии у здорового человека самых крупных мультимеров в плазме меньше, по сравнению с собранными в эндотелии. Бледные спутниковые полосы, обрамляющие мелкие мультимеры, отражают результат протеолиза. Патологические изменения скорости сборки, секреции, вывода из кровотока или протеолиза мультимеров определяют картину распределения мультимеров и тип БВ (Рисунок 2, Б). Известные патогенные механизмы, ассоциированные с конкретным типом БВ, показаны в сравнении с распределением мультимеров в кровотоке в норме. В случае если пациент имеет более одного патогенного изменения в гене *VWF*, каждое изменение влечет за собой свой патологический процесс, и итоговое распределение мультимеров может быть в результате этих процессов промежуточным или нечетким.

1.2 Генетика заболевания

БВ определяется изменениями в гене *VWF*, кодирующем vWF [79]. Ген *VWF* локализован в прителомерной области короткого плеча 12-й хромосомы (12p13.31), занимает на ней около 178 тпн и состоит из 52 экзонов [78]. Соответствие экзонной организации доменной структуре белка vWF представлено на Рисунке 1. Кодирующие аминокислотные остатки нумеруются от 1 до 2813, начиная со стартового метионина. Существует также частичная копия этого гена – псевдоген на длинном плече хромосомы 22 (22q11–13), включающий экзоны 23–34 [149] и имеющий гомологию с геном 97 % [86].

Мутации, соответствующие типу 2N БВ, локализованы в экзонах 17–21, 24, 25, 27. Мутации типа 2А находятся в экзонах 12, 14–16, 26, 28, 51, 52; типа 2М – 17, 27, 28, 30, 31, 52; типа 2В бывают только в экзоне 28 [78; 79].

Мутации, определяющие типы 1 и 3 БВ, разбросаны по всему гену. (Рисунок 3, Таблица 1).

Мутации, характерные для БВ типа 3, обычно являются нонсенс-мутациями или микроделециями и микроинсерциями, вызывающими сдвиг рамки считывания. Крупные делеции, мутации зоны сплайсинга и миссенс-мутации тоже могут вызывать тип 3, но встречаются реже [78].

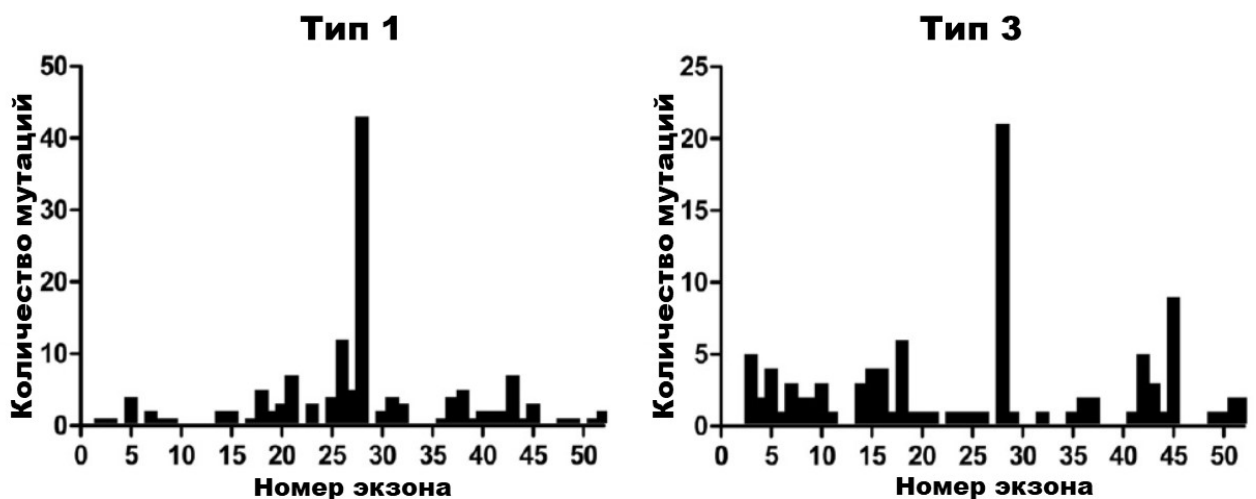


Рисунок 3 – Распределение мутаций по экзонам; адаптировано по [78]

Поскольку у типов 1 и 2А, 2В и 2М наследование в основном доминантное, для их проявления достаточно одной мутации. У типов 3 и 2N наследование рецессивное. Для того, чтобы симптомы этих типов БВ проявились, необходима либо мутация в гомозиготном состоянии, либо две мутации в гетерозиготном состоянии, образующие компаунд [78; 79].

Таблица 1 – Экзоны, в которых может быть найдена мутация при разных типах БВ [78]

Тип БВ	1	2А	2В	2М	2N	3
Экзоны, в которых может быть локализована мутация	Все	12, 14–16, 26, 28, 51, 52	28	17, 27, 28, 30, 31, 52	17–21, 24, 25, 27	Все

Существуют версии, что некоторые генетически обусловленные факторы вне гена *VWF* тоже могут влиять на проявления болезни [99]. Так, некоторые исследователи группу крови 0 связывают с более низкими значениями vWF [98]. Другие исследования предполагают, то клиренс vWF связан с локусами *CLEC4M* и *STXBP5*, и изменение в них может влиять на уровень vWF как у пациентов с БВ, так и у здоровых людей [119].

Иногда между геном *VWF* и его псевдогеном происходит генная конверсия [44]. Генная конверсия – это процесс заимствования участков между геном и псевдогеном [70]. Она читается частым явлением для гена *VWF* в индийских популяциях [71; 123]. Взаимодействие между *VWF* и его псевдогеном – это уникальный случай генной конверсии между хромосомами [70].

«Горячая область», в которой происходит генная конверсия, начинается с 3'-конца интрона 27 и заканчивается в пределах 500 пар нуклеотидов от начала экзона 28 [89], кодирующего домен A1, который отвечает за связывание vWF с гликопротеидом (GP)Iba на поверхности тромбоцита [144]. Часть генных вариантов, появившихся вследствие генной конверсии, являются патогенными.

Международные базы данных, такие как NCBI ClinVar, LOVD3, HGMD, содержат информацию о патогенных вариантах гена *VWF* и интерпретации патогенности этих вариантов, в ряде случаев описание симптомов носителей этого варианта (LOVD3).

Собранные к настоящему времени данные о нарушениях в гене *VWF* достаточно полные для того, чтобы ISTH рекомендовала использование молекулярно-генетического анализа для установления диагнозов БВ типа 2В и БВ типа 2N [28].

1.3 Классификация типов болезни Виллебранда

Современные представления о классификации БВ в основном сформированы рекомендациями vWF Scientific Standardization Committee (VWF-SSC) на ежегодных встречах ISTH с 1994 по 2021 год [140; 174] (Рисунок 4). Во введении к рекомендациям постулируется, что разделение на типы не всегда однозначно. Разделение базируется, главным образом, на клиническом фенотипе и свойствах vWF, а не молекулярных данных, так как руководство преследует практические цели, а анализ гена менее доступен, чем коагулологические

исследования. Тем не менее, молекулярно-генетический анализ рекомендуется для установления более точного диагноза. Описание типов БВ приведено на Рисунке 4. [174]

Типы 1 и 3 характеризуются количественными нарушениями vWF. При типе 1 наблюдается недостаток vWF и нормальное или умеренно сниженное количество FVIII, а при типе 3 – почти полное отсутствие функционального vWF и значительное снижение FVIII. К типу 2 относятся качественные нарушения. Поскольку вариантов качественных нарушений несколько, то тип 2 делится на подтипы: 2А, 2В, 2М, 2N. Каждому подтипу соответствуют свои особенности мультимерной структуры (Рисунок 2).

Классификация БВ по фенотипу обусловлена наследственными нарушениями количества, структуры и функциональности vWF. В предыдущих рекомендациях [140] считалось, что БВ может быть вызвана только мутацией в гене *VWF*. В рекомендациях 2006 года это требование смягчено. Это связано с таким соображением, что изменения в других генах могут создать эффект, неотличимый от мутации в *VWF* [174].

Существуют приобретенные заболевания, очень похожие на БВ – приобретенный синдром Виллебранда [6; 23]. Он может возникнуть на фоне онкологических, иммунных, иных заболеваний или спонтанно, проявляется дисфункцией и/или снижением фактора Виллебранда. Частота встречаемости ПБВ у пациентов с хроническим миелолейкозом (ХМЛ) составляет 3 % [6]. Также вызывать симптомы приобретенного синдрома Виллебранда могут системные заболевания соединительной ткани, моноклональные гаммапатии, неоплазии, острый лейкоз, врожденные пороки сердца, гастроинтестинальная ангиодисплазия, вирусная инфекция Эпштейна-Барр, синдром Элерса-Данло, талассемия и некоторые другие заболевания [7].

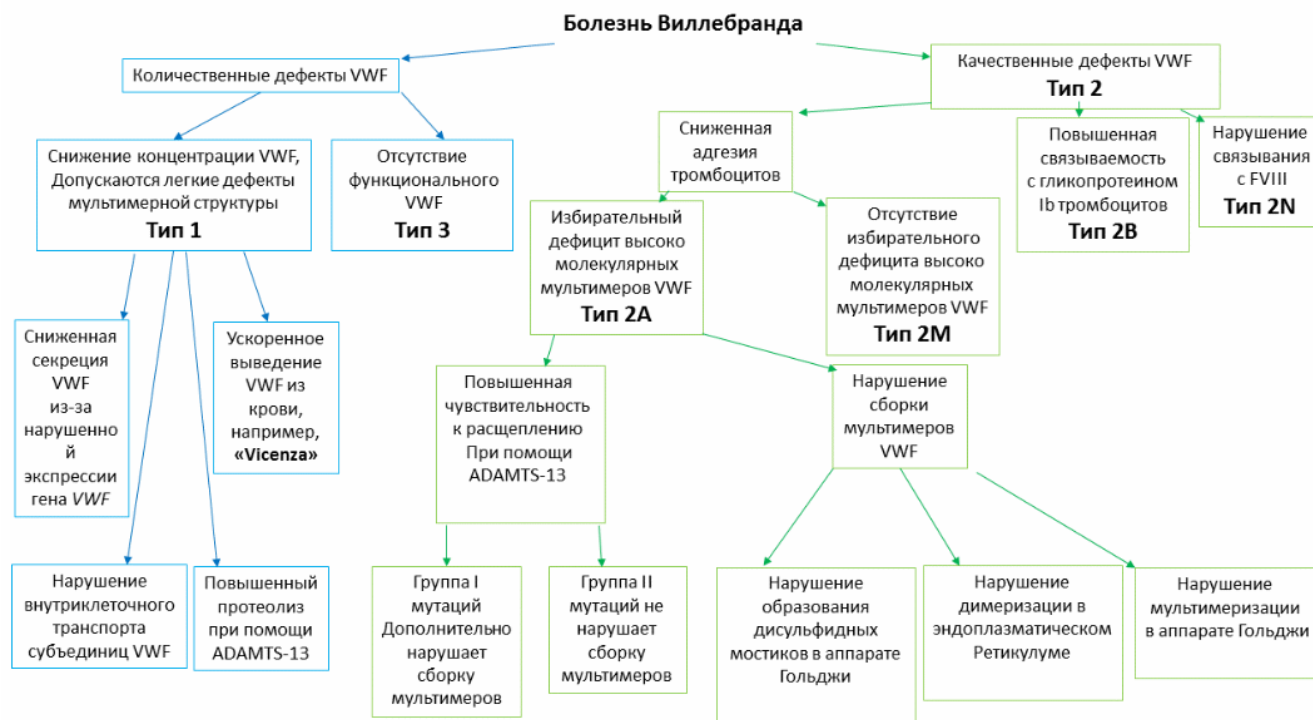


Рисунок 4 – Классификация типов БВ; нарисован согласно [174]

Таким образом, обзор рекомендаций vWF Scientific Standardization Committee (VWF-SSC) на ежегодных встречах ISTH с 1993 по 2021 год [28; 29; 140; 174] позволил систематизировать причины и механизмы развития типов БВ (Рисунок 4), что может применяться врачами-гематологами и врачами смежных специальностей, а также специалистами, занимающимися лабораторной диагностикой и биологией заболеваний системы крови.

1.3.1 Тип 1 болезни Виллебранда

Тип 1 БВ связан с разными механизмами, вызывающими снижение содержания vWF в крови. В рекомендации ISTH от 1994 года [140] делался акцент на том, что структура мультимеров должна быть неотличима от нормы. В рекомендации ISTH 2006 года [174] это требование тоже смягчено: мультимеры могут быть аномальными, но пропорция крупных мультимеров на электрофорезе должна быть несильно изменена, и их функция должна остаться сохранной, а патогенный эффект должен достигаться именно из-за снижения количества vWF.

Основной лабораторный параметр, позволяющий диагностировать тип 1, это нормальное значение активности vWF при сниженном показателе антигена vWF (vWF:Ag). Допущение нестрогого соответствия мультимеров норме важно, потому что при тщательном анализе часто

оказывается, что структура или распределение мультимеров на электрофорезе у пациентов слегка изменены [174].

Бывают случаи, когда тип 1 может быть вызван сниженной секрецией функционально исправного vWF с практически нормальным распределением мультимеров. Пониженную секрецию vWF связывают с мутацией, снижающей экспрессию гена, хотя это трудно подтвердить на практике [174]. Есть исследования, которые отрицают причастность к этому изменений в гене *VWF* [167]. Была выдвинута гипотеза, что колебания количества vWF в крови связано с распространенным полиморфизмом в промоторе гена *VWF* [21], но она не подтвердилась [84].

Другой механизм - снижение секреции за счет нарушения внутриклеточного транспорта субъединиц vWF. Оно вызывает тяжелую, доминантно наследуемую форму БВ типа 1, хотя фенотип часто бывает смешанным и может иметь черты как типа 1, так и типа 2А. Например, у пациента из Нидерландов уровень vWF был снижен при более-менее нормальном распределении мультимеров. Двое из трех его детей имели похожий фенотип. Пациенты обладали гетерозиготными заменами p.Cys1149Arg в домене D3. Дефектные субъединицы с заменой p.Cys1149Arg не могли покинуть эндоплазматический ретикулум. При экспрессии нормальных и дефектных субъединиц vWF субъединицы p.Cys1149Arg не только удерживаются внутри клетки сами, но и, входя в состав димеров с нормальной субъединицей, не дают ей покинуть клетку. Это приводит к деградации гетеродимеров vWF, состоящих из нормальных и дефектных субъединиц, что снижает секрецию нормального vWF [168]. О подобном поведении сообщалось для другой мутации в домене D3 Thr1156Met [182].

Следующий механизм, вызывающий БВ типа 1 с доминантным наследованием, это ускоренный вывод vWF из кровеносного русла (клиренс) (Рисунок 2). Например, мутация p.Cys1130Phe оказывает умеренное влияние на секрецию vWF, но предположительно способствуют быстрому выводу фактора из крови, что приводит к низкому содержанию vWF в плазме у пациентов. Пациенты с мутацией p.Cys1130Phe имели очень короткий ответ на десмопрессин с периодом полураспада vWF:Ag равным 1,5 часа [35; 48] по сравнению с 6-9 часами для здоровых людей контрольной группы [135]. Сходным образом, два пациента с мутацией p.Ser2179Phe в домене D4 имели короткий период полувыведения vWF: Ag, составлявший 3-4 часа после терапии десмопрессином [17]. У других пациентов с БВ типа 1 после применения десмопрессина выведение vWF:Ag, по-видимому, коррелирует с исходным уровнем vWF [87; 95].

Самый яркий пример ускоренного вывода vWF – это фенотип «Vicenza» . Для него характерны сниженный vWF:Ag (6–12%, в иностранной литературе используются единицы IU/dL, в отечественной аналогичные численные значения приведены в процентах, численно

величины в этих единицах совпадают), нормальная связываемость vWF с тромбоцитами и сверхкрупные мультимеры vWF [178]. Вопрос о том, следует классифицировать тип «Vicenza» как тип 1 или тип 2М, остается открытым [37; 134]. В случае, если количество vWF достаточно для точного измерения, тогда уровни vWF:RCo и vWF:Ag [134] снижаются пропорционально [37]. Таким образом, этот вариант классифицируется как БВ типа 1.

Тип «Vicenza» обусловлен гетерозиготной мутацией p.Arg1205His в домене D3. Рекомбинантный vWF с p.Arg1205His нормально секретируется с нормальным мультимерным распределением, поэтому, вероятно, что низкая концентрация vWF и крупные мультимеры в плазме пациента не связаны с дефектом синтеза. Однако по сравнению со здоровым контролем периода полураспада vWF «Vicenza» снижается в 4,4 раза после десмопрессина [134], что ведет к быстрому выводу vWF из циркуляции и серьезному его недостатку.

Ускоренное выведение vWF из циркуляции вполне может объяснить перекоп в сторону очень крупных мультимеров при типе «Vicenza» (Рисунок 2). Время, в течение которого крупные мультимеры могут быть расщеплены ADAMTS-13, значительно сокращается. Следовательно, соотношение мультимеров похоже на то, что изначально секретируется из эндотелиальных клеток. Это значит, что будут наблюдаться крупные мультимеры и мало продуктов расщепления ADAMTS-13, что и является признаками типа «Vicenza» [131; 178].

Последний механизм, приводящий к типу 1 БВ, это повышенная восприимчивость vWF к протеолитическому расщеплению. Замена p.Tyr1584Cys была выявлена у 3-25% пациентов с БВ типа 1, по сравнению с частотой <2% в контрольной группе здоровых людей [36; 65; 73; 73; 75; 162]. Эта мутация не меняет время полураспада vWF [164], но слегка увеличивает восприимчивость vWF к расщеплению ADAMTS-13 [36], что может привести к нарушению формирования тромба. Мутация p.Tyr1584Cys немного снижает уровень vWF: Ag и vWF: RCo [75], что согласуется с данными, показывающими повышенное внутриклеточное удержания рекомбинантных 1584Cys vWF [65]. Вариант 1584Cys не связан с низким уровнем vWF или с кровотечениями в семьях с его носительством [73; 75; 162], эта замена является небольшим фактором риска для развития БВ типа 1.

Резюмируя, можно выделить четыре основных механизма возникновения типа 1 БВ:

- Сниженная секреция vWF из-за нарушенной экспрессии гена *VWF*;
- Ускоренное выведение vWF из кровяного русла (фенотип «Vicenza»);
- Нарушение внутриклеточного транспорта субъединиц vWF;
- Повышенный протеолиз vWF при помощи ADAMTS-13.

Итого, несколько различных механизмов могут вызвать тип 1 БВ. Некоторые механизмы можно определить опосредованно. Например, в случаях, связанных с быстрым выводом из кровотока, будет наблюдаться характерная реакция на тестовую дозу десмопрессина.

Клиническая значимость гетерогенности типа 1 еще исследуется, что может привести к изменениям в классификации БВ [174].

1.3.2 Тип 2 болезни Виллебранда

Варианты типа 2 БВ включают в себя качественные дефекты vWF. Тип 2 делится по конкретным функциональным и структурным дефектам, которые нарушают адгезию тромбоцитов или связывание FVIII.

1.3.2.1 Тип 2А болезни Виллебранда

Тип 2А БВ включает в себя качественные варианты, вызванные снижением vWF-зависимой адгезии тромбоцитов и дефицитом высокомолекулярных мультимеров. Для такого распределения мультимеров могут быть две причины: нарушение их сборки или повышенная чувствительность к расщеплению с помощью ADAMTS-13. В некоторых случаях возможно определить, какой механизм повлек патологию, локализовав патогенное изменение в гене и проанализировав его воздействие на мультимерную структуру. Независимо от механизма, потеря больших мультимеров вызывает снижение взаимодействий vWF с тромбоцитами (vWF:RC_o) или с эндотелием сосудов (vWF:CB) [62] по сравнению с уровнем vWF:Ag. Тип 2А обычно наследуется доминантно, но рецессивные случаи тоже известны.

Дефект мультимерной сборки приводит к секреции небольших мультимеров, которые слабо взаимодействуют с тромбоцитами и эндотелием. В результате они слабо подвержены протеолизу [152], и картина электрофореза мультимеров похожа на ту, что изначально секретруется в эндотелии (то есть без дополнительных бледных полос (Рисунок 2Б)). Такой фенотип может быть вызван мутациями по меньшей мере в трех областях *VWF*.

Во-первых, дефекты в сборке могут быть результатом гомозиготных мутаций или компаундных гетерозигот в пропептиде vWF, которые предотвращают мультимеризацию в аппарате Гольджи. Эти мутации вызывают характерную мультимерную структуру, в которой отсутствуют бледные полоски, соответствующие продуктам протеолиза. Этот фенотип наследуется рецессивно, он был изначально обозначен как «Тип IIС» [22; 69; 89].

Дефекты в мультимерной сборке также могут быть вызваны гетерозиготными мутациями в цистеиновом узле, которые предотвращают димеризацию «дисульфидными мостиками» в эндоплазматическом ретикулуме. В этом случае смесь мутантных мономеров предшественника vWF и нормальных димеров оказываются в аппарате Гольджи, где включение мутантных

мономеров в растущий мультимер vWF прекращает его рост. В результате наряду с обычными мультимерами с четным количеством субъединиц секретируются укороченные мультимеры, содержащие нечетное количество субъединиц vWF. Этот фенотип был изначально обозначен «Тип IID» [18; 51].

Наконец, дефекты в мультимерной сборке могут быть вызваны гетерозиготными мутациями в домене D3, которые мешают образованию «дисульфидных мостиков» в аппарате Гольджи. Такие мутации часто возникают в цистеиновых остатках и создают смазанную мультимерную картину, возникающую из-за гетерогенности в образовании дисульфидных связей. Этот фенотип был изначально обозначен «типом IIE» [143; 143; 152].

В некоторых случаях гетерозиготные мутации в домене D3 (например, p.Cys1099Tyr и p.Met1051Thr) [155], не вызывают нарушения «дисульфидных мостиков». Мультимерная картина оказывается такой же четкой и с таким же перекосом в сторону мелких мономеров, как в случае нарушений в пропептиде, однако концентрация vWF в плазме существенно выше, чем обычно. Этот фенотип был назван «Тип VWD IIC Miami» [114].

Увеличенный протеолиз может вызвать тип 2А БВ, несмотря на нормальную мультимерную сборку vWF и секрецию (Рисунок 2). Такой вариант типа 2А был назван «тип IIA». Он вызывается повышенным протеолизом при помощи [152] ADAMTS-13. Мутации, обуславливающие этот фенотип, локализованы внутри или рядом с доменом A2, их разделили на две группы. Мутации группы I усиливают протеолиз, и затрудняют мультимерную сборку vWF, тогда как мутации группы II усиливают протеолиз, не уменьшая секрецию крупных мультимеров [94]. Компьютерное моделирование позволяет предположить, что мутации обеих групп ухудшают сворачивание домена A2 и делают связь Tyr1605-Met1606 доступной для ADAMTS-13 без необходимости связывания с тромбоцитами или высокого жидкостного напряжения сдвига. Мутации группы I, по-видимому, оказывают более разрушительное влияние на структуру домена A2, которая может объясняться их негативным влиянием на сборку мультимеров [107].

Резюмируя, можно выделить несколько механизмов развития типа 2А БВ:

- Тип IIA, связанный с повышенным расщеплением при помощи ADAMTS-13;
- Нарушение сборки мультимеров тип IIE (нарушение образование дисульфидных мостиков в аппарате Гольджи);
- Нарушение сборки мультимеров тип IID (нарушение димеризации в эндоплазматическом ретикулуме);
- Нарушение сборки мультимеров тип IIC (нарушение мультимеризации в аппарате Гольджи).

Тип 2А вызывается разными механизмами, но эти различия в настоящее время не используются для дальнейшего подразделения типа 2А, поскольку клиническая польза от такого деления не ясна. Определение вариантов типа 2А требует электрофореза с высокой разрешающей способностью для анализа мультимеров или секвенирования гена, а эти методы не широко доступны [174].

1.3.2.2 Тип 2В болезни Виллебранда

Тип 2В БВ был описан в 1980 [80]. Он включает в себя качественные нарушения vWF с повышенной аффинностью к рецептору GPIb тромбоцитов. Этот тип характеризуется повышенной ристоцетин-зависимой агрегацией тромбоцитов (RIPA) при низких концентрациях ристоцетина [80] из-за повышенного сродства мутантного vWF к GPIb тромбоцитов. Пациенты с типом 2В часто имеют тромбоцитопению, которая может усугубляться стрессом или десмопрессином [125]. Большинство пациентов с типом 2В демонстрируют снижение доли крупных мультимеров, а также заметно повышенный протеолиз субъединиц vWF [80; 152]. Мутации типа 2В не ухудшают сборку крупных мультимеров vWF, но после секреции они спонтанно связываются с тромбоцитами и разрушаются с помощью ADAMTS-13. Полученные небольшие мультимеры не позволяют эффективно инициировать адгезию тромбоцитов. Кроме того, уже связанные тромбоциты не могут взаимодействовать с тканью сосуда [66].

Гетерозиготные мутации, которые вызывают тип 2В, располагаются внутри или вблизи домена А1 [77; 104; 143; 156; 169], который изменяет конформацию при связывании с GPIb тромбоцита [150]. Мутации вызывают повышение связывания с тромбоцитами из-за стабилизации связанной конформации домена А1 [150].

Тип 2В Malmö или Нью-Йорк вызван мутацией p.Pro1266Leu и связан с увеличением RIPA при низких концентрациях ристоцетина [180], хотя RIPA была нормальной у некоторых пациентов с этой мутацией [133]. Плазменное распределение мультимеров нормальное, протеолиз субъединиц vWF не увеличен, а десмопрессин не вызывает тромбоцитопению при этом фенотипе. Некоторые люди с типом 2В Malmö или Нью-Йорк имели легкие кровотечения, а некоторые нет [133; 180; 183; 186]. Таким образом, мутация p.Pro1266Leu может вызывать повышенную чувствительность к ристоцетину *in vitro*, но обычно повышает адгезию тромбоцитов *in vivo*. Эти наблюдения позволяют предположить, что снижение количества крупных мультимеров vWF в плазме и повышение протеолиза субъединиц могут коррелировать с вероятностью значительного кровотечения для пациентов с показателями RIPA, характерными для типа 2В.

Фенотип, аналогичный типу 2В БВ, может быть вызван гетерозиготной мутацией в GPIIba тромбоцитов [60; 88; 109; 139], и это заболевание называется псевдо БВ [103; 130]. Считается, что мутации стабилизируют связанную конформацию с GPIIba тромбоцитов в домене А1 [150].

1.3.2.3 Тип 2М болезни Виллебранда

Тип 2М включает в себя качественные варианты со снижением vWF-зависимой адгезии тромбоцитов без дефицита высокомолекулярных мультимеров vWF. Синтез и секреция крупных мультимеров vWF сохранены, а функциональный дефект вызван мутациями, которые нарушают связывание vWF с тромбоцитами или с субэндотелием сосуда. Изначально тип 2М был назван «IC тип». На электрофореграмме мультимеров было видно снижение спутниковых (бледных) полос и смещение в распределении мультимеров в сторону более крупных [85]. Это позволяет предположить, что снижение связи с тромбоцитами уменьшает время воздействия ADAMTS-13 на субъединицы, препятствует их расщеплению. Картина мультимеров оказывается близкой к изначальной, образующейся в клетках эндотелия (Рисунок 2Б). Дополнительные исследования были бы полезны для оценки влияния мутаций 2М типа на связывание тромбоцитов, распределение мультимеров и их деградацию на субъединицы.

Большинство случаев типа 2М были определены на основе значения vWF:RCo, которое непропорционально низко по сравнению с vWF:Ag. Такие пациенты обычно имеют мутации в домене А1, которые снижают связывание с рецептором GPIIb тромбоцитов [77; 143; 169; 177]. Известна семья с типом 2М БВ, в которой у матери и дочери наблюдалась непропорционально низкая способность vWF связываться с коллагеном (vWF:CB), обусловленная мутацией в домене А3 [146]. Для диагностики типа 2М важно использовать весь комплекс коагулологических анализов, поскольку vWF:CB, например, нечувствителен к мутациям, которые нарушают связывание тромбоцитов и снижают vWF:RCo, и наоборот, vWF:RCo не может обнаружить дефекты связывания коллагена, которые хотя и редки [174], но могут ухудшить адгезию тромбоцитов *in vivo*.

1.3.2.4 Тип 2N болезни Виллебранда

Тип 2N включает варианты БВ со значительно сниженной способностью связываться с FVIII. Он вызывается гомозиготными или компаундными гетерозиготными мутациями гена *VWF*, которые нарушают способность связывания с FVIII (vWF:FVIII). Иногда оба аллеля несут мутации, нарушающие связывание vWF с FVIII, но бывают случаи, когда только один аллель

имеет такой дефект, а нарушение во втором аллеле значительно снижает или полностью элиминирует экспрессию vWF. Такие полностью деактивирующие аллель нарушения называются «ноль-мутацией». Мутации в гене *VWF*, соответствующие типу 2N, обычно происходят внутри сайта связывания FVIII-vWF, который находится между Ser764 и Arg1035 и охватывает домен D' и часть домена D3 [77; 171]. Некоторые мутации в С-конце домена D3 за остатком Arg1035 также могут снижать связывание FVIII [63; 166; 167]. БВ типа 2N можно спутать с гемофилией А легкой степени, особенно у мужчин [136]. Прокоагулянтная активность FVIII (FVIII:C) непропорционально снижена по сравнению с vWF:Ag при типе 2N, и диагноз зависит от измерения сродства vWF пациента к FVIII (vWF:FVIII), обычно при твердофазном иммуноанализе [115]. Значения vWF:FVIII обычно <0,1 для пациентов с типом 2N и приблизительно около 0,5 для гетерозиготных носителей [102; 171].

Уровень FVIII в плазме коррелирует со специфическими мутациями БВ типа 2N. В одном исследовании пациенты с мутациями, серьезно нарушающими связывание FVIII, имели уровни FVIII $8,4 \pm 5,2\%$, а пациенты с относительно распространенной, но менее тяжелой мутацией (p.Arg854Gln) имели уровни FVIII $21,8 \pm 9,8\%$ [102]. Это различие имеет клиническую значимость, потому что индивиды с мутацией p.Arg854Gln могут иметь устойчивое и терапевтически полезное увеличение FVIII после введения десмопрессина, тогда как пациентам с более тяжелыми мутациями десмопрессин не помогает [32; 33; 40; 67].

1.3.3 Тип 3 болезни Виллебранда

Тип 3 БВ выражается в полном отсутствии работающего vWF. БВ типа 3 передается по наследству как рецессивный признак, и у гетерозиготных родственников симптомы кровотечения обычно легкие или отсутствуют [57; 74; 82]. В большинстве случаев vWF:RCo, vWF:CB и vWF:Ag составляют <5%, а FVIII:C <10%. Мутации в гене *VWF*, вызывающие БВ типа 3, обычно представляют собой нонсенс-мутации или сдвиги рамки считывания из-за небольших вставок или делеций. Большие делеции, мутации сайтов сплайсинга и миссенс-мутации встречаются реже [58; 77; 106]. Практически полное отсутствие vWF классифицируется как БВ типа 3. Термин «тяжелое» течение БВ иногда используется для типа 3 и иногда для симптоматической БВ типа 1, характеризующейся очень низкими значениями vWF:Ag, vWF:RCo, но эти состояния почти всегда клинически различны. БВ типа 1, доминантно наследуемая и вызванная гетерозиготными мутациями, редко ассоциируется с такими низкими значениями vWF:RCo и vWF:Ag, как 10%. БВ типа 3, вызванная клинически рецессивными мутациями, обычно связана с значением vWF (<5%) [174].

1.4 Установление диагноза болезни Виллебранда

Симптомы, которые свойственны БВ – это носовые кровотечения, меноррагии, кровотечения из мелких ран. Большинство пациентов страдает кровотечениями после операций и удаления зубов [34] [52].

Серьезным и опасным проявлением являются желудочно-кишечные кровотечения, они обычно свойственны пациентам с типами 3 и 2 БВ [52; 160]. Суставные кровотечения являются частым проявлением гемофилии А, а у пациентов с БВ встречаются реже, в основном при типах 2N или 3 [68].

Существуют возрастные особенности, связанные с содержанием vWF в крови. С возрастом концентрация vWF повышается, и у пациентов с типом 1 vWF:RCo и vWF:Ag могут достигнуть нормальных значений [41], тем не менее, кровотечения не прекратятся [175]. При типе 2 с возрастом увеличивается концентрация vWF, но не восстанавливается функция, поэтому кровотечения не прекращаются, а обычно ситуация даже ухудшается [175]. Автором представлен алгоритм диагностики БВ, согласно работе Leebeek и Eikenboom 2016 года [99]. Схема (Рисунок 5) отражает алгоритм, выработанный для диагностики при отсутствии генетических методов исследования [99].

При подозрении на БВ, то есть при наличии кровотечений, необходимо лабораторное обследование, измеряют vWF:Ag, vWF:RCo, FVIII:C. Пациенты со значениями vWF:RCo между 30-50% (нижняя граница нормы), ранее классифицировались как не имеющие БВ, как «низкий vWF» или «возможно, тип 1 БВ» [99], с 2021 года классифицируются как БВ тип 1 [28].

В случае, если соотношение FVIII:C/vWF:Ag меньше или равно 0,7, ставят диагноз тип 2N БВ. В этом случае однозначное подтверждение диагнозу даст анализ на связывание vWF с FVIII (vWF:FVIII). Он довольно редко проводится, но позволяет однозначно определить снижение способности vWF связываться и защищать от распада FVIII. Этот анализ особенно важен для различения БВ 2N типа и гемофилии А, имеющих сходные симптомы [165]. Поскольку анализ vWF:FVIII редко осуществляется, был предложен способ диагностики 2N типа БВ на основе тромбоэластографии до и после двухкратной инфузии концентрата vWF [9].

При радикально низком значении vWF:Ag (<5%) определяют тип 3 или тяжелую форму типа 1. Однозначно разделить эти диагнозы можно при помощи анализа, показывающего количество пропептида vWF (vWFpp) в крови. Если его значение ниже 5%, то это тип 3, характеризующийся полным отсутствием функционального vWF, если значение vWFpp выше или равно 5%, то диагностируют тяжелую форму БВ типа 1 [181].

Если vWF:RCo < 30%, то исследуют соотношение vWF:RCo/vWF:Ag. В случае если оно больше 0,6, а распределение мультимеров нормальное, то диагностируют тип 1.

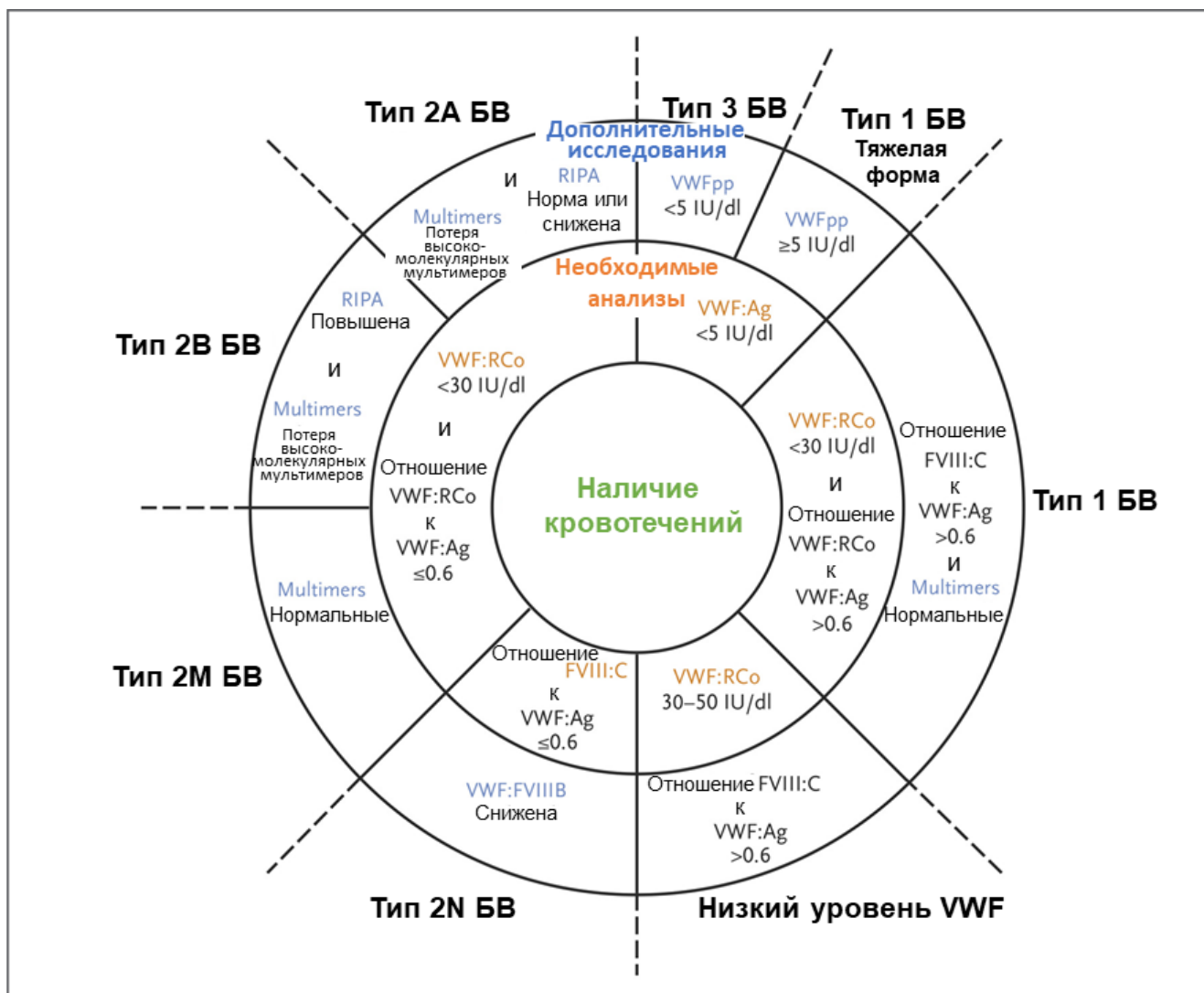


Рисунок 5 – Схема диагностики типов БВ; адаптировано по [99]

Если $vWF:RCo < 30\%$, но соотношение $vWF:RCo/vWF:Ag$ меньше или равно 0,7, то диагностируют тип 2 БВ (тип А или В или М). Для дифференциальной диагностики типов 2 используют два показателя. Значение RIPA будет повышено при типе В, характеризующимся повышенной афинностью к тромбоцитам, и будет нормальным или сниженным в других случаях. Электрофорез мультимеров покажет нормальное распределение при типе 2М и потерю высокомолекулярных мультимеров при типах 2В и 2А [1; 99] (Рисунок 5).

Для более точного диагноза с выяснением причины заболевания (тип 1) и подтипов типа 2, а также для планирования семьи и пренатальной диагностики может быть рекомендовано исследование мутаций в гене *VWF* [1; 99].

Применение молекулярно-генетических методов для установления подтипа БВ описано в руководстве ISTH 2021 года [28].

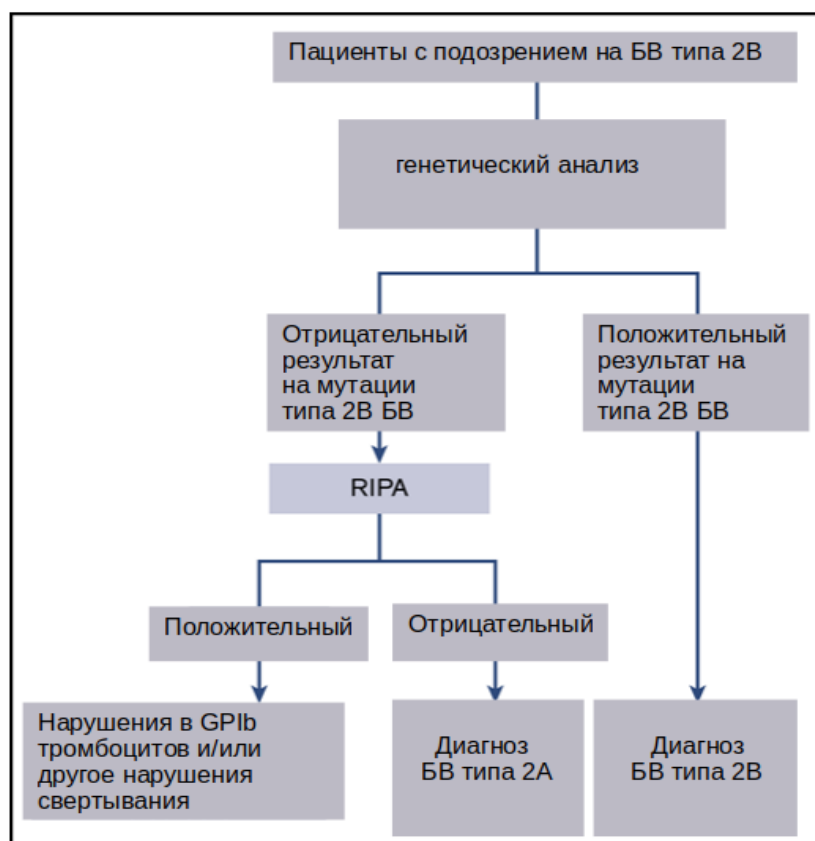


Рисунок 6 – Алгоритм диагностики БВ тип 2В; адаптировано по [28]

Для установления диагноза БВ тип 2В рекомендуется на первом этапе использовать генетическое тестирование и опираться на его результаты (Рисунок 6) [28].

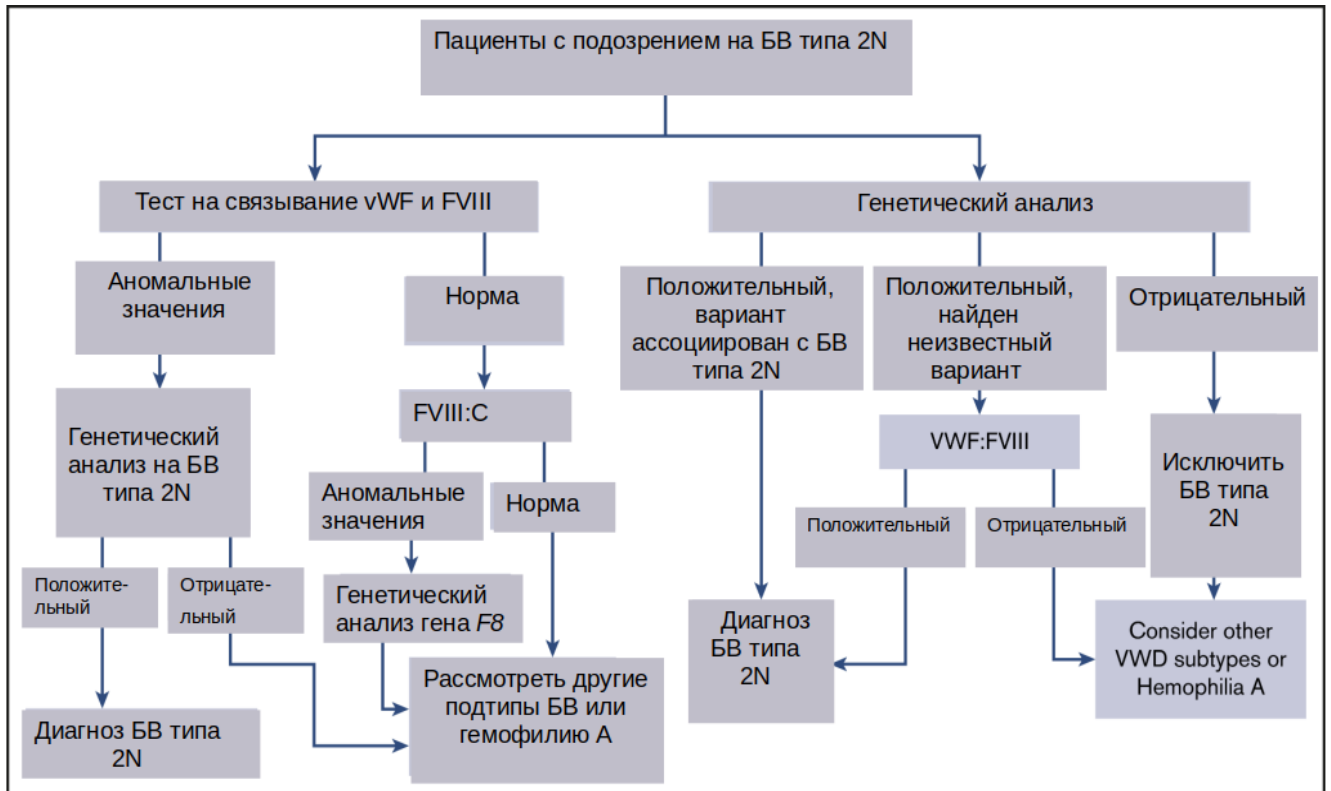


Рисунок 7 – Алгоритм диагностики БВ тип 2N; адаптировано по [28]

Для установления диагноза БВ подтип 2N рекомендуется на первом этапе использовать либо генетическое тестирование, либо тест на связывание vWF с FVIII (vWF:FVIII). Во втором случае генетическое тестирование все равно будет рекомендоваться, если тест покажет отклонения от нормы (Рисунок 7) [28].

Молекулярно-генетические методы позволяют с высокой точностью диагностировать типы 2N и 2B, внести больше ясности в клиническую картину при других типах заболевания, а также собрать более полный анамнез о донорах материалов для ЭКО при планировании семьи.

1.5 Лечение и профилактика кровотечений при болезни Виллебранда

Лечение БВ различается в зависимости от целей, которые поставлены на данный момент. Ими могут быть: остановка острых кровотечений, предотвращение массивных кровотечений при операциях и удалении зубов, профилактическое лечение для пациентов, подверженных спонтанным кровотечениям. Отдельное внимание обычно уделяют профилактике меноррагий и ведению беременности и родов у пациенток с БВ.

В западных странах основными препаратами являются десмопрессин, высвобождающий эндогенный vWF и концентрат FVIII/vWF для всех типов болезни, требующих серьезного лечения [99]. В России десмопрессин не используется [1], и основным препаратом для лечения

является концентрат FVIII/vWF [2; 3; 10], требующий специальной очистки от вирусов [8]. Легкая форма БВ типа 1 часто протекает незаметно для носителя патогенного варианта, в случае, если носитель прибегает к медицинской помощи, ему назначают в России транексамовую кислоту. Также в арсенале профилактической помощи есть гормональная терапия [1].

Появление антител против vWF является редким осложнением БВ, с оценочной распространенностью 6–10% у пациентов с БВ 3 типа [96; 101]. Пациенты с этим осложнением, так же как и остальные пациенты с БВ, имеют дефект гена *VWF*. Почти все случаи встречаются у пациентов с БВ 3 типа с частичными или полными делециями гена *VWF* [61; 72], хотя недавно был описан случай аллоантител у пациента БВ 2В типа [64].

Генная терапия уже успешно используется для лечения гемофилии [100], но при БВ ее применение осложнено большим размером гена *VWF*, что приводит к трудностям встраивания кДНК *VWF* в большинство векторов. Несмотря на эти сложности, есть исследования на мышах, показывающие эффективность генной терапии. [81].

Таким образом, дифференциальная диагностика типов БВ наиболее важна для подтипов типов 2В и 2N БВ, так как эти типы могут иметь сходную клиническую картину с другими коагулопатиями и требуют отдельного внимания при выборе терапии. Особенно важен с практической точки зрения молекулярно-генетический анализ для типов 2В и 2N БВ.

Анализ на тип 2В БВ является важным с практической точки зрения, так как:

1. Для стран, применяющих десмопрессин, очень важно не использовать его у пациентов с типом 2В БВ во избежание тромбозов [3].
2. Анализ важен для планирования семьи, легкость его выполнения позволяет сделать такой анализ быстро. На его основе возможно отбирать эмбрионы при ЭКО.
3. Для подтверждения диагноза БВ тип 2В необходимо проанализировать только экзон 28 гена *VWF*; поскольку тип наследуется доминантно, достаточно одной мутации, чтобы сделать выводы о диагнозе.

Диагностика типа 2N наиболее актуальна среди других типов БВ по ряду причин:

1. Этот тип имеет сходную клиническую картину с легкой формой гемофилии А у мужчин и носительством гемофилии А у женщин, поэтому важно дифференцировать этот тип при ЭКО. Сам тип 2N наследуется рецессивно, поэтому нет смысла отбирать эмбрионы по гену *VWF*, однако важно доказать, что наблюдаемые отклонения в коагулограмме у консультируемой не имеют отношения к гемофилии А и гену *F8*, поскольку нарушения в гене *F8* бывают разного характера и не все можно выявить методами секвенирования по Сэнгеру и NGS, например, крупные делеции одного аллеля у женщин [15].

2. Отличать его от гемофилии А необходимо, чтобы препараты, которыми проводится лечение, характеризовались высоким содержанием vWF, во избежание тромбозов [3; 145].
3. Анализ сравнительно малозатратный по сравнению с типами 1 и 3; из 51-го экзона анализу подвергаются только 11.

Не смотря на то, что базы данных мутаций гена *VWF* содержат значительный объем данных, Российская популяция пациентов с БВ все еще остается не изученной с точки зрения молекулярно-генетических методов диагностики, может как отличаться распределением мутаций по гену, так и включать ранее неизвестные мутации; кроме того, известные мутантные аллели не всегда дают стабильную клиническую картину и пополнение данных об их влиянии на течение болезни может пополнить мировые знания о механизме развития болезни. Данная работа позволит оценить спектр мутаций для отечественной выборки пациентов с БВ, выявить новые, не отмечавшиеся ранее, варианты гена *VWF*, а также уточнить коагулологические параметры для пациентов с уже известными мутациями.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Характеристика пациентов и дизайн исследования

Научное исследование выполнено в лаборатории генной инженерии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (руководитель лаборатории Сурин В.Л.).

В работу включены 50 пациентов и 8 родственников пациентов. Клинические и коагулологические данные были взяты из их историй болезни: ФГБУ «НМИЦ Гематологии» Минздрава России (Москва, n=30), ГАУЗ СО Центр детской онкологии и гематологии (Екатеринбург, n=23), ФГБОУ ВО "СЗГМУ им И.И. Мечникова" Минздрава России (Санкт-Петербург, n=5).

Биологическим материалом для исследования служила цельная кровь.

В исследование были включены пациенты с входящим диагнозом БВ (n=13), с запросом дифференцировать тип 2N БВ и гемофилию А (n=4), дифференцировать 2В тип БВ и тромбоцитопению (n=1), с запросом исключить БВ (n=1), и пациент, для которого была исключена гемофилия А, и как следствие, был заподозрен тип 2N БВ (n=1). Также в исследование вошли пациенты, которым был установлен дифференциальный диагноз с указанием типа БВ: 10 пациентов с типом 1 БВ, 9 пациентов с типом 3 БВ, 2 пациента с типом 2А, 7 пациентов с типом 2В и 1 пациент с недифференцированным типом 2 (Таблица 2, Приложение Г, Таблица 20).

Работа проводилась в период с 2018 по 2023 годы. Имеющиеся данные по половозрастному составу представлены в Приложении Г в Таблице 20. Возраст пациентов, по которым имеются данные, варьировался от трех до 72-х лет, медиана 42 года. В исследование было включено 22 (38%) мужчины и 36 женщин (62%).

Мутации в гене *VWF* выявляли методом секвенирования по Сэнгеру. Молекулярно-генетические работы проводились в лаборатории генной инженерии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (руководитель лаборатории Сурин В.Л.). Секвенирование выполняли в Центре коллективного пользования «Геном», Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва и ЗАО «Евроген Ру», Москва.

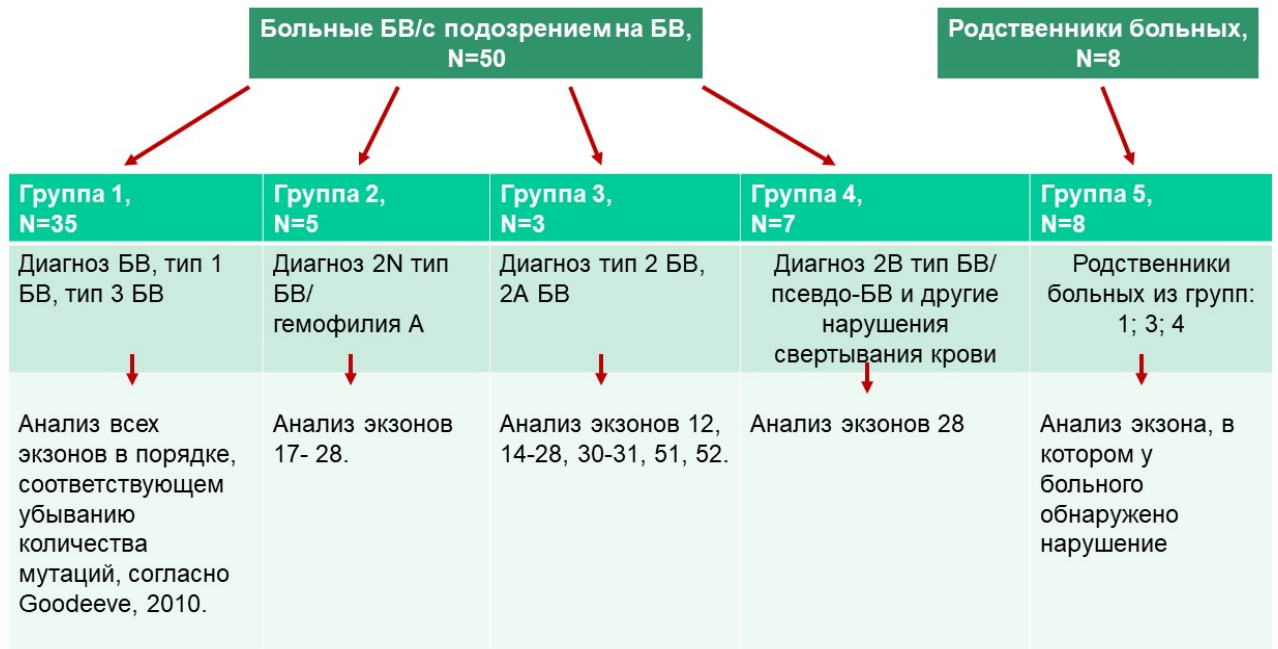


Рисунок 8 – Дизайн исследования

В исследование были включены пациенты, материал которых был направлен в лабораторию генной инженерии для выявления нарушений в гене *VWF*. В Таблице 2 и на Рисунке 8 приведены врачебные запросы и алгоритм проверки гена *VWF* на мутации в каждом случае.

Таблица 2 – Врачебный запрос и алгоритм анализа гена *VWF*.

Врачебный запрос	Количество пациентов	Пациенты	Алгоритм анализа гена <i>VWF</i>
Недифференцированный диагноз БВ. Подтвердить БВ, определить тип.	13	w2, w3, w4, w8, w11, w14, w17, w21, w22, w25, w28, w52, w56	Анализ всех экзонов в порядке, соответствующем убыванию количества мутаций, согласно Goodeeve, 2010 [78].
Диагноз тип 3 БВ. Подтвердить.	10	w10, w13, w15, w16, w23, w26, w29, w31, w48-1, w55	

Врачебный запрос	Количество пациентов	Пациенты	Алгоритм анализа гена <i>VWF</i>
Диагноз тип 1 БВ. Подтвердить.	11	w6, w7, w18, w27, w34, w35, w40-1, w42, w43, w44, w51	
Исключить БВ.	1	w9	
Диагноз тип 2 БВ недифференцированный. Подтвердить, определить подтип.	1	w24	Анализ экзонов 12, 14–28, 30–31, 51, 52.
Дифференцировать 2N тип БВ и гемофилию А	4	w53, w54, w57, w58	Анализ экзонов 17–28.
Пациент с входящим диагнозом «гемофилия А», анализ гена F8 которого не выявил патологических изменений. Проверить на 2N тип БВ.	1	A456	
Дифференцировать 2В тип БВ и тромбоцитопению, подозрение на тип 2В	7	w59, w30, w32-1, w38, w41, w46-1, w50	Анализ экзона 28
Подозрение на 2А тип. Подтвердить.	2	w20, w37-1	Анализ экзонов 12, 14–28, 30–31, 51, 52.
Родственники пациентов	8	w20-2, w 32-2, w37-2, w40-2 w46-2, w48-2, w 51-2, w51-3	Анализ экзонов, в которых у пациентов обнаружены мутации.

Во всех случаях поиск мутаций начинался с 28-го и 18-го экзонов (кроме запроса подтвердить тип 2В). Далее проверка экзонов производилась, пока не были найдены мутации, объясняющие патологию, то есть 1 мутация для доминантно наследуемых типов, и 2 мутации для рецессивно наследуемых.

Данные коагулологического анализа были взяты из истории болезни пациентов (Приложение А, Таблица 17). *VWF:Ag* был измерен иммунотурбидиметрическим методом, *FVIII:C* была измерена клоттинговым методом, также для большинства пациентов имелись

данные по vWF:RCo (агрегационный метод), агрегации тромбоцитов с ристомидином (агрегационный метод), АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время, клоттинговый метод).

Для лабораторного исследования использована периферическая венозная кровь (2–3 мл), смешанная с антикоагулянтом – этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Доставка образцов из других городов, участвовавших в исследовании, осуществлялась не позднее чем через 24 часа от момента забора крови, температура при транспортировке была +4°C. Пробоподготовка к проведению секвенирования по Сэнгеру включала несколько этапов: экстракция геномной ДНК из клеток крови, постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР), контроль эффективности амплификации, очистка продуктов амплификации, контроль сохранности амплификата после очистки. Далее проводилось секвенирование по Сэнгеру и анализ полученных нуклеотидных последовательностей биоинформатическими пакетами программ.

2.2 Лабораторное исследование

2.2.1 Экстракция геномной ДНК из периферической крови

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществлялось стандартным методом фенол-хлороформной депротеинизации после обработки протеинкиназой К [142].

Подготовку пробы и обработку протеинкиназой К проводили следующим образом:

- весь имеющийся объем крови с ЭДТА заливали гемолизирующим буфером (8,4 г NH₄Cl на 1л дистиллированной воды) до объема 50 мл на 20 минут;
- центрифугировали 15 мин. при 1600 оборотов/мин.;
- надосадочную жидкость сливали, осадок промывали с помощью 500 мкл буфера STE (150 мМ NaCl, 15 мМ ЭДТАб 60 мМ tris HCl, pH=8,3), для этого получившуюся смесь центрифугировали при 1600 оборотов/минуту и удаляли супернатант;
- к полученному осадку добавляли 500 мкл буфера STE, SDS до 1% и 20 мкл протеиназы К до концентрации 0.5 мг/мл;
- лизировали при 65°C 1 час.

Далее очищали выделенную ДНК от белков методом фенол-хлороформной экстракции:

- к образцу добавляли равный объем фенола и перемешивали;
- центрифугировали 10 мин при 12 тыс. оборотов/мин;

- верхнюю фракцию перемещали в новые пробирки и добавляли равный ей объем хлороформа и перемешивали
- центрифугировали 10 мин при 12 тыс. оборотов/мин, отбирали в новую пробирку верхнюю фракцию.

ДНК концентрировали этанолом: к супернатанту добавляли 1/9 его объема 3М ацетата натрия (CH_3COONa) для получения 0.3 М раствора и охлажденный 96% этанол в количестве равном 2,5 объемов раствора ДНК. Смесь центрифугировали 10 мин при 12 тыс. оборотов/мин, удаляли супернатант.

Далее отмывали ДНК от остатков солей: к осадку добавляли 1 мл 70% этанола, перемешивали, центрифугировали 10 мин при 12 тыс. оборотов/мин. Надосадочную жидкость удаляли, осадок высушивали и растворяли 200 мкл бидистиллированной воды и хранили при температуре -20°C .

2.2.2 Постановка полимеразной цепной реакции

Олигонуклеотидные системы праймеров, использованные для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования фрагментов гена, были разработаны специально для данного исследования с учетом конкурирующей последовательности псевдогена в лаборатории генной инженерии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (руководитель лаборатории Сурин В.Л.) и синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва). Системы праймеров и условия постановки реакций представлены в Приложении Б в Таблице 18.

Аmplификацию проводили с помощью набора PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Реакционная смесь в конечном объеме 25 мкл содержала 0.01–0.02 мкг геномной ДНК и 10 пкмоль каждого из праймеров. В случае G/C-богатых фрагментов в реакционную смесь добавляли бетаин (1М) (Приложение Б, Таблица 18).

Для проведения ПЦР использовался амплификатор ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Общий вид программы для амплификации ПЦР-продукта был следующим:

1. 95°C , 2 мин;
2. 94°C , 1 мин; $T_{\text{отжига}}^\circ\text{C}$ (Приложение Б, Таблица 18), 1 мин; 72°C , 3 мин. (пункт 2 повторяется 35раз);
3. 72°C , 6 мин;
4. 10°C хранение в приборе.

Эффективность амплификации оценивали с помощью аналитического электрофореза в 1,5 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мл.

2.2.3 Очистка продуктов амплификации

Очистка ПЦР-продукта производилась наборами Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega) осаждением на силиконовых колонках согласно инструкции на сайте производителя [187], а именно:

1. Амплификат переносили в пробирку объемом 1,5 мл;
2. Добавляли к нему 100 мкл Direct PCR Purification Buffer и встряхивали раствор при помощи центрифуги «Вортекс»;
3. Добавляли 1 мл смолы, входящей в набор, и трижды с интервалом в 1 минуту встряхивали при помощи центрифуги «Вортекс»;
4. В колонку вставляли шприц (2 мл) без иглы и поршня;
5. В шприц переносили суспензию. Продавливали суспензию поршнем через шприц и колонку в слив. ДНК осаждалось на колонке;
6. В шприц наливали 2 мл 80%-ного водного раствора изопропанола. Продавливали поршнем в через шприц и колонку в слив, промывая мембрану;
7. Шприц отсоединяли, колонку помещали в чистую пробирку 1,5 мл;
8. Центрифугировали колонку с пробиркой при 10тыс. оборотов/мин на протяжении двух минут с целью очистить мембрану колонки от изопропанола;
9. Добавляли 50 мкл воды в колонку, инкубировали 1 мин, переносили колонку в чистую пробирку;
10. Центрифугировали колонку с пробиркой при 10тыс. оборотов/мин на протяжении 20 секунд, в результате чего растворенная в воде ДНК смывалась в пробирку. Колонку удаляли,

В случае, если кроме необходимого ПЦР продукта амплифицировался дополнительный неспецифичный, то полосу нужной длины вырезали из геля и очищали наборами Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) осаждением на силиконовых колонках согласно инструкции на сайте производителя [188], а именно:

1. Вырезанный гель помещали в пробирку 1,5 мл, добавляли равное по массе гелю количество Membrane Binding Solution. Термостатировали при 65°C до растворения геля.
2. Колонку вставляли в специальную пробирку из набора. Раствор переносили в колонку и инкубировали 1 мин.

3. Центрифугировали при 16 тыс. оборотов/минуту на протяжении 1 мин. Сливали жидкость из пробирки и вставляли в нее ту же колонку снова. ДНК оставалась на мембране колонки.
4. Промывали дважды при помощи Membrane Wash Solution (с добавленным по инструкции этанолом). Первый раз в колонку добавляли 700мкл Membrane Wash Solution и центрифугировали при 16 тыс. оборотов/минуту на протяжении 1 мин. Жидкость из пробирку сливали, колонку вставляли в ту же пробирку.
5. Второй раз промывали с помощью 500мкл Membrane Wash Solution и центрифугировали при 16 тыс. оборотов/минуту на протяжении 5 мин. Жидкость из пробирки сливали. Колонку вставляли в ту же пробирку.
6. Сушили мембрану колонки от этанола, содержащегося в готовом растворе Membrane Wash Solution при помощи центрифугирования на протяжении 1 мин с открытой внутренней крышкой центрифуги.
7. Колонку переносили в чистую пробирку объемом 1,5 мл. Добавляли в колонку 50 мкл воды, инкубировали 1 мин.
8. Центрифугировали 16 тыс. оборотов/минуту на протяжении 1 мин, в результате чего растворенная в воде ДНК смывалась в пробирку. Колонку удаляли.

Наличие ПЦР-продукта после очистки оценивали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

2.2.4 Секвенирование по Сэнгеру и анализ мутаций

Определение нуклеотидной последовательности проводили с помощью секвенирования по методу Сэнгера с использованием набора ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 (Thermo Fisher Scientific). Капиллярный электрофорез был выполнен на автоматических генетических анализаторах ДНК ABI PRISM 3500 (Thermo Fisher Scientific) в Центре коллективного пользования «Геном» в Институте молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта, РАН, Москва, и компании ЗАО «Евроген Ру», Москва. Полученные последовательности сопоставляли с соответствующими референсными последовательностями гена *VWF* из базы данных NCBI: NG_009072.1. При анализе последовательности использовали программный пакет BioEdit, UGENE [24; 173]. Найденные несинонимичные замены, делеции и инсерции проверялись по международным базам данных (LOVD3 [163], HGMD [83], NCBI ClinVar [46]) на патогенность. Патогенность новых мутаций оценивали согласно критериям, приведенным в руководстве по интерпретации данных, полученных методом массового параллельного секвенирования [11]. В

качестве одного из критериев оценки патогенности (PP3) несинонимичных замен использованы протеомные программы:

- PolyPhen-2 v2.2.2, [16; 126];
- PROVEAN v1.1.3, [45; 129];
- SIFT version 5.1.1, [147; 148];
- MutationTaster2, [112; 113].

Первой программой, которой проводили анализ патогенности, была MutationTaster. Данные были введены в виде номера нуклеотида, измененного в кодирующей последовательности, например с.7580C>A. В качестве результата программа предоставляет не только интерпретацию патогенности, но и позицию замены в хромосоме, например 6078526G>T. Замены в хромосомной нумерации используют комплементарную цепь ДНК по отношению к кодирующей последовательности, поэтому замены в хромосомной нумерации комплементарны заменам в кодирующей последовательности, например с.7580C>A означает то же, что и Ch12:6078526G>T. Хромосомная нумерация была использована для ввода данных в программах PolyPhen, SIFT, Provean.

Таблица 3 – Хромосомные координаты замен, проанализированных протеомными программами

Экзон	Замена аминокислоты кодирующей последовательности	Замена нуклеотида кодирующей последовательности*	Замена нуклеотида в хромосоме 12**
45	p.Pro2527His	c.7580C>A	6078526G>T
28	p.Phe1293Ser	c.3878T>C	6128706A>G
20	p.Asp853Asn	c.2557G>A	6143982C>T

*Использованы для ввода данных в программе Mutation Taster.

**Использованы для ввода данных в программах PolyPhen, SIFT, Provean.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Спектр мутаций российской выборки пациентов

В данной работе молекулярно-генетическое исследование было проведено для 50-ти неродственных пациентов с диагнозом БВ. Мутации в гене *VWF*, вызывающие данное заболевание, были выявлены у 44-х пациентов. Мутационный анализ был также проведен для 8 родственников пациентов с выявленными мутациями. Из них у шести обнаружены патогенные варианты. Всего было найдено 67 нарушений гена *VWF* (75 с учетом родственников), из них 37 были разными. Полученные суммарные результаты приведены в Приложении В в Таблице 19.

Распределение обнаруженных мутаций по экзонам представлено в Таблице 4. Среди них две микроинсерции, пять микроделаций, одна мутация сплайсинга, 3 нонсенс-мутации и 26 миссенс-мутаций.

Таблица 4 – Распределение найденных вариантов по экзонам; если не указано обратное, то подразумевается, что вариант найден в гетерозиготном состоянии

Экзон	Найденные патогенные варианты	Сколько раз найден патогенный вариант**	Тип БВ, ассоциированный с мутацией
7	p.Arg273Trp	2	[19] 3 тип
10	p.Arg373Ter	2	[43] 3 тип
14	p.Met576Ile	1	[59; 159] 1 тип
16	c.2098_2099insG*	2	–
18	p.Thr791Met	2	[53; 161] тип 2N
	c.2435delC	3 в гомозиготном состоянии, 11 – в гетерозиготном	[90] 3 тип
19	p.Arg816Trp	1	[92] 2N
20	p.Asp853Asn*	1	–
	p.Arg854Gln	1 раз в гомозиготном состоянии.	[172] 2N в гомо
21	p.Arg924Gln	2	[39; 108] полиморфизм, ассоциированный с БВ
23	c.2968-2 A>G*	1	–
25	p.Cys1101Arg	1	[55] тип 1

Экзон	Найденные патогенные варианты	Сколько раз найден патогенный вариант**	Тип БВ, ассоциированный с мутацией
26	p.Tyr1146Cys	1 раз в гомозиготном состоянии, 1 в гетерозиготном	[12; 110] тип 2А
27	p.Arg1205His	2	[37; 179] тип 1С, Виченца
28	p.Pro1266Leu	1 (1)	[170] 2В, ген. конверсия
	p.Tyr1271Ter*	1	–
	p.Val1279Ile	1 (1)	[43] сцеплена с БВ, генная конверсия
	p.Phe1293Ser*	1	–
	p.Arg1306Trp	2 (1)	[104] 2В
	p.Arg1308Pro	1	[91] 2В
	p.Arg1308Cys	2	[25; 104] 2В
	p.Val1316Met	1 (1)	[157] 2В
	p.Arg1341Gln	1 (1)	[156] 2В
	p.Arg1374Cys	2	[176] 2М
	p.Arg1399His	1	[50] 2М/2А
	p.Ser1506Leu	2	[93] тип 2
	p.Val1565Leu	2 (1)	[49] повышенный протеолиз при помощи ADAMTS-13
	p.Arg1597Gln	1	[31; 128] 2А
	p.Arg1597Trp	1 (1)	[13; 93] 2А
p.Gly1609Arg	1	[93] 2А	
p.Arg1659Ter	1	[122] 3 (1)	
35	c.6029delC*	1	–
37	c.6457_6458insA*	1	–
40	c.6970delG*	1 (1)	–
44	c.7482delC*	1	–
45	p.Pro2527His*	1	–
52	c.8333_8341delGGAC GGAGC*	1	–

* – новые варианты гена *VWF*

** – в скобках случаи наличия варианта у родственников пациентов.

В основном нарушения были локализованы в экзоне 28 (16 разных мутаций) и в экзоне 18 (преимущественно делеция с.2435delC). В большинстве случаев обнаруженная мутационная картина подтверждала или дополняла клинические данные.

Распределение патогенных вариантов по гену *VWF* в отечественной популяции (Рисунок 9) в целом согласуется с мировыми данными [93] (Рисунок 10).

У 6-ти пациентов мутаций найдено не было. Среди них пациент (w9), для которого требовалось исключить БВ.

Отсутствие дефектов в гене при анализе всех его функционально значимых участков в отдельных случаях может являться ложноотрицательным результатом, обусловленным ограничениями метода. Секвенирование по Сэнгеру не позволяет выявить крупные делеции в гетерозиготном состоянии, поскольку в этом случае прочитывается только сохранившийся нормальный аллель гена. Поэтому при анализе полученных последовательностей уделяли внимание гетерозиготным полиморфным вариациям, наличие которых свидетельствовало об отсутствии делеции в анализируемом участке гена. База данных HGMD насчитывает 67 крупных делеций, при которых наблюдается выпадение целых экзонов. Примером такой делеции может служить выпадение экзонов 33–38 [42].

Второй тип нарушений, который наш метод не может выявить – это глубокие интронные мутации, ведущие к появлению альтернативных сайтов сплайсинга, по своей эффективности сопоставимых или превышающих настоящие сайты.

Мы находили мутации (патогенные варианты гена) и полиморфизмы (варианты гена, не влекущие патологии, а следовательно не заслуживающие упоминания в данной работе). Тем не менее, не все варианты гена могут быть однозначно интерпретированы.

Во-первых, типы 3 и 2N наследуются рецессивно, и для проявления симптомов необходимо 2 мутации. В случае наличия только одной, проявления болезни не будет. Примером такой мутации может служить делеция с.2435delC [90].

Во-вторых, бывают полиморфизмы, сами по себе не патогенные, но сцепленные с мутацией. Такой случай выявлен в нашей выборке один: p.Arg924Gln [108].

В-третьих, существуют функциональные полиморфизмы или «слабые мутации». Это вариант гена, влияние которого само по себе невелико, но в совокупности с мутацией может усиливать симптомы. В нашей выборке к таким нарушениям можно отнести замену p.Val1565Leu, усиливающую подверженность vWF протеолизу под действием ADAMTS-13 [49].

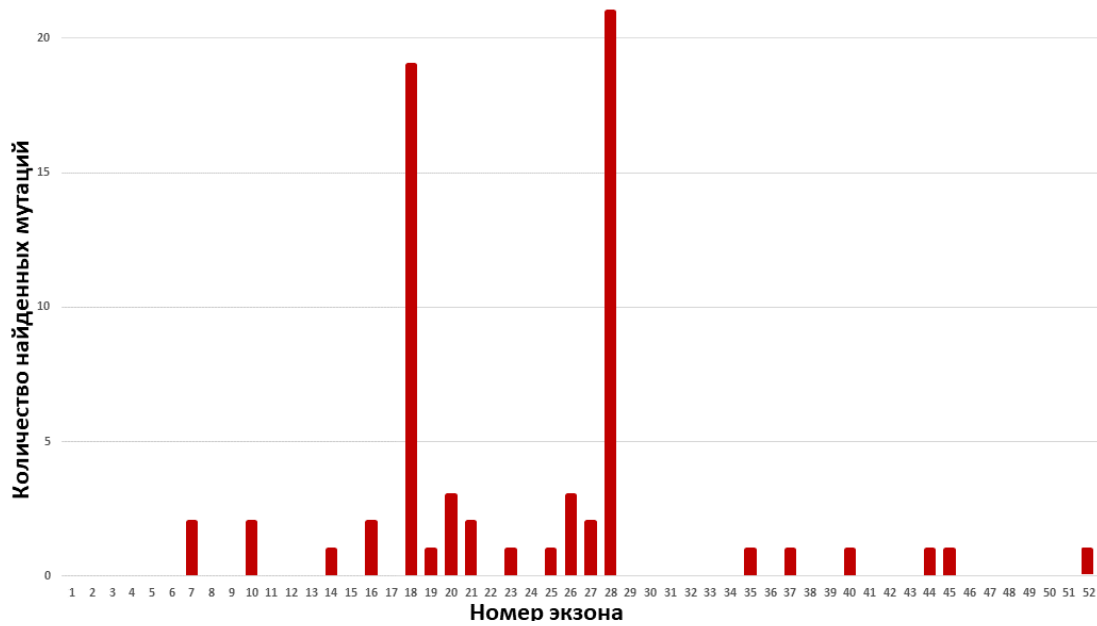


Рисунок 9 – Распределение по экзонам мутаций, найденных в данном исследовании (без учета родственников пациентов)

Таким образом, из 50-ти неродственных пациентов с диагнозом БВ, мутации в гене *VWF*, вызывающие данное заболевание, были выявлены у 44-х пациентов, у 6-ти пациентов мутаций найдено не было. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что при всех типах БВ

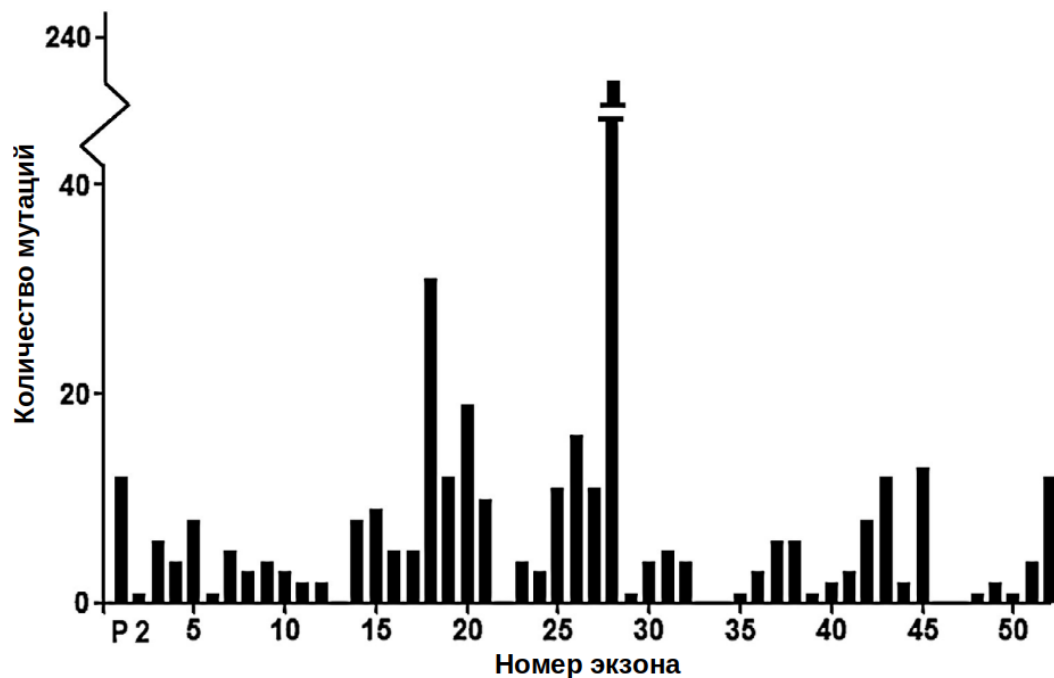


Рисунок 10 – Распределение мутаций по экзонам в мировой выборке; адаптировано по [78]

целесообразно начинать анализ с экзонов 28 и 18 (для типа 2В только экзон 28), так как именно в них чаще всего локализованы патогенные изменения.

3.2 Анализ патогенности новых вариантов гена *VWF*

Из выявленных патогенных вариантов 11 не были описаны ранее в литературе и отсутствуют в базах данных, а именно одна мутация зоны сплайсинга с.2968-2A>G, две микроинсерции с.2098_2099insG и с.6457_6458insA, три микроделеции с.6029delC, с.6970delG и с.7482delC, одна делеция с.8333_8341delGGACGGAGC, одна нонсенс-мутация p.Tyr1271Ter и три миссенс-мутации p.Asp853Asn, p.Phe1293Ser, p.Pro2527His.

В таблице 5 приведены критерии для определения патогенности новых вариантов гена *VWF*, согласно руководству по интерпретации данных, полученных методом массового параллельного секвенирования [11]. Для всех новых мутаций справедлив критерий PM2, то есть отсутствие варианта в контрольных выборках, в данном случае в базах данных. Исключение представляет вариант p.Pro2527His, который был добавлен в базы данных NCBI Clinvar и LOVD3 нами.

Такие варианты как микроделеции, микроинсерции сдвиг рамки считывания, нонсенс-мутации приводят к обрыву считывания, а мутации зоны сплайсинга – к выпадению целых экзонов. Таким образом, для микроделений, микроинсерций, нонсенс-мутаций, мутаций зоны сплайсинга справедлив критерий PVS1: «варианты, приводящие к прекращению синтеза белка (нонсенс-мутации; мутации со сдвигом открытой рамки считывания; изменения канонических (± 1 или ± 2) нуклеотидов сайта сплайсинга)».

Таким образом, вышеприведенные варианты характеризуются как «вероятно патогенный вариант».

В случае микроделений и микроинсерций стоп-кодон при сдвиге рамки считывания появится раньше, чем в норме: в случае микроинсерции с.2098_2099insG через 13 кодонов после нарушения, то есть после 700-го кодона (Asp700GlyfsTer13)); в случае микроинсерции с.6457_6458insA через 23 кодона (Val2153AspfsTer23), микроделеции с.6029delC через 13 кодонов (Ser2010MetfsTer13), микроделеции с.6970delG после 7-ми кодонов (Glu2324SerfsTer7) и микроделеции с.7482delC через 8 кодонов (Lys2495CysfsTer8).

В случае гена *VWF* делеция с.8333_8341delGGACGGAGC в экзоне 52 не вызывающая сдвиг рамки считывания может существенно нарушать функцию белка, поскольку изменение структуры цистеинового узла, кодируемого экзонами 51-52, приведет к невозможности образовывать дисульфидные связи между мономерами vWF [185]. Тем не менее, в экзоне 52

описаны полиморфизмы, поэтому, к сожалению, критерий PM1 (вариант расположен в «горячей» точке и/или важных и хорошо исследованных функциональных доменах белка (например, активный сайт фермента), в которых не описаны доброкачественные изменения), применить по отношению к делеции c.8333_8341delGGACGGAGC нельзя. Таким образом, делеция c.8333_8341delGGACGGAGC классифицируется как «вариант неопределенного значения».

Мы предположили, что поскольку при сдвиге рамки считывания, а также нонсенс-мутациях и мутациях зоны сплайсинга аллель дисфункционален, то такие мутации мы условно связывали с «нулевым аллелем», подразумевая, что в гомозиготной форме синтез функционального белка происходить не должен и будет наблюдаться тип 3 БВ. В гетерозиготной форме при сочетании с нормальным аллелем эффект от таких мутаций предсказать достаточно сложно, а если они встречаются у компаундов, тип заболевания будет определяться скорее второй мутацией, так как с нулевого аллеля считывание либо не пойдет, либо продукт будет дефектным.

Таблица 5 – Определение патогенности новых вариантов гена *VWF*, согласно критериям, приведенным в руководстве по интерпретации данных, полученных методом массового параллельного секвенирования [11]

Новый вариант гена <i>VWF</i>	Критерии патогенности	Классификация варианта
c.2968-2A>G	PM2, PVS1	Вероятно патогенный вариант
c.2098_2099insG	PM2, PVS1	Вероятно патогенный вариант
c.6457_6458insA	PM2, PVS1	Вероятно патогенный вариант
c.6029delC	PM2, PVS1	Вероятно патогенный вариант
c.6970delG	PM2, PVS1	Вероятно патогенный вариант
c.7482delC	PM2, PVS1	Вероятно патогенный вариант
p.Tyr1271Ter	PM2, PVS1	Вероятно патогенный вариант
c.8333_8341delGGACGGAGC	PM2	Вариант неопределенного значения
p.Phe1293Ser	PM2, PP3	Вариант неопределенного значения
p.Asp853Asn	PM2	Вариант неопределенного значения
p.Pro2527His	PM2, BP4	Вариант неопределенного значения

Для проверки соответствия критерию PP3 трех новых миссенс-мутаций использованы протеомные программы:

1. PolyPhen-2 v2.2.2, [16; 126]
2. PROVEAN v1.1.3, [45; 129]
3. SIFT version 5.1.1, [147; 148]
1. MutationTaster2, [112; 113]

Таблица 6 – Результаты анализа новых миссенс-мутаций с использованием протеомных программ.

Программа	p.Phe1293Ser	p.Asp853Asn	p.Pro2527His
Mutation Taster	disease causing	polymorphism	disease causing
PolyPhen	probably_damaging (value=1)	benign (value=0)	probably_damaging (value=0,972)
Provean	Deleterious (value=-3,2; cutoff=-2,5)	Neutral (value=2,81; cutoff=-2,5)	Neutral (value=2,38; cutoff=-2,5)
SIFT	Damaging (value=0)	Tolerated (value=1)	Tolerated (value=0,08)
Вывод	Патогенный вариант	Полиморфизм	Возможно, патогенный вариант

Результаты анализа приведены в Таблице 6. Согласно протеомным программам замена p.Phe1293Ser патогенна, а p.Asp853Asn - полиморфизм. p.Pro2527His имеет смешанную трактовку: согласно Mutation Taster, вариант патогенен, согласно PolyPhen, возможно патогенен, согласно Provean и SIFT, является полиморфизмом. Утверждать наверняка, патогенен вариант или нет, только на основании результатов анализа протеомными программами не вполне корректно, так как точность их прогнозов не очень велика. Так создатели SIFT указывают, что 25% вариантов из базы полиморфизмов (SNP) оценивались программой как патогенные [116], в случае PolyPhen-2 частота ложноположительных результатов может достигать 20% [16]. Создатели Provean оценивают точность результатов анализа программой, как сходные с SIFT и PolyPhen [45].

Таким, образом, критерию PP3 («не менее трех программ предсказания *in silico* подтверждают патогенность») удовлетворяет замена p.Phe1293Ser. Критерию BP4 («результаты не менее трёх программ предсказания патогенности *in silico* подтверждают отсутствие влияния варианта на ген или продукт гена») удовлетворяет замена p.Asp853Asn. Замена p.Pro2527His не соответствует этим критериям. Несмотря на такую разницу в оценке протеомными программами, согласно руководству [11], все миссенс-варианты оказываются «вариантами неопределенного значения».

Из 11-ти вариантов гена *VWF* 7 классифицируются как «возможно патогенные» и 4 как «варианты неопределенного значения».

3.3 ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 1

Мутационная картина для всех пациентов, имевших входящий диагноз тип 1 БВ, представлена в Таблице 7. Тип 1 был представлен во входящих диагнозах достаточно широко (11 пациентов) w6, w7, w18, w27, w34, w35, w40, w42, w43, w44, w51.

У пациентки w6 диагноз не подтвердился, у нее обнаружен тип 2N (подробнее на стр. 58).

Пациент w18 имел довольно низкие коагулологические показатели (vWF:Ag – 5,6%; FVIII:C – 5,1%) и был отнесен к типу 1 по формальным критериям (vWF:Ag>5% [1]). У него найдена делеция c.2435delC в гомозиготном состоянии. Это та мутация, которая была выявлена в семье, по которой впервые была описана БВ [111]. По этой мутации накоплено достаточно мировых данных, чтобы утверждать, что в гомозиготном состоянии она вызывает тип 3 [20]. Следовательно, у пациента w18 тип 3 БВ.

У пациентки w27 был проанализирован весь ген из-за низких коагулологических показателей (vWF:Ag – 10,8%; FVIII:C – 27%; vWF:RCo – 5%), но найдена была только одна мутация p.Arg273Trp в гетерозиготном состоянии. Известно, что в гомозиготном состоянии она соответствует типу 3 БВ, приводит к сильному снижению секреции vWF, не мешает образовывать дисульфидные мостики в эндоплазматическом ретикулуме, но препятствует мультимеризации фактора, ее относят к количественным нарушениям [19]. Тем не менее, гетерозиготные носители этой мутации не имели симптомов [19], что говорит о том, что пациентка w27, вероятно, имеет дополнительное нарушение гена, которое мы не смогли выявить.

У пациента w7 коагулологические данные были на грани между типом 1 и типом 3 (vWF:Ag – 5,3%; FVIII:C – 14%). По номинальным критериям (vWF:Ag> 5 %; FVIII:C> 10% [1]) пациенту был установлен диагноз тип 1 БВ. Молекулярно-генетическими методами у него обнаружены 2 гетерозиготные мутации, не проявляющиеся при гетерозиготном носительстве: c.2435delC, ассоциированная с типом 3 в случае гомозиготы [20], и p.Arg273Trp, патогенность которой обсуждалась ранее. Поскольку у пациента имеются две мутации, в гомозиготном состоянии проводящие к типу 3, и сильно снижены коагулологические показатели, логично предположить, что нарушения находятся на разных аллелях и инактивируют их, то есть у пациента тип 3 БВ.

У пациента w40 найдена мутация p.Arg1308Cys, ассоциированная с типом 2В, это дает возможность предположить, что у пациента тип 2В БВ (подробнее в главе 1.3.2.2).

У пациентки w42 были выявлены две мутации: новая инсерция c.2098_2099insG и p.Arg924Gln, которая трактуется и как полиморфизм, и как мутация, ассоциированная с разными типами БВ. В статье 2012-го года подробно разбирается, с какими типами она бывает

ассоциирована, это могут быть типы 1, 2А, 2М, 3 (при наличии второй мутации со сдвигом рамки считывания, а в данном случае она присутствует) [108]. В случае пациентки w42 высокие показатели vWF:Ag – 38%, FVIII:C – 40,8% не дают основания предположить тип 3. Проанализирован практически весь ген, обнаружен также вариант p.Ala2178Ser, считающийся полиморфизмом [118] и встречающийся в европейской популяции с частотой 0,01-0,02.

У пациентки w43 коагулологическое исследование выявило снижение vWF:Ag (25,5%), при нормальном значении FVIII:C, близком к нижней границе нормы (55%). Найдена замена p.Met576Ile. Она встречается при нарушениях свертываемости [59]. Согласно литературе [153], эта замена ассоциирована с типом 1 БВ, то есть можно считать диагноз «тип 1 БВ» подтвержденным.

У пациентки w44 (коагулологические данные отсутствуют) найдено два варианта: p.Arg1308Pro и p.Val1565Leu. Первый вариант ассоциирован с типом 2В [91]. Вариант p.Val1565Leu присутствует в базе данных NCBI как полиморфизм, встречающийся в популяции с частотой F=0,0834, однако имеются данные о связи этого варианта с несколько повышенным расщеплением мультимеров vWF, осуществляемым металлопротеазой ADAMTS13 [49]. По всей вероятности, данный случай предпочтительно трактовать как 2В тип БВ.

У пациентки w51 коагулограмма выглядит соответствующей норме (vWF:Ag – 57,4, FVIII:C – 90,8%, vWF:RCo – 61,7%, агрегация тромбоцитов с ристомидином 91%, об агрегации тромбоцитов с низкими дозами ристомидина – нет данных), однако наблюдаются длительные менструации. У нее обнаружены две мутации: p.Pro1266Leu, ассоциированная с типом 2В [56] или конкретнее с атипичной формой 2В, характеризующейся нормальным количеством тромбоцитов, нормальным распределением мультимеров, нормальным соотношением vWF:RCo/vWF:Ag, но высоким показателем RIPA в низких концентрациях ристоцетина [124]; и вариант p.Val1279Ile, который связывают с БВ но не уточняют действие конкретно этого варианта, так как он часто сцеплен с другими мутациями в силу генной конверсии [43]. В данном случае оба варианта находятся на одном аллеле, так как они же обнаружены у матери пациентки, что является следствием генной конверсии (см. главу 3.13). Наиболее вероятный дифференциальный диагноз для пациентки w51 – 2В тип БВ.

Были найдены мутации, ассоциированные с типом 1С БВ (руководство 2021 года [28] выделяет этот подтип).

Мутация p.Arg1205His, ассоциированная с подтипом 1С, была обнаружена в экзоне 27 у двух неродственных пациентов (w34, w35; Таблица 7) из Екатеринбурга. Ситуацию распространения одних и тех же мутаций в Екатеринбурге и Свердловской области в лаборатории Генной инженерии уже сталкивались, и был описан «эффект основателя» для

соответствующего нарушения при гемофилии А [170]. Не исключено, что и в данном случае имеет место это явление.

Пациенты w34, w35 поступили с диагнозом тип 1 БВ. Этот тип наследуется доминантно.

Коагулологические данные по пациентке w34: vWF:Ag – 8.6%, vWF:RCo – 4,8%, FVIII:C – 7,3%, АПТВ – 45.3 сек, RIPA – 78%.

Коагулологические данные по пациенту w35: vWF:Ag – 34%, FVIII:C – 36%, АПТВ – 38 сек, RIPA снижена.

Мы не располагаем достаточной информацией, чтобы определить, с чем связано такое различие в показателях у этих пациентов, так как доступные данные их истории болезни, в том числе о характере протекания заболевания, сильно ограничены.

Мутация p.Arg1205His является довольно распространенной, и для нее однозначно определен фенотип БВ «Vicenza» и тип 1С БВ [178].

Характерными чертами этого фенотипа являются доминантное наследование, сниженный vWF:Ag, наличие высокомолекулярных мультимеров, похожих на те, что появляются в плазме после введения десмопрессина, то есть такие «сверхнормальные» мультимеры соответствуют мультимерной картине в эндотелиальной ткани [178]. Функциональная активность vWF при этом снижена, наблюдается ускоренный клиренс vWF. Эта мутация входит в число уменьшающих период полураспада vWF [38].

Влияние аминокислотной замены Arg1205His, локализованной в домене D3, было изучено *in vivo* на мышах и людях. Исследование показало, что она ассоциирована с повышенным клиренсом vWF, осуществляемым макрофагами печени и селезенки [179].

Таким образом, по результатам молекулярно-генетического анализа было выявлено три случая БВ тип 1 (w34, w35, w43), из них два относящихся к типу 1С (w34, w35). У двух пациентов с изначальным диагнозом БВ тип 1 анализ показал наличие типа 3 БВ (w7, w18), у одной пациентки наличие типа 2N (w6), у трех пациентов типа 2В (w40, w44, w51) и у двух обнаружены нарушения в гене *VWF*, но подобные ситуации недостаточно описаны в литературе для установления типа БВ (w27, w42).

В статьях упоминается, что первичный диагноз тип 1 БВ может оказаться при более детальном изучении другим типом БВ [176]. Наши результаты, приведенные в этой главе, отчасти подтверждают это наблюдение.

Таблица 7 – Мутации в гене *VWF* у пациентов в БВ типа 1

Пациент	Мутация	Экзон	Тип, ассоциированный с мутацией	Тип БВ пациента по совокупности данных

w6	c.2098_2099insG*	16	3	2N
	p.Arg816Trp (c.2446C>T)	19	2N	
w7	c.2435delC	18	3	3
	p.Arg273Trp (c.817C>T)	7	3	
w18	c.2435delC	18	3	3
	c.2435delC	18	3	
w27	p.Arg273Trp (c.817C>T)	7	3	БВ
	все экзоны сделаны	–	–	
w34	p.Arg1205His (c.3614G>A)	27	1C	1C
w35	p.Arg1205His (c.3614G>A)	27	1C	1C
w40	p.Arg1308Cys (c.3922C>T)	28	2B	2B
w42	c.2098_2099insG*	16	3	БВ
	p.Arg924Gln (c.2771G>A)	21	Разные типы	
	p.Ala2178Ser (GCC>TCC)	37	полиморфизм	–
w43	p.Met576Ile (c.1734G>T)	14	1	1
w44	p.Arg1308Pro (c.3923G>C)	28	2B	2B
	p.Val1565Leu (c.4693G>T)	28	Протеолиз под действием ADAMTS- 13	
w51	p.Pro1266Leu (c.3797C>T)	28	2B	2B
	p.Val1279Ile (c.3835G>A)	28	БВ	

* – новые варианты гена *VWF*

3.4 ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 2А

Двум пациентам (w37 и w20) исходно был установлен диагноз 2А тип БВ.

У пациентки w37 обнаружена мутация, ассоциированная с типом 2В, подробно про этот случай будет рассказано в главе 3.5.

У пациента w20 снижены коагулологические показатели, особенно vWF:RCo (vWF:Ag – 33,9%, FVIII:C – 46%, vWF:RCo – 2%). У него обнаружена мутация p.Arg1597Trp, которую связывают с типом 2А БВ. Она приводит к повышению расщепления vWF протеиназой ADAMTS13 и потере высокомолекулярных мультимеров [13]. Таким образом, в данном случае исходный диагноз целиком подтвердился.

Кроме того, в нашей выборке было пять пациентов с недифференцированным диагнозом БВ (w3, w8 w11, w17, w25), и одна пациентка с недифференцированным диагнозом тип 2 БВ (w24), у которых мы нашли мутации, ассоциированные с типом 2А. Патогенный эффект всех найденных мутаций (p.Tyr1146Cys, p.Ser1506Leu, p.Gly1609Arg, p.Arg1597Trp, p.Arg1597Gln) доказан [12; 93; 105; 110; 128], все они вызывают заболевание в гетерозиготном состоянии при отсутствии каких-либо других дефектов гена *VWF*.

У пациентов w3 (vWF:Ag – 14,3%, FVIII:C – 22,6%, vWF:RCo – 6,23%) и w8 (коагулологические данные отсутствуют) найдена мутация p.Tyr1146Cys в гетерозиготном состоянии. Она ассоциирована с типом 2А и вызывает потерю высокомолекулярных мультимеров [12], а также нарушения в связывании с FVIII [110]. Ранее классифицировалась как тип 1 БВ [121].

Мутация p.Ser1506Leu (у пациенток w11, w25) относится к «группе мутаций 1» [93]. Это мутации, при которых снижение количества высокомолекулярных мультимеров происходит за счет нарушения их секреции. Мутации p.Gly1609Arg (у пациентки w17), p.Arg1597Trp (у пациента w20) и p.Arg1597Gln (у пациентки w24) не нарушают секрецию, а связаны с повышением склонности к протеолизу ADAMTS13 [93; 128] (классификация групп мутаций по статье [133]). Тем не менее, есть сведения о том, что замена p.Ser1506Leu тоже повышает подверженность протеолизу, хотя это трудно измерить количественно из-за пониженной секреции высокомолекулярных мультимеров vWF [93].

Все мутации, кроме одной, найдены в экзоне 28, что соответствует мировым данным, согласно которым подавляющее большинство мутаций, ассоциированных с типом 2А, находятся именно там.

Мутационная картина и коагулологические данные пациентов, обсуждаемых в этой главе, представлены в Таблице 8. По данным в этой таблице видно, что пациенты w20, w24 с мутациями в одном и том же кодоне (p.Arg1597Gln и p.Arg1597Trp) имеют близкие значения

коагулологических показателей (vWF:Ag – 33,9%, FVIII:C – 46%, vWF:RCo – 2% и vWF:Ag – 36%, FVIII:C – 67%, vWF:RCo – 17%). При этом пациентки w11, w25, будучи носителями мутации p.Ser1506Leu, имеют заметно различающиеся коагулологические показатели (vWF:Ag – 11%, FVIII:C – 8%, vWF:RCo – 19% и vWF:Ag – 57,1%, FVIII:C – 53,6%, vWF:RCo – 4,5%).

Это свидетельствует о том, что степень проявленности симптомов заболевания, значения коагулологических параметров – сложная и неоднозначно связанная система, на которую влияет множество факторов.

Таким образом, по результатам молекулярно-генетического анализа было выявлено семь пациентов с БВ тип 2А (w3, w8, w11, w17, w20, w24, w25), в одном случае диагноз был уточнен с типа 2А на тип 2В (w37).

По этим данным можно сделать вывод о том, что диагностика часто не доходит до установления типа 2А, либо останавливаясь на типе 1 или типе 2 недифференцированном, либо просто на недифференцированной БВ.

Таблица 8 – Мутации в гене *VWF* у пациентов с БВ типа 2А

№	Входящий диагноз	Коагулологические данные, %	Мутация	Экзон	Тип, ассоциированный с мутацией
w3	БВ	vWF:Ag – 14,3, FVIII:C – 22,6, vWF:RCo – 6,23	p.Tyr1146Cys (c.3437A>G)	26	2А
w11	БВ	vWF:Ag – 11, FVIII:C – 8, vWF:RCo – 19	p.Ser1506Leu (c.4517C>T)	28	2А
w17	БВ	vWF:Ag – 39, FVIII:C – 55,5, vWF:RCo – 21	p.Gly1609Arg (c.4825G>A)	28	2А
w20	2А	vWF:Ag – 33,9, FVIII:C – 46, vWF:RCo – 2	p.Arg1597Trp (c.4789C>T)	28	2А
w24	2 тип БВ	vWF:Ag – 36, FVIII:C – 67, vWF:RCo – 17	p.Arg1597Gln (c.4790G>A)	28	2А

№	Входящий диагноз	Коагулологические данные, %	Мутация	Экзон	Тип, ассоциированный с мутацией
w25	БВ	vWF:Ag – 57,1, FVIII:C – 53,6, vWF:RCo – 4,5	p.Ser1506Leu (c.4517C>T)	28	2А
w37	2А	–	p.Arg1341Gln (c.4022G>A)	28	2В
w8	БВ	–	p.Tyr1146Cys (c.3437A>G)	26	2А

3.5 ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 2В

В нашем исследовании было 7 пациентов с входящим диагнозом тип 2В БВ (w30, w32, w38, w41, w46, w50, w59). Полученные результаты представлены в Таблице 9.

Для 4-х пациентов диагноз подтвердился (w32, w46, w50, w59). У троих из них (w46, w50, w59) наблюдалась агрегация тромбоцитов с низкими дозами ристомидина (58%, 79%, 70% соответственно при норме 0–6 %), что, вероятно и дало основание для подозрения на тип 2В; у пациентки w32 данных нет. Интересно, что агрегация тромбоцитов с ристомидином у этих пациентов была в норме (94, 92, 85 соответственно при норме до 100), то есть по этому анализу заподозрить тип 2В было затруднительно.

Мутации, обнаруженные у этих пациентов, ассоциированы с типом 2В БВ: w32 и w59 (p.Arg1306Trp) [14], w46 (p.Val1316Met) [157], w50 (p.Arg1308Cys) [25].

У пациента w46 имеется еще одно нарушение p.Val1565Leu, приводящее к повышенному протеолизу при помощи ADAMTS-13 [49]. Оба генетических изменения находятся на одном аллеле, что было подтверждено анализом, проведенном для родственницы пациента (подробнее в главе 3.10).

У всех четверых (w32, w46, w50, w59) пациентов наблюдаются значения vWF:Ag, FVIII:C либо соответствующие норме, либо чуть ниже порогового значения (Таблица 9). У троих пациентов (w32, w46, w50) мы видим характерно низкое значение vWF:RCo – 7,4%, 8,79%, 10,2% соответственно. У пациента w59, имеющего ту же мутацию (p.Arg1306Trp), что и пациентка w32, такого снижения не наблюдается, наоборот, значение vWF:RCo – 85% соответствует норме (40-150%), более того этот результат повторяется от анализа к анализу.

У двух пациенток (w38 – vWF:Ag – 49,6%, FVIII:C – 40%, vWF:RCo – 41,1% и w41 – нет коагулологических данных; данных об агрегации тромбоцитов с низкими дозами ристомицина нет у обеих) мутаций в экзоне 28 найдено не было, что не подтверждает диагноз тип 2В БВ, так как только изменения в этом экзоне могут приводить к этому типу заболевания [78]. Поскольку тип 2В имеет идентичную клиническую картину с псевдо-БВ (при которой патологические изменения затрагивают тромбоциты, а не vWF, но в результате как и при БВ тип 2В нарушается связь между vWF и мембраной тромбоцитов) [28], то можно предположить, что именно эта патология имеет место в данном случае. Мы провели анализ гена *GP1BA* для пациенток w38 и w41, чтобы проверить эту гипотезу, но отклонений от нормы не обнаружили. Остается гипотеза приобретенного заболевания.

У пациентки w30 с диагнозом 2В обнаружена мутация p.Arg1374Cys, она соответствует типу 2М [176], подробно будет описана в главе 3.6.

Кроме того, было 3 случая, когда входящий диагноз был БВ иного типа, нежели 2В, но найденные мутации указывают именно на этот тип. Так, пациентка w37 поступила с диагнозом 2А (коагулологические данные отсутствуют), но найденная у нее мутация p.Arg1341Gln указывает на тип 2В [156].

Пациенты w40 и w44 поступили с диагнозом БВ 1 тип. У пациента w40 наблюдалась коагулологическая картина, схожая с пациентами w32, w46, w50, когда vWF:RCo имеет низкие значения, а vWF:Ag и FVIII:C в норме или несильно снижены (vWF:Ag – 43,6%, FVIII:C – 31,4%, vWF:RCo – 11,8%). У пациента w40 найдена мутация p.Arg1308Cys, как у w50, ассоциированная с типом 2В [25].

Пациентка w44 имеет высокие значения vWF:RCo (FVIII:C – 38, vWF:RCo – 46). У нее обнаружено 2 мутации p.Arg1308Pro и p.Val1565Leu, первая из которых ассоциирована с типом 2В [91], а вторая связана с протеолизом под действием ADAMTS-13 [49] и встретилась также у пациента w46.

Клиническая и мутационная картина пациентки w51 с мутацией p.Pro1266Leu, ассоциированной с типом 2В, была описана в главе 3.3.

Всего было обнаружено 7 разных мутаций: p.Arg1374Cys, p.Arg1306Trp, p.Arg1341Gln, p.Arg1308Cys, p.Arg1308Pro, p.Val1316Met, p.Pro1266Leu.

Наши данные подтверждают (на примере трех пациентов), что анализ агрегации тромбоцитов с низкими дозами ристомицина способен подтвердить диагноз 2В тип БВ, но делают его выполняющим в редких лабораториях.

Таблица 9 – Мутации в гене *VWF* у пациентов в БВ типа 2В

№	Входящий диагноз	Коагулологические данные, %	Мутация	Тип по мутации	Наш вывод о диагнозе
w30	2В	vWF:Ag – 34, FVIII:C – 36,	p.Arg1374Cys (c.4120C>T)	2М	2М
w32	2В	vWF:Ag – 28,3, FVIII:C – 24, vWF:RCo – 7,4	p.Arg1306Trp (c.3916C>T)	2В	2В
w37	2А	–	p.Arg1341Gln (c.4022G>A)	2В	2В
w38	2В	vWF:Ag – 49,6, FVIII:C – 40, vWF:RCo – 41,1	нет	–	не 2В
w40	1	vWF:Ag – 43,6, FVIII:C – 31,4, vWF:RCo – 11,8	p.Arg1308Cys (c.3922C>T)	2В	2В
w41	2В	–	нет	–	не 2В
w44	1	FVIII:C – 38, vWF:RCo – 46	p.Arg1308Pro (c.3923G>C)	2В	2В
			p.Val1565Leu (c.4693G>T)	proteolysis by ADAMTS- 13	
w46	2В	vWF:Ag – 34,6, FVIII:C – 75,6, vWF:RCo – 8,79 Агрегация тромбоцитов с ристомицином – 94 Агрегация тромбоцитов с низкими дозами ристомицина – 58	p.Val1316Met (c.3946G>A)	2В	2В
			p.Val1565Leu (c.4693G>T)	proteolysis by ADAMTS- 13	

№	Входящий диагноз	Коагулологические данные, %	Мутация	Тип по мутации	Наш вывод о диагнозе
w50	2В	vWF:Ag – 40, FVIII:C – 39,8, vWF:RCo – 10,2 Агрегация тромбоцитов с ристомицином – 92 Агрегация тромбоцитов с низкими дозами ристомицина – 79	p.Arg1308Cys (c.3922C>T)	2В	2В
w51	1	vWF:Ag – 57,4, FVIII:C – 90,8, vWF:RCo – 61,7 Агрегация тромбоцитов с ристомицином – 91	p.Pro1266Leu (c.3797C>T)	2В	2В
			p.Val1279Ile (c.3835G>A)	БВ	
w59	2В / псевдо-БВ	vWF:Ag – 48,6, FVIII:C – 27,3, vWF:RCo – 85 Агрегация тромбоцитов с ристомицином – 85 Агрегация тромбоцитов с низкими дозами ристомицина – 70	p.Arg1306Trp (c.3916C>T)	2В	2В

3.6 ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 2М

Среди включенных в исследование пациентов не было ни одного с входящим диагнозом тип 2М БВ.

У двух пациентов обнаружена мутация p.Arg1374Cys в гетерозиготном состоянии (Таблица 10). Это пациентка w30 с диагнозом 2В и коагулологическими данными, не включающими vWF:RCo (vWF:Ag – 34%, FVIII:C – 36%), а также пациентка w4 с недифференцированным диагнозом БВ (коагулологические данные vWF:Ag – 18%, FVIII:C – 28%, vWF:RCo – 12,6%). Коагулологический анализ, который позволяет выявить тип 2М – это

связывание vWF с коллагеном [176], данных о нем нет у пациентки w30, но имеются у пациентки w4 – 86% при норме 50–85%, то есть слегка повышенное значение. Обнаруженная у пациентов мутация p.Arg1374Cys (Таблицы 9, 10), обозначена в базе данных HGMD как 2U, то есть тип 2 «unclassified» (неклассифицированная). Это связано с тем, что проявление данной мутации в гетерозиготном состоянии – это ухудшение связывания с тромбоцитами и частичная потеря высокомолекулярных мультимеров, в связи с чем возникают определенные сложности с отнесением этого варианта к типу 2А или 2М [176]. Согласно руководству 2021 года, тип 2М характеризуется сниженной тромбоцит-зависимой активностью и нормальным распределением мультимеров, тип 2А – сниженной тромбоцит-зависимой активностью и потерей высокомолекулярных мультимеров [29]. Поскольку высокомолекулярные мультимеры при мутации p.Arg1374Cys все же присутствуют, то ее относят к типу 2М [176].

Существует мнение, что тип 2М излишне усложняет классификацию и его стоит объединить с типом 2А [176].

Коагулологические данные пациента w2 такие: vWF:Ag – 7,9%, FVIII:C – 8,2%, vWF:RCo – 21,1%. У пациента установлен диагноз неопределенный тип БВ и для него проведен полный анализ гена *VWF*. Одна из найденных мутаций (p.Arg1399His) встречалась ранее в мировой популяции, вторая (p.Pro2527His) – новая. Патогенность нового варианта спорна. Таким образом, нарушения в гене *VWF* обнаружены, но уточнить диагноз БВ в данном случае не представляется возможным, как и по характеру снижения коагулологических показателей и выявленным мутациям точно определить тип заболевания. Вариант p.Arg1399His связывают со снижением связывания vWF с коллагеном IV, [50], такое проявление является чертой типа 2М БВ, однако совокупное действие двух найденных вариантов предсказать сложно.

Таким образом, согласно современной классификации в нашей выборке встретилось двое пациентов с типом 2М (w4, w30), вызванным одной и той же мутацией p.Arg1374Cys, и еще один пациент (w2) со спорной ситуацией, не исключающей тип 2М.

Таблица 10 – Мутации в гене *VWF* у пациентов в БВ типа 2М

№	Коагулологические данные, %	Входящий диагноз	Мутация	Экзон	Тип по мутации
w4	vWF:Ag – 18, FVIII:C – 28, vWF:RCo – 12,6 связывание vWF с коллагеном – 86% при норме 50–85%	БВ	p.Arg1374Cys (c.4120C>T)	28	2М

№	Коагулологические данные, %	Входящий диагноз	Мутация	Экзон	Тип по мутации
w30	vWF:Ag – 34, FVIII:C – 36	2B	p.Arg1374Cys (с.4120C>T)	28	2M
w2	vWF:Ag – 7,9, FVIII:C – 8,2, vWF:RCo – 21,1	БВ	p.Arg1399His (с.4196G>A)	28	2M/2A
			p.Pro2527His* (с.7580C>A)	45	–

*новые варианты гена *VWF*

3.7 ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 2N

Мутационная картина у пациентов с подозрением на 2N тип БВ представлена в Таблице 11.

С запросом на определение типа 2N или носительства гемофилии А обратились 4 женщины (w53, w54, w57, w58). У них наблюдается снижение FVIII:C (29,1%, 34,8%, 33,3%, 49% соответственно) при сохранении нормальных значений vWF:Ag, vWF:RCo. Их запрос был важен для планирования семьи. Для каждой из них были проверены экзоны 17-28 гена *VWF*. Только у пациентки w54 была найдена мутация p.Arg854Gln в гомозиготном состоянии, ассоциированная с типом 2N БВ [172]. Остальные 3 пациентки (w53, w57, w58) не имеют изменений в этой части гена и, вероятно, являются носительницами гемофилии А, в связи с чем им был рекомендован молекулярно-генетический анализ гена *F8*.

В нашей выборке пациентов с типом 2N БВ выявлено четверо (w6, w22, A456, w54), но только одной пациентке (w54) проводилась дифференцированная диагностика 2N БВ/гемофилия А (описана выше), у остальных пациентов с обнаруженным типом 2N были указаны недифференцированная БВ (w22), тип 1 средней тяжести (w6) и гемофилия А (A456). Строго говоря, коагулологические данные, а именно соотношение FVIII:C/vWF:Ag < 0,7 [145] позволяли определить у w6 и w22 тип 2N, молекулярные данные в этих случаях совпадают с коагулологическими. Пациенту w6 был сделан расширенный анализ, так как в экзонах 17-28 была обнаружена только одна мутация (p.Arg816Trp), а для подтверждения диагноза тип 2N БВ необходимо две. Вторая мутация была найдена в 16-м экзоне (с.2098_2099insG), она вызывает сдвиг рамки считывания и инактивирует аллель, поэтому проявления видны, соответствующие типу 2N, вызванные заменой p.Arg816Trp [92].

В случае пациента А456 определить, что у пациента не гемофилия А помог молекулярно-генетический анализ гена *F8*, который показал отсутствие патологических изменений. Вследствие этого предположили, что у пациента тип 2N БВ. Анализ соответствующих экзонов подтвердил это предположение: были выявлены замена p.Thr791Met, соответствующая типу 2N [161] и микроделеция c.2435delC, вызывающая сдвиг рамки считывания и в гомозиготном состоянии тип 3 [90]. В сумме две эти мутации вызывают симптомы типа 2N БВ. Такой же набор мутаций обнаружен у пациентки w22.

Для всех четырех пациентов с выявленным типом 2N (w6, w22, А456, w54) наблюдается характерное для него диагностическое соотношение FVIII:C/vWF:Ag < 0,7 [145] и значительное снижение FVIII:C (5,6%, 7,7%, 5,9%, 29,1% соответственно) при нормальных или не значительно сниженных значениях vWF:Ag и vWF:RCo (Таблица 11).

Итого выявлено 4 пациента с типом 2N (w6, w22, А456, w54), для троих этот диагноз не подтвердился (w53, w57, w58).

Таблица 11 – Мутации в гене *VWF* у пациентов в БВ типа 2N

№	Коагулологические данные	Мутация	Экзон	Тип	Тип по совокупности данных
w6	vWF:Ag – 58,2, FVIII:C – 5,6, FVIII:C/vWF:Ag – 0,1	c.2098_2099insG*	16	3	2N
		p.Arg816Trp (c.2446C>T)	19	2N	
w22	vWF:Ag – 23,8, FVIII:C – 7,7, vWF:RCo – 35, FVIII:C/vWF:Ag – 0,3	p.Thr791Met (c.2372C>T)	18	2N	2N
		c.2435delC	18	3	
А456	vWF:Ag – 68,9, FVIII:C – 5,9, vWF:RCo – 63, FVIII:C/vWF:Ag – 0,09	p.Thr791Met (c.2372C>T)	18	2N	2N
		c.2435delC	18	3	
w53	vWF:Ag – 106, FVIII:C – 29,1, vWF:RCo – 100, FVIII:C/vWF:Ag – 0,3	Нет	–	–	–
w54	vWF:Ag – 79, FVIII:C – 34,8,	p.Arg854Gln (c.2561G>A)	20	2N	2N

№	Коагулологические данные	Мутация	Экзон	Тип	Тип по совокупности данных
	vWF:RCo – 73,6, FVIII:C/vWF:Ag – 0,4	p.Arg854Gln (c.2561G>A)	20	2N	
w57	FVIII:C – 33,3, vWF:RCo – 60,5,	Нет	–	–	–
w58	FVIII:C – 49, vWF:RCo – 80,	Нет	–	–	–

* – новые варианты гена *VWF*

3.8 ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 3

Тип 3 БВ наследуется рецессивно, а значит вызывается сочетанием двух мутаций.

С этим диагнозом поступило 10 пациентов (w10, w13, w15, w16, w23, w26, w29, w31, w48, w55). Среди них тип 3 был подтвержден у всех (Таблица 12), кроме w31, у которого были проанализированы все экзоны гена *VWF*, но найдена только одна мутация в гетерозиготном состоянии c.2435delC, ассоциированная с типом 3, однако ее одной недостаточно для наблюдающейся у пациента тяжелой симптоматики и резкого снижения коагулологических показателей, соответствующих типу 3 БВ (vWF:Ag – 2,5%, FVIII:C – 3,1%, vWF:RCo – 1%). Возможно, во втором аллеле имеется крупная делеция, которую наши методы не могли обнаружить.

У пациентов w10, w13, w15, w16, w23, w29, w48 найдено по два патогенных варианта, представляющих собой нонсенс-мутации (p.Arg373Ter [43], p.Arg1659Ter [122]), мутацию зоны сплайсинга (c.2968-2A>G) или frameshift-мутации (c.2435delC [90], c.6029delC, c.7482delC, c.6970delG, c.6457insA). Те мутации из этого списка, которые описаны в литературе, ассоциированы с типом 3. Не описанные ранее варианты: c.6029delC, c.7482delC, c.6457insA, c.6970delG, c.2968-2A>G. Поскольку это делеции, инсерция и мутация зоны сплайсинга, которые приводят к сдвигу рамки считывания и нарушению сплайсинга, то патогенный эффект этих мутаций не вызывает сомнений в силу серьезности такого рода нарушений. То есть, при наличии двух таких нарушений на разных аллелях у пациента будет тип 3. Мы не можем определить, находятся ли эти нарушения на разных аллелях в силу ограничений метода, но у всех этих пациентов низкие показатели vWF:Ag, FVIII:C, vWF:RCo (Таблица 12), соответствующие типу 3 БВ.

У пациентки w26 обнаружены делеция с.2435delC и замена p.Cys1101Arg. Мутация p.Cys1101Arg описана как «тип 1 с дефектом мультимеризации» [55]. Низкие коагулологические показатели у пациентки w26 (vWF:Ag – 0,2%, FVIII:C – 5,7%, vWF:RCo – 0,1%) позволяют установить для нее только тип 3. Наличие двух патогенных вариантов характерно для этого типа БВ.

У пациента w55 с коагулологическими данными vWF:Ag – 0,9%, FVIII:C – 4,1%, соответствующими типу 3 БВ, обнаружено 3 варианта. Вариант p.Arg924Gln встречается в литературе у пациентов с разными типами БВ, часто трактуется как полиморфизм. Было выдвинуто предположение, что этот вариант может быть сцеплен с различными мутациями, как соответствующими типу 1БВ, так и более серьезными, соответствующими типу 3 [26]. В случае пациента w55 есть делеция с.2435delC и делеция с.8333_8341delGGACGGAGC. Мы не можем проверить, с какой именно делецией сцеплен вариант p.Arg924Gln.

Делеция с.8333_8341delGGACGGAGC не описана ранее в литературе. Она приходится на последний 52-й экзон, который кодирует цистеиновый узел, создающий дисульфидные связи, необходимые для димеризации vWF в эндоплазматическом ретикулуме [185]. Делеция трех кодонов с.8333_8341delGGACGGAGC не сдвигает рамку считывания. Вероятно, она нарушает димеризацию. У пациента w55 наличие двух делеций указывает на тип 3 БВ.

У пациента w48 найдено 2 патогенных варианта (с.2968-2A>G и с.6970delG) на разных аллелях (что подтверждено семейным анализом (глава 3.10)). Оба варианта не описаны ранее, однако такие мутации как замена в зоне сплайсинга (с.2968-2A>G) и делеция (с.6970delG) являются серьезными нарушениями, которые должны вести к типу 3 БВ [78]. Это согласуется с коагулологическими данными, соответствующими типу 3 БВ: vWF:Ag <5% (1,6%), FVIII:C <10% (6,5%), vWF:RCo<5% (0,1%).

Кроме вышеперечисленных пациентов тип 3 однозначно диагностируется по гомозиготной делеции с.2435delC у пациента w18, поступившего с типом 1 (подробно случай описан в главе 3.3), и пациента w28, поступившего с недифференцированным диагнозом БВ, его коагулологическая картина (vWF:Ag – 2,1%, FVIII:C – 2,5%, vWF:RCo – 1,4%) также соответствует типу 3 БВ.

Пациент w7, несмотря на входящий диагноз тип 1 БВ, был классифицирован нами как тип 3 в силу наличия у него двух мутаций с.2435delC и p.Arg273Trp, подробно этот случай описан в главе 3.3.

Всего в этой группе выявлено 13 пациентов, из них 10 поступили с диагнозом тип 3 БВ, у трех был изначально диагностирован другой тип БВ.

Самая частая мутация, ассоциированная с типом 3, делеция с.2435delC, она обнаружена трижды в гомозиготном состоянии (w16, w18, w28) и среди типа 3 – 9 раз в гетерозиготном. Эта

делеция не присутствовала только в одном случае (w48) из 13-ти, то есть ее вклад в формирование типа 3 БВ значителен.

Таблица 12 – Мутации в гене *VWF* у пациентов в БВ типа 3

№	Первичный диагноз	Коагулологические данные, %	Мутация	Экзон	Тип	Итоговый диагноз
w7	1	vWF:Ag – 5,3, FVIII:C – 14	c.2435delC	18	3	3
			p.Arg273Trp (c.817C>T)	7	3	
w10	3	vWF:Ag – 2,8, FVIII:C – 4,33, vWF:RCo – 0,	c.2435delC	18	3	3
			c.6029delC*	35	3	
w13	3	vWF:Ag – 3, FVIII:C – 10,1, vWF:RCo – 3,	c.2435delC	18	3	3
			p.Arg1659Ter (c.4975C>T)	28	3	
w15	3	FVIII:C – 3, vWF:RCo – 6,	c.7482delC*	44	3	3
			c.2435delC	18	3	
w16	3	vWF:Ag – 4,9, FVIII:C – 3,6, vWF:RCo – 1,	c.2435delC	18	3	3
			c.2435delC	18	3	
w18	1	vWF:Ag – 5,6, FVIII:C – 5,1	c.2435delC	18	3	3
			c.2435delC	18	3	
w23	3	vWF:Ag – 1, FVIII:C – 5,4, vWF:RCo – 2,	c.2435delC	18	3	3
			p.Arg373Ter (c.1117C>T)	10	3	
w26	3	vWF:Ag – 0,2, FVIII:C – 5,7, vWF:RCo – 0,1,	c.2435delC	18	3	3
			p.Cys1101Arg (c.3301T>C)	25	1	
w28	1	vWF:Ag – 2,1, FVIII:C – 2,5, vWF:RCo – 1,4	c.2435delC	18	3	3
			c.2435delC	18	3	
w29	3	vWF:Ag – 3, FVIII:C – 2,4, vWF:RCo – 1,	c.2435delC	18	3	3
			c.6457insA *	37	3	

№	Первичный диагноз	Коагулологические данные, %	Мутация	Экзон	Тип	Итоговый диагноз
w31	3	vWF:Ag – 2,5, FVIII:C – 3,1, vWF:RCo – 1,	c.2435delC	18	3	-
w48	3	vWF:Ag – 1,6, FVIII:C – 6,5, vWF:RCo – 0,1,	c.2968-2A>G	23	~	3
			c.6970delG*	40	3	
w55	3	vWF:Ag – 0,9, FVIII:C – 4,1,	c.2435delC	18	3	3
			p.Arg924Gln (c.2771G>A)	21	–	
			c.8333_8341del GGACGGAGC	52	3	

* – новые варианты гена *VWF*

3.9 Анализ сложных случаев, не вошедших в предыдущие главы

Ряд пациентов не вошел в предыдущие разделы (Таблица 13).

Так, пациент w9, чей единственный коагулологический параметр – это сниженная FVIII:C (35%), поступил с запросом исключить БВ. Для него были проанализированы все экзоны и не обнаружено никаких патологических изменений в гене *VWF*. Со слов врача, у пациента симптомы, сходные с гемофилией А. Ему рекомендован анализ гена *F8*.

У пациентки w14 проанализированы все экзоны. Найдена мажорная микроделеция c.2435delC в гетерозиготном состоянии и вариант, считающийся полиморфизмом p.Ala2178Ser [118], встречающийся в европейской популяции с частотой 0,01-0,02. Учитывая коагулологические данные, vWF:Ag – 6,5%, FVIII:C – 3,3%, vWF:RCo – 21,1%, мы ожидали найти вторую мутацию, но нашли только вариант p.Ala2178Ser. Ранее было высказано предположение, что данный полиморфизм в сочетании с патогенными вариантами *VWF* может вызывать симптомы, сходные с 2В типом [118]. Однако, в данном случае очень низкие значения vWF:Ag и FVIII:C говорят скорее в пользу наличия еще одного нарушения (возможно, протяженной делеции), которое нам в рамках проведенного исследования выявить не удалось.

У пациента w21 входящий диагноз БВ. Проанализированы все экзоны, найден один вариант p.Asp853Asn в гетерозиготном состоянии. Он не описан ранее, согласно оценке протеомных программ, это полиморфизм (Таблица 6). Коагулологические данные по этому

пациенту FVIII:C – 83% и vWF:RCo – 63%, оба значения в пределах нормы. По совокупности данных, логично предположить, что у пациента не БВ.

Пациентка w27 имеет низкие коагулологические показатели vWF:RCo (5%) и vWF:Ag (10,8%), при этом FVIII:C – 27%. Первичный диагноз – тип 1 БВ. У пациентки найдена мутация p.Arg273Trp, в гомозиготном состоянии вызывающая тип 3 БВ, а в гетерозиготном у описанных пациентов не вызывавшая симптомов [19]. Проанализирован весь ген и никаких других отклонений от нормы не найдено. Можно предположить, что мутация p.Arg273Trp может проявляться и в гетерозиготном состоянии при дополнительных неизвестных нам факторах.

У пациентки w52 найдена новая мутация p.Phe1293Ser в экзоне 28. Поскольку параметры vWF:Ag – 21,8%, FVIII:C – 52% снижены не очень сильно, а снижен заметно vWF:RCo – 3,61%, то по коагулологическим данным можно исключить тип 3 БВ. В истории болезни этой пациентки значения vWF:Ag были от нижней границы нормы до 21,8%, а vWF:RCo стабильно 7-3%, FVIII:C стабильно в норме. В экзоне 28 встречаются мутации всех типов, поэтому по местоположению определить тип, вызываемый новой мутацией, не представляется возможным. Можно наблюдать значительное снижение vWF:RCo на фоне незначительного снижения vWF:Ag. Это позволяет исключить тип 2N и предположить типы 2A/2M. Такие анализы как агрегация тромбоцитов с ристомидином и коллагеном были проведены, но давали разные результаты, в зависимости от даты взятия крови. Электрофореза мультимерной структуры нет. Протеомные программы сходятся на патогенности варианта p.Phe1293Ser, однако, согласно руководству [11], является «вариантом неопределенной значимости» (см. глава 3.2).

У пациентки w56 – найдена одна новая нонсенс-мутация (p.Tyr1271Ter). Коагулологические параметры пациентки (FVIII:C – 69,8%, vWF:RCo – 24,2%) значительно выше, чем при типе 3. Поскольку найденная мутация новая, определить тип не представляется возможным.

В одном случае БВ была исключена (w9), в пяти случаях были обнаружены нарушения, но определить тип БВ не представляется возможным (w14, w21, w27, w52, w56). В случае пациенток w14, w27 найден только один патогенный вариант, но его недостаточно для объяснения наблюдаемых симптомов. В случае пациенток w52, w56 невозможность установить тип связана с тем, что вариации гена *VWF* обнаружены впервые и их действие еще не изучено.

Таблица 13: Мутации в гене *VWF* у пациентов в БВ, случаи, не вошедшие в предыдущие главы

№	Коагулологические данные	Первичный диагноз	Мутация	Экзон	Тип
w9	FVIII:C – 35	Исключить БВ	Нет	–	–

№	Коагулологические данные	Первичный диагноз	Мутация	Экзон	Тип
w14	vWF:Ag – 6,5, FVIII:C – 3,3, vWF:RCo – 21,1	БВ	c.2435delC	18	3
			p.Ala2178Ser (c.6532G>T)	37	–
w21	FVIII:C – 83, vWF:RCo – 63	БВ	p.Asp853Asn * (c.2557G>A)	20	–
w27	vWF:Ag – 10,8, FVIII:C – 27, vWF:RCo – 5	1	p.Arg273Trp (c.817C>T)	7	3
w52	vWF:Ag – 21,8, FVIII:C – 52, vWF:RCo – 3,61	БВ	p.Phe1293Ser* (c.3878T>C)	28	–
w56	FVIII:C – 69,8, vWF:RCo – 24,2	БВ	p.Tyr1271Ter* (c.3813C>G)	28	–

* – новые варианты гена *VWF*

3.10 ДНК-диагностика родственников пациентов

У ряда пациентов (w20, w32, w37, w40 w46, w48, w51) был проведен мутационный анализ для родственников, результаты представлены в Таблице 14. Сначала искали мутации у пациента, а затем у родственников анализировали экзоны, в которых были обнаружены нарушения у пациентов.

Для пациента w20 с типом 2А и мутацией p.Arg1597Trp был проанализирован материал его отца w20-2, обнаружена та же мутация, коагулологических данных для него нет.

У ряда пациентов с типом 2В имелись родственники с той же мутацией, что и у них: w32 – w32-2 (сестра, p.Arg1306Trp), w37 – w37-2 (сын, p.Arg1341Gln), w46 – w46-2 (мать, p.Val1316Met и p.Val1565Leu). У одного родственника w40-2 (брат) не было обнаружено мутации пациента w40 (p.Arg1308Cys).

У пациента w46 с мутациями p.Val1316Met и p.Val1565Leu и генетически подтвержденным типом 2В мать наблюдается с БВ – w46-2. У нее был такой же набор мутаций, что говорит о том, что у нее тоже тип 2В и что обе мутации находятся на одном аллеле. Коагулологические данные w46-2 подтверждают это. На фоне нормальных значений vWF:Ag

(87,6%), FVIII:C (116%), vWF:RCo (47%), наблюдается агрегация тромбоцитов с низкими дозами ристомидина – 41, что определяет тип 2В.

У пациента w48 найдено 2 патогенных варианта (с.2968-2A>G и с.6970delG), что соответствует типу 3, а у его матери w48-2 только один вариант – с.6970delG. Поскольку он не описан ранее, трудно сказать влечет ли эта мутация проблемы со свертываемостью крови у матери, но она с подобными проблемами не обращалась.

Был проанализирован экзон 28 у матери и у сына пациентки w51, (w51-2 и w51-3 соответственно). Мутационная картина совпадает у мамы и у пациентки, то есть обнаружены две мутации: p.Pro1266Leu и p.Val1279Ile. В данном случае оба варианта находятся на одном аллеле, так как они же обнаружены у матери пациентки. У матери отмечается синячковость, коагулологических данных нет. По мутационной картине ей, как и ее дочери, можно определить БВ тип 2В. У сына пациентки w51 данных нарушений обнаружено не было, как и отклонений в коагулологической картине (vWF:Ag – 72%, FVIII:C – 98%, vWF:RCo – 95%). Нуклеотидные замены в такой комбинации, как у пациентки w51 и ее матери, заимствованы из области псевдогена и являются следствием генной конверсии. Подробно генная конверсия у этих пациентов рассмотрена в главе 3.13.

Всего был проведен генетический анализ для 8 родственников 7-ми пациентов. У пяти (w20-2, w32-2, w37-2, w46-2, w51-2) были обнаружены те же нарушения, что у пациентов. У одной родственницы (w48-2) имелась только одна из двух мутаций пациента w48 (с.6970delG*), а второй (с.2968-2A>G) не было. У двух родственников (w40-2, w51-3) нарушений обнаружено не было.

Анализ, проведенный для родственников пациентов, позволил определить на одном или на разных аллелях располагаются патогенные варианты в случае, если их было обнаружено два. Для тех родственников, у которых были обнаружены мутации, мы можем прогнозировать их диагноз. К сожалению, коагулологические данные по родственникам чаще всего не собирались.

Таблица 14: Результаты молекулярно-генетического анализа родственников пациентов

№	Коагулологические данные, %	Мутация	Экзон	Нарушение	Тип БВ
w20	vWF:Ag – 33,9, FVIII:C – 46, vWF:RCo – 2	p.Arg1597Trp (с.4789C>T)	28	2А	2А
w20-2	–	p.Arg1597Trp (с.4789C>T)	28	2А	2А

№	Коагулологические данные, %	Мутация	Экзон	Нарушение	Тип БВ
w32	vWF:Ag – 28,3, FVIII:C – 10,6, vWF:RCo – 55	p.Arg1306Trp (c.3916C>T)	28	2B	2B
w32-2	–	p.Arg1306Trp (c.3916C>T)	28	2B	2B
w37	–	p.Arg1341Gln (c.4022G>A)	28	2B	2B
w37-2	–	p.Arg1341Gln (c.4022G>A)	28	2B	2B
w40	vWF:Ag – 43,6, FVIII:C – 31,4, vWF:RCo – 11,8	p.Arg1308Cys (c.3922C>T)	28	2B	2B
w40-2	–	нет	28	–	норма
w46	vWF:Ag – 34,6, FVIII:C – 75,6, vWF:RCo – 8,79 Агрегация тромбоцитов с ристомицином – 94 Агрегация тромбоцитов с низкими дозами ристомицина -58	p.Val1316Met (c.3946G>A)	28	2B	2B
		p.Val1565Leu (c.4693G>T)	28	протеолиз ADAMTS-13	
w46-2	vWF:Ag – 87,6, FVIII:C – 116, vWF:RCo – 47, Агрегация тромбоцитов с низкими дозами ристомицина – 41	p.Val1316Met (c.3946G>A)	28	2B	2B
		p.Val1565Leu (c.4693G>T)	28	протеолиз ADAMTS-13	
w48	vWF:Ag – 1,6, FVIII:C – 6,5, vWF:RCo – 0,1,	c.2968-2A>G	23	3	3
		c.6970delG*	40	3	
w48-2	–	c.6970delG*	40	3	–

№	Коагулологические данные, %	Мутация	Экзон	Нарушение	Тип БВ
w51	vWF:Ag – 57,4, FVIII:C – 90,8, vWF:RCo – 61,7 Агрегация тромбоцитов с ристомицином – 91	p.Pro1266Leu (c.3797C>T)	28	2В	2В
		p.Val1279Ile (c.3835G>A)	28	БВ	
w51-2	–	p.Pro1266Leu (c.3797C>T)	28	2В	2В
		p.Val1279Ile (c.3835G>A)	28	БВ	
w51-3	vWF:Ag – 72, FVIII:C – 98, vWF:RCo – 95, Агрегация тромбоцитов с ристомицином – 69	нет	28	–	норма

* – новые варианты гена *VWF*

3.11 Разработанный алгоритм анализа

Поскольку ген *VWF* сложно организован (52 экзона), его полный анализ достаточно проблематичен. В связи с этим в зависимости от входящего дифференциального диагноза (предполагаемый тип БВ), основанного на клинической картине заболевания и коагулологических данных, во многих случаях целесообразно использовать упрощенные схемы поиска мутаций.

1. Самым простым для дифференцирования является тип 2В БВ. Он однозначно выделяется из других типов БВ при помощи анализа «агрегация тромбоцитов с низкими дозами ристомидина». Локализация патогенных вариантов, вызывающих тип 2В узкая – только экзон 28 гена, тип наследуется доминантно. Молекулярно-генетические методы в данном случае актуальны для семейного консультирования и планирования семьи, а также они позволяют различить БВ тип 2В и идентичное по проявлениям состояние, вызванное патологией тромбоцитов, обусловленной нарушением в гене *GPIBA* [28].

2. Если пациент поступил с другим запросом, то целесообразно начинать анализ с экзонов 28 и 18, так как согласно мировым данным [86] и нашим собственным результатам (Рисунок 9), в этих экзонах патогенные варианты встречаются значительно чаще, чем в других.

3. Если у пациента в норме или близки к норме $vWF:Ag$ и $vWF:RCo$, но низкий $FVIII:C$, то предполагают тип 2N БВ или гемофилию А. В этом случае для верификации или исключения типа 2N БВ проводится анализ экзонов 17-28 (после предыдущего пункта для анализа остаются экзоны 17 и 19-27). Если в этих экзонах не было обнаружено нарушений, тип 2N считается исключенным. Подтверждением диагноза 2N БВ считается обнаружение двух патогенных вариантов или одного в гомозиготном состоянии (наследование 2N типа рецессивное), вызывающих согласно базам данных тип 2N, или одного варианта, соответствующего типу 2N, а второго, дезактивирующего аллель, например, нонсенс-мутации.

Если в зоне 17-28 экзонов найден 1 патогенный вариант типа 2N, то второй вариант ищут по всему гену и в случае обнаружения нарушения, дезактивирующего аллель, 2N тип считается подтвержденным.

4. В случае подозрения на тип 2 анализируют экзоны 12, 14-28, 30-31, 51-52, начиная с 18 и 28. Поскольку все подтипы, кроме 2N, наследуются доминантно, то для подтверждения диагноза достаточно одной мутации, имеющей соответствующую интерпретацию в международных базах данных.

5. В случае типов 1, 3 и недифференцированной БВ, анализируются все экзоны в порядке: 18, 28 – чаще всего мутации встречаются в них, затем 12, 14-28, 30-31, 51-52 – экзоны, в которых локализованы варианты типа 2, затем 3-5, 7-10, 42-43, 45 – из оставшихся экзонов мутации, обуславливающие типы 3 и 1, чаще встречаются в них, а затем все остальные, пока не будет найден один патогенный вариант для доминантных типов и два патогенных варианта для рецессивных (2N, 3).

В случае если значения $vWF:Ag$ и $vWF:RCo$ $<5\%$ или близки к этим значениям, предполагается тип 3. Поскольку его наследование рецессивное, для подтверждения диагноза нужно найти 2 патогенных варианта.

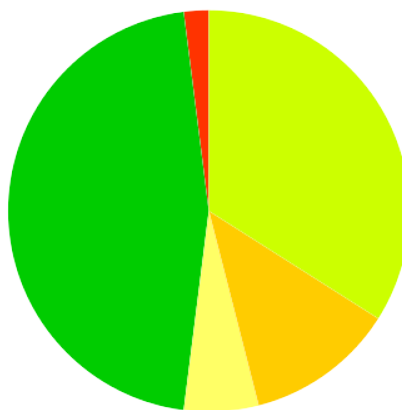
6. В случае обнаружения нового варианта, не описанного ранее в литературе, анализируется его патогенность согласно руководству по интерпретации данных, полученных методом массового параллельного секвенирования [11].

3.12 Сопоставление клинического диагноза и результатов молекулярно-генетического анализа

Клинический диагноз и данные молекулярно-генетического анализа по каждому пациенту представлены в Приложении Г в Таблице 20.

Диагноз был подтвержден в 23 случаях, изменен тип БВ в восьми случаях, «исключен» диагноз или тип БВ (2В или 2N) в шести случаях, уточнен тип в девяти случаях, и изменен диагноз в одном случае (Рисунок 11). Еще у трех пациентов обнаружены нарушения в гене, но их наличия недостаточно для объяснения этими вариантами наблюдаемых нарушений.

N=50



- Изменение диагноза, n=1
- Подтверждение БВ или типа БВ, n=23
- Найденные варианты не до конца объясняют клиническую картину, n=3
- «Исключен» входящий диагноз (БВ, 2В тип БВ, 2N тип БВ), n=6
- Установлен тип БВ, n=17: изменен по сравнению с первичным дифференциальным диагнозом, n=8; установлен тип при входящем диагнозе недифференцированная БВ, n=9

Рисунок 11 – Соотношение клинических и молекулярно-генетических диагнозов

Необходимо отметить, что когда мы говорим об «исключении» БВ или какого-то типа БВ, то это некоторое условное обозначение того, что мы не нашли нашими методами патогенного варианта в соответствующей области гена. Существует риск, что нарушение гена нельзя обнаружить методом Сэнгера.

Изменение диагноза произошло только у пациента А456, у которого изначально была диагностирована гемофилия А, а молекулярно-генетический анализ показал 2N тип БВ.

Изменение типа БВ было у восьми пациентов: w6, w7, w18, w30, w37, w40, w44, w51:

- У пациентки w6 изменение с типа 1 на тип 2N.
- У пациентов w7 и w18 был диагноз тип 1 со значениями vWF:Ag и FVIII:C на грани с типом 3, но выше. У них выявлен тип 3.

- У пациентки w30 был диагноз 2В, по мутационному анализу у него тип 2М, так как мутация ассоциирована с частичной потерей высокомолекулярных мультимеров и снижением vWF:RCo.
- У пациентки w37 входящий диагноз был 2А (коагулологические данные отсутствуют), а мутационный анализ показал тип 2В.
- В трех случаях был обнаружен тип 2В у пациентов с изначальным диагнозом тип 1 (w40, w44, w51).

В статьях упоминается, что первичный диагноз тип 1 БВ может оказаться при более детальном изучении типом 2 [176]. Наши результаты главы подтверждают это наблюдение. В шести случаях диагноз изменился с типа 1 БВ на другой тип БВ.

«Исключить» подозрение на БВ или на конкретный тип БВ (2В или 2N) удалось в шести случаях:

- Не БВ – пациент w21,
- не 2В тип БВ – пациентки w38, w41,
- не 2N тип БВ – пациенты w53, w57, w58.
- В случае пациента w9 тоже удалось «исключить» БВ, но поскольку это подтвердило врачебную теорию, то этот случай идет в группе подтвердившихся диагнозов.

Определить тип БВ получилось в 9-ти случаях. У 4-х пациентов удалось при недифференцированной БВ определить тип 2А (w3, w11, w17, w25):

- У пациентки w4 диагноз уточнен до типа 2М.
- У пациентки w22 диагноз уточнен до типа 2N.
- У пациента w28 диагноз уточнен до типа 3.
- У пациентки w24 диагноз уточнен с недифференцированного типа 2 БВ до типа 2А.

Подтверждением диагноза считалось подтверждение типа БВ или БВ. В ряде случаев мы не располагали достаточной информацией для интерпретации найденных вариантов, однако при подтверждении их патогенности протеомными программами считали, что симптомы вызваны обнаруженными нами вариантами. (w52, w56). У трех пациентов найдены нарушения, которые согласно литературным данным недостаточны для объяснения наблюдаемой тяжести БВ и коагулологических данных (w14, w21, w27).

Таким образом, полное совпадение клинического и молекулярно-генетического диагноза наблюдалось почти в половине случаев (46%), изменение диагноза на гемофилию А в одном случае (2%), в трех случаях (6%) найденные нарушения не объясняют тяжести клинической картины. 6 случаев относились к исключению конкретного типа БВ (12%). В остальных случаях был уточнен тип БВ (34%), то есть получены новые сведения в пределах диагноза БВ.

3.13 Генная конверсия

Генная конверсия – повторяющееся явление для гена *VWF*, она достаточно часто происходит в области ограниченной частью экзона 28, пример этого на наших и литературных данных представлен в Таблице 15.

Единственный известный случай, когда генная конверсия происходит между участками разных хромосом – это ген *VWF* (12p13.3) и его псевдоген (22q11.22–q11.23), обычно конверсия происходит внутри хромосомы [70].

Из 50 пациентов генная конверсия обнаружена у двоих – w58, w51. Из родственников проанализировали w51-2, которая приходится матерью пациентке w51 и имеет тот же вариант гена. В случае пациентки w58 найдены варианты с.3686T>G и с.3692A>C, трактуемые в литературе на основании анализа протеомными программами как полиморфизмы [159]. Прочность протеомных программ написано в разделе 3.2. Варианты с.3686T>G и с.3692A>C заимствованы из псевдогена.

Для данных пациентов, а также для контроля у нескольких других (w28, A456, w18, w16, w13) была получена соответствующая область псевдогена. Можно сказать, что у пациентки w51 наблюдается нетипичная последовательность псевдогена, однако она не заимствована полностью из гена. Из этого можно заключить, что механизм генной конверсии сложнее, чем копирование участка псевдогена или обмен участками между геном и псевдогеном.

В Таблице 15 указаны кодоны, в которых наблюдаются изменения в экзоне 28 при генной конверсии у пациентов из международных публикаций и пациенток w51, w58.

В Таблице 16 показаны отличия псевдогена у пациенток w51 и w51-2 с генной конверсией от остальных пациентов без генной конверсии (w28, A456, w18, w16, w13) и пациентки w58. Видно, что у неродственных пациентов контрольной группы и пациентки w58 псевдоген идентичен.

Из 50 пациентов генная конверсия обнаружена в двух случаях (4%). У пациентки w51 наблюдается отличный от других пациентов и референсной последовательности псевдоген.

Таблица 15 – Генная конверсия в пределах 28-го экзона на примере литературных и наших данных

Название образца	Ссылка	Номер кодона и позиция нуклеотида в скобках															
		1442(c.4324A>G)	1428*(c.4284C>T)	1410*(c.4230T>C)	1378(c.4133C>T)	1369(c.4105T>A)	1360(c.4079T>C)	1343 (c.4027A>G)	1317*(c.3951C>T)	1311***(c.3931C>T)	1279(c.3835G>T)	1266(c.3797C>T)	1263*(c.3789G>A)	1245*(c.3735G>A)	1231(c.3692A>C)	1229(c.3686T>G)	
Spain	[132]									+							
India1	[71]									+							
India2										+	+						
Germany1		+													+		
Germany2										+							
Greece										+	+						
Russia		+										+	+	+	+		
Asian		[158]															
Caucasian																	
w58	Наши данные	+												+			
w51												+	+	+			

Примечание:

* – кодон с синонимичной заменой

** – стоп кодон

+ – наличие замены в этой позиции у данного образца

Таблица 16 – Нуклеотидные замены в последовательностях гена *VWF* и псевдогена у пациентов с генной конверсией и пациентов контрольной выборки. Точками отмечены нуклеотиды, совпадающие с референсом. Приведены только позиции, в которых имеются изменения относительно референсной последовательности.

Название образца	Локус	Нуклеотидная координата относительно <i>VWF</i> и номер кодона в скобках																		
		c.3686 (p.1229)	c.3692 (p.1231)	c.3735 (p.1245)	c.3789 (p.1263)	c.3797 (p.1266)	c.3835 (p.1279)	c.3931 (p.1311)	c.3951 (p.1317)	c.4027 (p.1343)	c.4079 (p.1360)	c.4105 (p.1369)	c.4133 (p.1378)	c.4135 (p.1379)	c.4141 (p.1381)	c.4230 (p.1410)	c.4242 (p.1414)	c.4284 (p.1428)	c.4324 (p.1442)	c.4353 (p.1451)
Референс	ген	T	A	G	G	C	G	C	C	A	T	T	C	C	A	T	G	C	A	C
w51	Ген	.	.	.	G / A	C / T	G / A	A / G
w58	Ген	T / G	A / C
w51	Псевдоген	G	C	A / G	A / A	A / T	A / A	T / T	T / G	C / C	A / A	T / T	C / T	G / G	C / C	T / T	T / T	G / G	A / A	
w58	Псевдоген	G	C	A	A	T	A	T	T	G	C	A	T	.	G	C	.	T	G	A
A456	Псевдоген	G	C	A	A	T	A	T	T	G	C	A	T	.	G	C	.	T	G	A
w13	Псевдоген	G	C	A	A	T	A	T	T	G	C	A	T	.	G	C	.	T	G	A
w16	Псевдоген	G	C	A	A	T	A	T	T	G	C	A	T	.	G	C	.	T	G	A
w18	Псевдоген	G	C	A	A	T	A	T	T	G	C	A	T	.	G	C	.	T	G	A
w28	Псевдоген	G	C	A	A	T	A	T	T	G	C	A	T	.	G	C	.	T	G	A
w51-2	Псевдоген	G	C	.	A	A	A	T	T	G	C	A	T	T	G	C	T	T	G	A

3.14 Ограничения методов

Спектр мутаций, изученный в данном исследовании, основывается на выборке из 50-ти неродственных пациентов и не может претендовать на полномасштабное описание преобладающих нарушений гена *VWF* в российской популяции пациентов с БВ. Для такого анализа потребуется увеличить выборку пациентов.

Также у использованного нами метода «секвенирование по Сэнгеру» есть ограничения. Во-первых, не обнаруживаются протяженные делеции, что можно исправить включением в исследовательский арсенал метода MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Во-вторых, не обнаруживаются глубинные интронные мутации, формирующие эффективные аномальные сайты сплайсинга. С этим ограничением можно справиться, используя анализ мРНК гена *VWF*.

Анализ крупных генов бывает практичнее выполнять методом NGS, нежели методом Сэнгера. Для такого типа БВ как 2В это видится излишним, так как анализ одного экзона проще и дешевле делать методом Сэнгера. Однако, чем больше экзонов требуется проанализировать для определения типа БВ (типы 1 и 3 как пример наиболее широкой локализации в гене), тем более оправданным видится использование NGS. Тем не менее даже в случае перехода на NGS, разработанные нами системы праймеров позволят проверять результаты NGS для конкретных экзонов в случае спорных моментов.

Еще одним ограничением является то, что метод Сэнгера не позволяет определить на одном или на разных аллелях расположены найденные нарушения. В данной ситуации помогает семейный анализ, в нашей работе есть примеры этому.

В данном исследовании были выявлены новые варианты гена *VWF*. Протеомные программы, использованные нами, являются не очень точным предиктором, кроме того они не позволяют определить специфику нарушения и связать его с типом БВ. Функциональный анализ позволял бы обойти это ограничение. Более подробное обследование пациентов (электрофорез мультимеров vWF, vWF:FVIII) могло бы косвенно свидетельствовать о связи новой мутации с типом БВ, но молекулярно-генетический анализ стал актуален именно из-за затруднительности проведения узкоспециализированных обследований.

Заключение

В данной работе был проанализирован спектр мутаций в гене *VWF* в российской популяции пациентов с БВ. Спектр оказался гетерогенным, с преобладанием микроделеции с.2435delC (25%, 3 раза в гомозиготном состоянии, 11 раз в гетерозиготном). Остальные мутации (36 разных вариантов) были обнаружены 1 или 2 раза среди неродственных пациентов.

В данной выборке пациентов обнаружено 11 новых вариантов: одна мутация зоны сплайсинга, две микроинсерции, три микроделеции, одна делеция, одна нонсенс-мутация и три миссенс-мутации.

Из особенностей диагностики интересно отметить, что из 11-ти пациентов с входящим диагнозом БВ типа 1, данный тип подтвердился только для троих, в шести случаях молекулярно-генетическое исследование позволило установить другой конкретный тип БВ и еще в двух случаях тип 1 не подтвердился, но характер найденных мутаций не позволил конкретизировать дифференциальный диагноз. Эта ситуация соответствует литературным данным о том, что диагноз БВ типа 1 при дообследовании часто изменяется на другие типы БВ [176].

Тип 2А БВ исходно был диагностирован у двоих пациентов. В результате молекулярно-генетического исследования мутации, ассоциированные с типом 2А, обнаружены у шести пациентов. Анализ удобен тем, что локализация мутаций типа 2А существенно уже, чем у типов 1 и 3, а наследование доминантное. То есть достаточно одной мутации, патогенный эффект которых довольно хорошо изучен для данного типа, хотя и не исключено нахождение нового варианта, функциональный анализ которого покажет ассоциацию с типом 2А.

Самым редким оказался тип 2М. Пациентов с клиническим диагнозом тип 2М БВ не поступило ни одного. Молекулярно-генетические методы позволили обнаружить мутации этого типа БВ у троих пациентов. Для типа 2М также как и для 2В, характерна локализация мутаций в экзоне 28, однако поскольку тип довольно редок, специальных рекомендаций по его диагностике молекулярно-генетическим методом ISTH не дает [28].

Тип 3 БВ довольно точно диагностируется по коагулологическим параметрам (в 10-ти из 13 случаев диагноз подтвердился), но трудоемок для молекулярно-генетического анализа, так как патогенные варианты могут располагаться по всему гену, кроме того, в силу рецессивного пути наследования типа, мутаций необходимо найти две. Несмотря на то, что считается, что диагностика именно этого типа считается актуальной для планирования семьи [1], в реальности она трудновыполнима, так как родитель передает ребенку только один патогенный аллель и ребенок не должен страдать от симптомов типа 3 БВ (именно их пытаются избежать, так как

они очень тяжелые по сравнению с другими типами БВ). Но чтобы подтвердить, что это будет единственный патогенный вариант у ребенка, необходимо целиком изучить ген у второго родителя, чтобы убедиться, что от него ребенок не получит второй патогенный вариант, даже если у второго родителя нет симптомов, так как, например, мажорная делеция с.2435delC никак себя не проявляет в гетерозиготном состоянии [20].

Молекулярно-генетический анализ был проведен для восьми родственников пациентов, он показал в разных случаях как полное совпадение патогенных вариантов для пациента и его родственника, так и отсутствие у родственника мутаций пациента и наличие только одного патогенного варианта из двух. Семейный анализ позволяет определить на одном или разных аллелях находятся патогенные варианты. В будущем семейный анализ можно будет применить для планирования семьи.

В процессе работы было обнаружено двое пациентов, чей ген *VWF* содержит варианты, возникшие в результате генной конверсии с псевдогеном. При изучении последовательности псевдогена у пациентов, оказалось, что у контрольной выборки она была идентична содержащимся в литературе данным [86], а у одной пациентки с генной конверсией последовательность псевдогена оказалась аномальной,

В ходе исследования был разработан алгоритм анализа гена *VWF* в зависимости от входящего диагноза. Так, в случае необходимости исключить такие типы БВ как 2В и 2N, анализируются только экзоны 28 и 17-28 соответственно. Тогда как при недифференцированной БВ, типах 1 и 3 БВ анализу будут подвергаться все экзоны до обнаружения патогенного варианта, соответствующего клинической картине. Начинается анализ с 18-го экзона, в котором расположена мажорная делеция с.2435delC, и 28-го, самого крупного экзона, в котором мы обнаружили 17 различных вариантов (46% от всего разнообразия мутаций) *VWF*.

Выводы

1. Молекулярно-генетическое исследование было проведено 50 неродственным пациентам с диагнозом болезнь Виллебранда/ подозрением на болезнь Виллебранда. Спектр мутаций в гене *VWF* гетерогенен. У 44 пациентов (88%) выявлены 37 разных нарушений. Распределение мутаций по экзонам в гене *VWF* совпадает с мировыми данными. Мажорным нарушением, как и во многих европейских популяциях, являлась делеция с.2435delC (25% от всех нарушений).
2. В ходе исследования гена *VWF*, выявлено 11 новых нарушений, не описанных ранее в литературе из них: 7 мутаций, относятся к мутациям, прерывающим считывание, 1 делеция без сдвига рамки считывания; 3 миссенс-варианта. Патогенность выявленных мутаций оценена согласно российским критериям оценки патогенности. Все варианты, приводящие к прерыванию считывания белка были отнесены к условно патогенным, миссенс-варианты и делеция без сдвига рамки считывания отнесены к вариантам неопределенного значения.
3. Смена диагноза произошла в одном случае из 50 (2%), полное совпадение клинического и молекулярно-генетического диагноза до типа болезни Виллебранда наблюдалось почти в половине случаев (46%). В остальных случаях был изменен, исключен или уточнен тип болезни Виллебранда.
4. Разработан эффективный алгоритм последовательного поиска мутаций в гене *VWF*, учитывающий направительный клинический диагноз, клинические и коагулологические данные.

Практические рекомендации

Диагностика БВ и типов БВ на данный момент основывается на коагулологических данных. В рамках данного исследования разработаны рекомендации, не включающие редкие коагулологические анализы (такие как $vWF:Cb$, $vWF:FVIII$, агрегация тромбоцитов с низкими дозами ристомидина), поясняющие, на каком этапе установления диагноза наиболее рационально привлекать молекулярно-генетический анализ и в каком объеме (Рисунок 12).

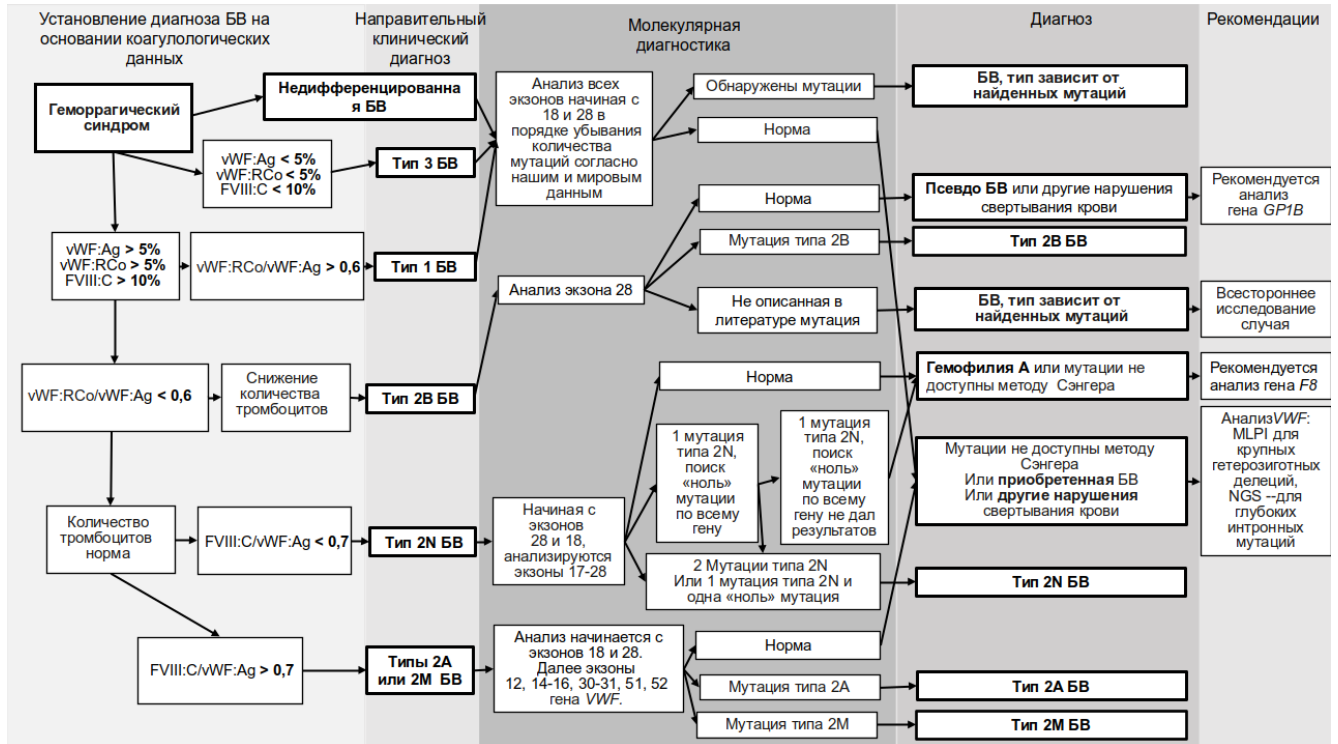


Рисунок 12 – Рекомендованный алгоритм установления диагноза, учитывающий коагулологические и молекулярно-генетические данные; коагулологические параметры приведены согласно литературе [1; 99; 145; 154]

Возможен молекулярно-генетический анализ на этапе подозрения на БВ. Этот анализ трудозатратен, если проводить его методом Сэнгера, так как в этом случае потребуется отдельная проверка всех экзонов гена *VWF*, но при возможности провести его методом NGS трудозатраты снижаются. Следует, однако, иметь ввиду, что использование таргетных NGS-панелей не предполагает индивидуального подхода к пациенту, а экономически оправданно, когда одновременно анализируются образцы ДНК нескольких пациентов (минимум 8). Анализ всего гена также потребуется при подтверждении типов 3 (при снижении коагулологических параметров $vWF:Ag < 0,5\%$, $vWF:RCo < 5\%$, $VIII:C < 10\%$ [1]) и 1 БВ (при соотношении $vWF:RCo/vWF:Ag > 0,6$ [99; 154]).

Наиболее актуальна молекулярно-генетическая диагностика типов 2N и 2B, так как они могут иметь сходную с другими коагулопатиями клиническую картину. Тип 2B можно заподозрить по снижению количества тромбоцитов и в этом случае для верификации диагноза анализируют экзон 28; тип 2N диагностируют по соотношению FVIII:C/vWF:Ag < 0,7 [145] (или < 0,6 [119]) при нормальном количестве тромбоцитов, для его верификации анализируют экзоны 17–28.

Типы 2A и 2M выявляются по остаточному принципу, как не подошедшие под предыдущие параметры, между собой их можно различить проанализировав экзоны 12, 14–16, 18, 28, 30, 31, 51, 52.

В случае обнаружения изменений в гене *VWF*, их влияние на диагноз пациента трактуется согласно международным базам данных. В случае, если найденное нарушение является новым, рекомендуется оценить его патогенность согласно руководству по интерпретации данных, полученных методом массового параллельного секвенирования [11] и, при возможности, с помощью функционального анализа. Если нарушения не были обнаружены, это может быть вызвано:

1. ограничениями методов (глубокие интронные мутации позволяет выявить анализ мРНК, крупные гетерозиготные делеции выявляются методом MLPA);
2. при подозрении на тип 2N, нарушением в гене *F8*, вызывающими гемофилию А с клинической картиной, сходной с типом 2N БВ;
3. при подозрении на тип 2B, нарушениями в генах *GP1B*, приводящим к патологическим изменениям в тромбоцитах, что клинически может быть сходно с типом 2B БВ.

Список сокращений

БВ – болезнь Виллебранда

тпн – тысяч пар нуклеотидов

FVIII – фактор VIII

FVIII:C – прокоагулянтная активность фактора FVIII

vWF – фактор Виллебранда

VWF – ген, кодирующий VWF

ЦУ – цистеиновый узел

МЕ – Международная Единица, соответствующая современным стандартам ВОЗ для препаратов фактора VIII

vWF:RCo – ристоцетин кофакторная активность фактора Виллебранда

vWF :Ag– антиген фактора Виллебранда

vWF:CB – коллагенсвязывающая активность фактора Виллебранда

vWF:FVIII – фактор Виллебранда фактор VIII связывающий тест

RIPA – ристоцетин-зависимая агрегация тромбоцитов

IU/dL – МЕ/дл, единица измерений vWF :Ag и vWF:RCo в зарубежных рекомендациях. В России используют проценты (%), 1% равен 1 IU/dL

GPIb α – рецептор на мембране тромбоцитов

GPIBA – ген, определяющий структуру рецептора на мембране тромбоцитов

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

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ISTH – the International Society of Thrombosis and Homeostasis

LOVD3 – Leiden Open Variation Database 3

HGMD – The Human Gene Mutation Database

NCBI – The National Center for Biotechnology Information

Список литературы

1. Клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Виллебранда / Зозуля Н.И., Кумскова М.А., Лихачева Е.А., Свирин П.В. – Национальное Гематологическое Общество, 2018.
2. Константинова В. Н. Болезнь Виллебранда: современные подходы к диагностике и лечению / В. Н. Константинова, Т. А. Андреева, А. В. Ким. – Текст: электронный // Тромбоз, Гемостаз И Реология. – 2021. – Болезнь Виллебранда. – № 2. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=46216773> (дата обращения: 22.05.2023).
3. Лихачева Е.А. Клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Виллебранда / Лихачева Е.А., Полянская Т.Ю., Зоренко В.Ю. – Национальное гематологическое общество, 2014.
4. Мельник А.А. Болезнь фон виллебранда. Принципы лабораторной диагностики / Мельник А.А. // Болезнь фон виллебранда. Принципы лабораторной диагностики. – 2018. – Т. 1. – № 80. – С. 39-47.
5. Папаян Л. П. Болезнь Виллебранда: структура и функция фактора Виллебранда, классификация, клиническая картина и основные принципы диагностики / Л. П. Папаян. – Текст: электронный // Вопросы Гематологии/Онкологии И Иммунопатологии В Педиатрии. – 2012. – Т. 11. – Болезнь Виллебранда. – № 4. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=18757039> (дата обращения: 18.05.2023).
6. Приобретенная болезнь Виллебранда у больных хроническим миелолейкозом на фоне терапии ингибиторами тироинкиназы / О. В. Ефремова, А. Н. Мамаев, В. А. Елыкомов [и др.]. – Текст: электронный // Проблемы Современной Науки И Образования. – 2015. – № 4 (34). – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=23331547> (дата обращения: 18.05.2023).
7. Пшеничная К. И. Особенности геморрагического синдрома у детей с приобретенными и врождёнными нарушениями фактора Виллебранда / К. И. Пшеничная, Е. В. Люгаев, О. Г. Головина. – Текст: электронный // Педиатр. – 2013. – Т. 4. – № 1. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=20238220> (дата обращения: 18.05.2023).
8. Ристол Д. П. Способ Получения Концентрата Фактора Фон Виллебранда Или Комплекса «Фактор Viii/Фактор Фон Виллебранда» И Его Применение / Д. П. Ристол, Фаро Томас Мария Мерседес, Жоркера Нието Хуан Игнасио. – Текст: электронный. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=37745660> (дата обращения: 18.05.2023).

9. Способ диагностики болезни Виллебранда (Субтип 2N) / А. Н. Мамаев, П. В. Свиринов, Н. И. Зозуля [и др.]. – Текст: электронный. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=37373642> (дата обращения: 18.05.2023).
10. Угрожающие Жизни Кровотечения У Пациентов С Болезнью Виллебранда И Опыт Их Купирования / С. В. Игнатъев, С. Г. Владимирова, Е. П. Ивашкина [и др.]. – Текст: электронный // Тромбоз, Гемостаз И Реология. – 2016. – № 1 (65). – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=25522948> (дата обращения: 18.05.2023).
11. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) / О. П. Рыжкова, О. Л. Кардымон, Е. Б. Прохорчук [et al.] // Nauchno-prakticheskii zhurnal “Medicinskaia genetika”. – 2020. – № 2(). – P. 3-23.
12. 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 [et al.] // Blood. – 2010. – Vol. 115. – A cluster of mutations in the D3 domain of von Willebrand factor correlates with a distinct subgroup of von Willebrand disease. – № 23. – P. 4894-4901.
13. A common mechanism by which type 2A von Willebrand disease mutations enhance ADAMTS13 proteolysis revealed with a von Willebrand factor A2 domain FRET construct / C. J. Lynch, A. D. Cawte, C. M. Millar [et al.] // PloS One. – 2017. – Vol. 12. – № 11. – P. e0188405.
14. A family having type 2B von Willebrand disease with an R1306W mutation: Severe thrombocytopenia leads to the normalization of high molecular weight multimers / M. Ozeki, S. Kunishima, K. Kasahara [et al.] // Thrombosis Research. – 2010. – Vol. 125. – A family having type 2B von Willebrand disease with an R1306W mutation. – № 2. – P. e17-22.
15. A founder effect in hemophilia A patients from Russian Ural region with a new p.(His634Arg) variant in F8 gene / V. V. Salomashkina, O. S. Pshenichnikova, F. G. Perina, V. L. Surin // Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis. – 2022. – Vol. 33. – № 2. – P. 124-129.
16. A method and server for predicting damaging missense mutations / I. A. Adzhubei, S. Schmidt, L. Peshkin [et al.] // Nature Methods. – 2010. – Vol. 7. – № 4. – P. 248-249.
17. A mutation in the D4 domain of von Willebrand factor (VWF) results in a variant of type 1 von Willebrand disease with accelerated in vivo VWF clearance. / Gavazova S, Gill, JC, S. JP [et al.] // Blood Volume: 100 Issue: 11 Pages: 128A-128A Part: 1 Meeting Abstract: 476 Blood : 1. – Amer Soc Hematology, Washington, 2002. – Vol. 100. – P. 128A-128A.
18. 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. – Vol. 63. – № 6. – P. 1369-1371.

19. A novel von Willebrand disease-causing mutation (Arg273Trp) in the von Willebrand factor propeptide that results in defective multimerization and secretion / S. Allen, A. M. Abuzenadah, J. Hinks [et al.] // *Blood*. – 2000. – Vol. 96. – № 2. – P. 560-568.
20. A single cytosine deletion in exon 18 of the von Willebrand factor gene is the most common mutation in Swedish vWD type III patients / Z. P. Zhang, G. Falk, M. Blombäck [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 1992. – Vol. 1. – № 9. – P. 767-768.
21. A single nucleotide polymorphism at nucleotide -1793 in the von Willebrand factor (VWF) regulatory region is associated with plasma VWF:Ag levels / P. J. Harvey, A. M. Keightley, Y. M. Lam [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 2000. – Vol. 109. – A single nucleotide polymorphism at nucleotide -1793 in the von Willebrand factor (VWF) regulatory region is associated with plasma VWF. – № 2. – P. 349-353.
22. 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 [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 1982. – Vol. 70. – № 5. – P. 1124-1127.
23. Acquired von Willebrand syndrome: data from an international registry / A. B. Federici, J. H. Rand, P. Bucciarelli [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2000. – Vol. 84. – Acquired von Willebrand syndrome. – № 2. – P. 345-349.
24. Alzohairy A. BioEdit: An important software for molecular biology / A. Alzohairy // *GERF Bulletin of Biosciences*. – 2011. – Vol. 2. – BioEdit. – P. 60-61.
25. An Arg545----Cys545 substitution mutation of the von Willebrand factor in type IIB von Willebrand's disease / M. Donner, A. M. Andersson, A. C. Kristoffersson [et al.] // *European Journal of Haematology*. – 1991. – Vol. 47. – № 5. – P. 342-345.
26. An assessment of the pathogenic significance of the R924Q von Willebrand factor substitution / E. Berber, P. D. James, C. Hough, D. Lillicrap // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2009. – Vol. 7. – № 10. – P. 1672-1679.
27. An experimental model to study the in vivo survival of von Willebrand factor. Basic aspects and application to the R1205H mutation / P. J. Lenting, E. Westein, V. Terraube [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – № 13. – P. 12102-12109.
28. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease / P. D. James, N. T. Connell, B. Ameer [et al.] // *Blood Advances*. – 2021. – Vol. 5. – № 1. – P. 280-300.
29. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the management of von Willebrand disease / N. T. Connell, V. H. Flood, R. Brignardello-Petersen [et al.] // *Blood Advances*. – 2021. – Vol. 5. – № 1. – P. 301-325.
30. Berntorp E. Erik von Willebrand / E. Berntorp // *Thrombosis Research*. – 2007. – Vol. 120 Suppl 1. – P. S3-4.

31. Binding of platelet glycoprotein Ibalpha to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS13 / K. Nishio, P. J. Anderson, X. L. Zheng, J. E. Sadler // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101. – № 29. – P. 10578-10583.
32. Biologic response to desmopressin in patients with severe type 1 and type 2 von Willebrand disease: results of a multicenter European study / A. B. Federici, C. Mazurier, E. Berntorp [et al.] // *Blood*. – 2004. – Vol. 103. – Biologic response to desmopressin in patients with severe type 1 and type 2 von Willebrand disease. – № 6. – P. 2032-2038.
33. Biological effect of desmopressin in eight patients with type 2N ('Normandy') von Willebrand disease. Collaborative Group / C. Mazurier, C. Gaucher, S. Jorieux, M. Goudemand // *British Journal of Haematology*. – 1994. – Vol. 88. – № 4. – P. 849-854.
34. Bleeding spectrum in children with moderate or severe von Willebrand disease: Relevance of pediatric-specific bleeding / Y. V. Sanders, K. Fijnvandraat, J. Boender [et al.] // *American Journal of Hematology*. – 2015. – Vol. 90. – Bleeding spectrum in children with moderate or severe von Willebrand disease. – № 12. – P. 1142-1148.
35. Bleeding tendency and efficacy of anti-haemorrhagic treatments in patients with type 1 von Willebrand disease and increased von Willebrand factor clearance / G. Castaman, A. Tosetto, A. B. Federici, F. Rodeghiero // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2011. – Vol. 105. – № 4. – P. 647-654.
36. 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.
37. Castaman G. The elusive pathogenesis of von Willebrand disease Vicenza / G. Castaman, F. Rodeghiero, P. M. Mannucci // *Blood*. – 2002. – Vol. 99. – № 11. – P. 4243-4244; author reply 4244.
38. Castaman G. Reduced von Willebrand factor survival in von Willebrand disease: pathophysiologic and clinical relevance / G. Castaman, A. Tosetto, F. Rodeghiero // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2009. – Vol. 7. – Reduced von Willebrand factor survival in von Willebrand disease. – № s1. – P. 71-74.
39. Challenges in diagnosis of von Willebrand disease in the presence of combined mutations of different genes - PubMed. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30690834/> (date accessed: 09.01.2023). – Text: electronic.
40. Changes in factor VIII binding capacity of von Willebrand factor and factor VIII coagulant activity in two patients with type 2N von Willebrand disease after hemostatic treatment and during pregnancy / M. Nishino, S. Nishino, M. Sugimoto [et al.] // *International Journal of Hematology*. – 1996. – Vol. 64. – № 2. – P. 127-134.

41. Changes in von Willebrand factor level and von Willebrand activity with age in type 1 von Willebrand disease / N. Rydz, J. Grabell, D. Lillicrap, P. D. James // *Haemophilia*. – 2015. – Vol. 21. – № 5. – P. 636-641.
42. Characterization of partial gene deletions in type III von Willebrand disease with alloantibody inhibitors / D. J. Mancuso, E. A. Tuley, R. Castillo [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1994. – Vol. 72. – № 2. – P. 180-185.
43. Characterization of the mutation spectrum in a Pakistani cohort of type 3 von Willebrand disease / S. Ahmed, H. Yadegari, A. Naz [et al.] // *Haemophilia*. – 2019. – Vol. 25. – № 6. – P. 1035-1044.
44. Characterization of VWF gene conversions causing von Willebrand disease / F. Ahmad, M. Kannan, T. Obser [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 2019. – Vol. 184. – № 5. – P. 817-825.
45. Choi Y. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels / Y. Choi, A. P. Chan // *Bioinformatics (Oxford, England)*. – 2015. – Vol. 31. – PROVEAN web server. – № 16. – P. 2745-2747.
46. ClinVar. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> (date accessed: 02.02.2023). – Text : electronic.
47. Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor / J. E. Sadler, B. B. Shelton-Inloes, J. M. Sorace [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1985. – Vol. 82. – № 19. – P. 6394-6398.
48. Cysteine-mutations in von Willebrand factor associated with increased clearance / C. J. Schooten, P. Tjernberg, E. Westein [et al.] // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2005. – Vol. 3. – № 10. – P. 2228-2237.
49. Davies J. A. The association between the L1565 variant of von Willebrand factor and susceptibility to proteolysis by ADAMTS13 / J. A. Davies, D. J. Bowen // *Haematologica*. – 2007. – Vol. 92. – № 2. – P. 240-243.
50. Defective collagen binding and increased bleeding in a murine model of von Willebrand disease affecting collagen IV binding / T. L. Slobodianuk, C. Kochelek, J. Foeckler [et al.] // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2019. – Vol. 17. – № 1. – P. 63-71.
51. 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 [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1996. – Vol. 93. – № 8. – P. 3581-3586.
52. 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 [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2012. – Vol. 108. – № 10. – P. 683-692.

53. Diagnostic high-throughput sequencing of 2396 patients with bleeding, thrombotic, and platelet disorders / K. Downes, K. Megy, D. Duarte [et al.] // *Blood*. – 2019. – Vol. 134. – № 23. – P. 2082-2091.
54. Dobrkovska A. Pharmacokinetics, efficacy and safety of Humate-P in von Willebrand disease / A. Dobrkovska, U. Krzensk, J. R. Chediak // *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*. – 1998. – Vol. 4 Suppl 3. – P. 33-39.
55. Dominant von Willebrand disease type 2M and 2U are variable expressions of one distinct disease entity caused by loss-of-function mutations in the A1 domain of the von Willebrand factor gene / A. Gadisseur, M. van der Planken, W. Schroyens [et al.] // *Acta Haematologica*. – 2009. – Vol. 121. – № 2-3. – P. 145-153.
56. Doss C. G. P. Role of von Willebrand Factor--A1 Domain Variants P1266L, H1268D, C1272R, and C1272F in VWD: A Molecular Modeling and Simulation Analysis Approach / C. G. P. Doss, S. K. Ali // *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. – 2016. – Vol. 102. – Role of von Willebrand Factor--A1 Domain Variants P1266L, H1268D, C1272R, and C1272F in VWD. – P. 299-330.
57. Effects of the mutant von Willebrand factor gene in von Willebrand disease / Z. Zhang, M. Lindstedt, M. Blombäck, M. Anvret // *Human Genetics*. – 1995. – Vol. 96. – № 4. – P. 388-394.
58. Eikenboom J. C. Congenital von Willebrand disease type 3: clinical manifestations, pathophysiology and molecular biology / J. C. Eikenboom // *Best Practice & Research. Clinical Haematology*. – 2001. – Vol. 14. – Congenital von Willebrand disease type 3. – № 2. – P. 365-379.
59. Evaluation of von Willebrand factor phenotypes and genotypes in Hemophilia A patients with and without identified F8 mutations / B. Boylan, A. S. Rice, C. De Staercke [et al.] // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2015. – Vol. 13. – № 6. – P. 1036-1042.
60. Expression of the phenotypic abnormality of platelet-type von Willebrand disease in a recombinant glycoprotein Ib alpha fragment / M. Murata, S. R. Russell, Z. M. Ruggeri, J. Ware // *The Journal of Clinical Investigation*. – 1993. – Vol. 91. – № 5. – P. 2133-2137.
61. Familial incidence of precipitating antibodies in von Willebrand's disease: a study of four cases / Z. M. Ruggeri, N. Ciavarella, P. M. Mannucci [et al.] // *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 1979. – Vol. 94. – Familial incidence of precipitating antibodies in von Willebrand's disease. – № 1. – P. 60-75.
62. 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. – Vol. 14. – № 2. – P. 299-319.

63. First identification and expression of a type 2N von Willebrand disease mutation (E1078K) located in exon 25 of von Willebrand factor gene / L. Hilbert, R. D'Oiron, E. Fressinaud [et al.] // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* – 2004. – Vol. 2. – № 12. – P. 2271-2273.
64. First report of inhibitory von Willebrand factor alloantibodies in type 2B von Willebrand disease / M. Baaij, K. P. M. van Galen, R. T. Urbanus [et al.] // *British Journal of Haematology.* – 2015. – Vol. 171. – № 3. – P. 424-427.
65. 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.
66. Functional studies on platelet adhesion with recombinant von Willebrand factor type 2B mutants R543Q and R543W under conditions of flow / H. Lankhof, C. Damas, M. E. Schiphorst [et al.] // *Blood.* – 1997. – Vol. 89. – № 8. – P. 2766-2772.
67. Further evidence for recessive inheritance of von Willebrand disease with abnormal binding of von Willebrand factor to factor VIII / M. F. López-Fernández, M. J. Blanco-López, M. P. Castiñeira, J. Batlle // *American Journal of Hematology.* – 1992. – Vol. 40. – № 1. – P. 20-27.
68. 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. – Vol. 26. – № 6. – P. 261-266.
69. 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. – Vol. 84. – № 4. – P. 1024-1030.
70. Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease / J.-M. Chen, D. N. Cooper, N. Chuzhanova [et al.] // *Nature Reviews. Genetics.* – 2007. – Vol. 8. – Gene conversion. – № 10. – P. 762-775.
71. Gene conversions are a common cause of von Willebrand disease / P. K. Gupta, E. Adamtziki, U. Budde [et al.] // *British Journal of Haematology.* – 2005. – Vol. 130. – № 5. – P. 752-758.
72. Gene deletions correlate with the development of alloantibodies in von Willebrand disease / B. B. Shelton-Inloes, F. F. Chehab, P. M. Mannucci [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation.* – 1987. – Vol. 79. – № 5. – P. 1459-1465.
73. Genetic analysis of 31 Swedish type 1 von Willebrand disease families reveals incomplete linkage to the von Willebrand factor gene and a high frequency of a certain disease haplotype / E. Lanke, A. M. Johansson, C. Halldén, S. Lethagen // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* – 2005. – Vol. 3. – № 12. – P. 2656-2663.
74. Genetic heterogeneity of severe von Willebrand disease type III in the German population / R. Schneppenheim, S. Krey, F. Bergmann [et al.] // *Human Genetics.* – 1994. – Vol. 94. – № 6. – P. 640-652.

75. Genetic linkage and association analysis in type 1 von Willebrand disease: results from the Canadian type 1 VWD study / P. D. James, A. D. Paterson, C. Notley [et al.] // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* – 2006. – Vol. 4. – Genetic linkage and association analysis in type 1 von Willebrand disease. – № 4. – P. 783-792.
76. Genome-wide linkage analysis of von Willebrand factor plasma levels: results from the GAIT project / J. C. Souto, L. Almasy, J. M. Soria [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis.* – 2003. – Vol. 89. – Genome-wide linkage analysis of von Willebrand factor plasma levels. – № 3. – P. 468-474.
77. 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. – Vol. 69. – von Willebrand disease. – № 2. – P. 177-184.
78. Goodeve A. C. The genetic basis of von Willebrand disease / A. C. Goodeve // *Blood Reviews.* – 2010. – Vol. 24. – № 3. – P. 123-134.
79. Goodeve A. Diagnosing von Willebrand disease: genetic analysis / A. Goodeve // *Hematology. American Society of Hematology. Education Program.* – 2016. – Vol. 2016. – Diagnosing von Willebrand disease. – № 1. – P. 678-682.
80. 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 [et al.] // *The New England Journal of Medicine.* – 1980. – Vol. 302. – № 19. – P. 1047-1051.
81. Heijdra J. M. Current and Emerging Options for the Management of Inherited von Willebrand Disease / J. M. Heijdra, M. H. Cnossen, F. W. G. Leebeek // *Drugs.* – 2017. – Vol. 77. – № 14. – P. 1531-1547.
82. Heterogeneous phenotypes of platelet and plasma von Willebrand factor in obligatory heterozygotes for severe von Willebrand disease / P. M. Mannucci, A. Lattuada, G. Castaman [et al.] // *Blood.* – 1989. – Vol. 74. – № 7. – P. 2433-2436.
83. HGMD® home page. – URL: <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> (date accessed: 02.02.2023). – Text: electronic.
84. High factor VIII antigen levels increase the risk of venous thrombosis but are not associated with polymorphisms in the von Willebrand factor and factor VIII gene / P. W. Kamphuisen, J. C. Eikenboom, F. R. Rosendaal [et al.] // *British Journal of Haematology.* – 2001. – Vol. 115. – № 1. – P. 156-158.
85. 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. Antoncetti [et al.] // *Blood*. – 1985. – Vol. 66. – № 6. – P. 1423-1429.
86. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction / D. J. Mancuso, E. A. Tuley, L. A. Westfield [et al.] // *Biochemistry*. – 1991. – Vol. 30. – Human von Willebrand factor gene and pseudogene. – № 1. – P. 253-269.
87. Hyper-responsiveness to DDAVP for patients with type I von Willebrand's disease and normal intra-platelet von Willebrand factor / F. Rodeghiero, G. Castaman, E. Di Bona [et al.] // *European Journal of Haematology*. – 1988. – Vol. 40. – № 2. – P. 163-167.
88. Identification and functional characterization of a novel 27-bp deletion in the macroglycopeptide-coding region of the GPIBA gene resulting in platelet-type von Willebrand disease / M. Othman, C. Notley, F. L. Lavender [et al.] // *Blood*. – 2005. – Vol. 105. – № 11. – P. 4330-4336.
89. Identification of a candidate missense mutation in a family with von Willebrand disease type IIC / R. Schneppenheim, K. B. Thomas, S. Krey [et al.] // *Human Genetics*. – 1995. – Vol. 95. – № 6. – P. 681-686.
90. Identification of a new nonsense mutation in the von Willebrand factor gene in patients with von Willebrand disease type III / Z. P. Zhang, G. Falk, M. Blombäck [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 1992. – Vol. 1. – № 1. – P. 61-62.
91. Identification of new type 2B von Willebrand disease mutations: Arg543Gln, Arg545Pro and Arg578Leu / L. Hilbert, C. Gaucher, J. F. Abgrall [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 1998. – Vol. 103. – Identification of new type 2B von Willebrand disease mutations. – № 3. – P. 877-884.
92. Identification of two point mutations in the von Willebrand factor gene of three families with the "Normandy" variant of von Willebrand disease / C. Gaucher, B. Mercier, S. Jorieux [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 1991. – Vol. 78. – № 4. – P. 506-514.
93. Impact of mutations in the von Willebrand factor A2 domain on ADAMTS13-dependent proteolysis / W. A. Hassenpflug, U. Budde, T. Obser [et al.] // *Blood*. – 2006. – Vol. 107. – № 6. – P. 2339-2345.
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. – Vol. 267. – № 7. – P. 4424-4430.
95. Increased clearance of von Willebrand factor antigen post-DDAVP in Type 1 von Willebrand disease: is it a potential pathogenic process? / S. A. Brown, A. Eldridge, P. W. Collins, D. J. Bowen // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2003. – Vol. 1. – Increased clearance of von Willebrand factor antigen post-DDAVP in Type 1 von Willebrand disease. – № 8. – P. 1714-1717.

96. Italian Registry of Haemophilia and Allied Disorders. Objectives, methodology and data analysis / A. Iorio, E. Oliovecchio, M. Morfini [et al.] // *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*. – 2008. – Vol. 14. – № 3. – P. 444-453.
97. 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. – Vol. 13. – № 5. – P. 365-376.
98. Jenkins P. V. ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? / P. V. Jenkins, J. S. O'Donnell // *Transfusion*. – 2006. – Vol. 46. – ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels. – № 10. – P. 1836-1844.
99. Leebeek F. W. G. Von Willebrand's Disease / F. W. G. Leebeek, J. C. J. Eikenboom // *The New England Journal of Medicine*. – 2016. – Vol. 375. – № 21. – P. 2067-2080.
100. Leebeek F. W. G. Gene therapy for hemophilia: a review on clinical benefit, limitations, and remaining issues / F. W. G. Leebeek, W. Miesbach // *Blood*. – 2021. – Vol. 138. – Gene therapy for hemophilia. – № 11. – P. 923-931.
101. Mannucci P. M. Antibodies to von Willebrand factor in von Willebrand disease / P. M. Mannucci, A. B. Federici // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 1995. – Vol. 386. – P. 87-92.
102. Mazurier C. Factor VIII binding assay of von Willebrand factor and the diagnosis of type 2N von Willebrand disease--results of an international survey. On behalf of the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH / C. Mazurier, D. Meyer // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1996. – Vol. 76. – № 2. – P. 270-274.
103. Miller J. L. Platelet-type von Willebrand's disease: characterization of a new bleeding disorder / J. L. Miller, A. Castella // *Blood*. – 1982. – Vol. 60. – Platelet-type von Willebrand's disease. – № 3. – P. 790-794.
104. Molecular basis of von Willebrand disease type IIB. Candidate mutations cluster in one disulfide loop between proposed platelet glycoprotein Ib binding sequences / A. M. Randi, I. Rabinowitz, D. J. Mancuso [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 1991. – Vol. 87. – № 4. – P. 1220-1226.
105. Molecular cloning of cDNA for human von Willebrand factor: authentication by a new method / D. C. Lynch, T. S. Zimmerman, C. J. Collins [et al.] // *Cell*. – 1985. – Vol. 41. – Molecular cloning of cDNA for human von Willebrand factor. – № 1. – P. 49-56.
106. Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients / L. Baronciani, G. Cozzi, M. T. Canciani [et al.] // *Blood Cells, Molecules & Diseases*. – 2003. – Vol. 30. – Molecular defects in type 3 von Willebrand disease. – № 3. – P. 264-270.

107. 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. – Vol. 10. – № 4. – P. 259-270.
108. Mutation distribution in the von Willebrand factor gene related to the different von Willebrand disease (VWD) types in a cohort of VWD patients / H. Yadegari, J. Driesen, A. Pavlova [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2012. – Vol. 108. – № 4. – P. 662-671.
109. 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. – Vol. 88. – № 11. – P. 4761-4765.
110. Mutations in the D'D3 region of VWF traditionally associated with type 1 VWD lead to quantitative and qualitative deficiencies of VWF / T. C. White-Adams, C. J. Ng, P. M. Jacobi [et al.] // *Thrombosis Research*. – 2016. – Vol. 145. – P. 112-118.
111. Mutations of von Willebrand factor gene in families with von Willebrand disease in the Aland Islands. / Z. P. Zhang, M. Blombäck, D. Nyman, M. Anvret // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1993. – Vol. 90. – № 17. – P. 7937-7940.
112. MutationTaster. – URL: <https://www.mutationtaster.org/> (date accessed: 02.01.2023). – Text : electronic.
113. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age / J. M. Schwarz, D. N. Cooper, M. Schuelke, D. Seelow // *Nature Methods*. – 2014. – Vol. 11. – MutationTaster2. – № 4. – P. 361-362.
114. 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 [et al.] // *Blood*. – 1993. – Vol. 82. – New variant of von Willebrand disease type II with markedly increased levels of von Willebrand factor antigen and dominant mode of inheritance. – № 1. – P. 169-175.
115. New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII / M. Nishino, J. P. Girma, C. Rothschild [et al.] // *Blood*. – 1989. – Vol. 74. – № 5. – P. 1591-1599.
116. Ng P. C. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function / P. C. Ng, S. Henikoff // *Nucleic Acids Research*. – 2003. – Vol. 31. – SIFT. – № 13. – P. 3812-3814.
117. Nilsson. Commentary to Erik von Willebrand's original paper from 1926 'Hereditär pseudoheemofili' / Nilsson // *Haemophilia*. – 1999. – Vol. 5. – № 3. – P. 220-221.
118. Noncanonical type 2B von Willebrand disease associated with mutations in the VWF D'D3 and D4 domains / M. Sacco, S. Lancellotti, M. Ferrarese [et al.] // *Blood Advances*. – 2020. – Vol. 4. – № 14. – P. 3405-3415.

119. Novel Associations of Multiple Genetic Loci With Plasma Levels of Factor VII, Factor VIII, and von Willebrand Factor / N. L. Smith, M.-H. Chen, A. Dehghan [et al.] // *Circulation*. – 2010. – Vol. 121. – № 12. – P. 1382-1392.
120. Pharmacokinetics of von Willebrand factor and factor VIIIc in patients with severe von Willebrand disease (type 3 VWD): estimation of the rate of factor VIIIc synthesis. Cooperative Study Groups / D. Menache, D. L. Aronson, F. Darr [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 1996. – Vol. 94. – Pharmacokinetics of von Willebrand factor and factor VIIIc in patients with severe von Willebrand disease (type 3 VWD). – № 4. – P. 740-745.
121. 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 [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 109. – № 1. – P. 112-121.
122. Phenotypic and genotypic characterization of 10 Finnish patients with von Willebrand disease type 3: discovery of two main mutations / V. Jokela, R. Lassila, T. Szanto [et al.] // *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*. – 2013. – Vol. 19. – Phenotypic and genotypic characterization of 10 Finnish patients with von Willebrand disease type 3. – № 6. – P. e344-348.
123. Phenotypic and molecular characterisation of type 3 von Willebrand disease in a cohort of Indian patients / F. Ahmad, U. Budde, R. Jan [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2013. – Vol. 109. – № 4. – P. 652-660.
124. Phenotypic Parameters in Genotypically Selected Type 2B von Willebrand Disease Patients: A Large, Single-Center Experience Including a New Novel Mutation / A. I. Woods, A. C. Kempfer, J. Paiva [et al.] // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – 2017. – Vol. 43. – Phenotypic Parameters in Genotypically Selected Type 2B von Willebrand Disease Patients. – № 1. – P. 92-100.
125. 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 [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 1983. – Vol. 309. – № 14. – P. 816-821.
126. PolyPhen-2: prediction of functional effects of human nsSNPs. – URL: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> (date accessed: 02.01.2023). – Text: electronic.
127. Prevalence of von Willebrand disease in children: a multiethnic study / E. J. Werner, E. H. Broxson, E. L. Tucker [et al.] // *The Journal of Pediatrics*. – 1993. – Vol. 123. – Prevalence of von Willebrand disease in children. – № 6. – P. 893-898.
128. Proteolytic Cleavage of Recombinant Type 2A von Willebrand Factor Mutants R834W and R834Q: Inhibition by Doxycycline and by Monoclonal Antibody VP-1 / H.-M. Tsai, I. I. Sussman, D. Ginsburg [et al.] // *Blood*. – 1997. – Vol. 89. – Proteolytic Cleavage of Recombinant Type 2A von Willebrand Factor Mutants R834W and R834Q. – № 6. – P. 1954-1962.

129. PROVEAN. – URL: <https://www.jcvi.org/research/provean> (date accessed: 02.01.2023). – Text: electronic.
130. 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 [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 1982. – Vol. 306. – № 6. – P. 326-333.
131. Quantification and facilitated comparison of von Willebrand factor multimer patterns by densitometry / J. D. Studt, U. Budde, R. Schneppenheim [et al.] // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2001. – Vol. 116. – № 4. – P. 567-574.
132. Rapid molecular diagnosis of von Willebrand disease by direct sequencing. Detection of 12 novel putative mutations in VWF gene / I. Corrales, L. Ramírez, C. Altisent [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2009. – Vol. 101. – № 3. – P. 570-576.
133. Recessive inheritance of von Willebrand's disease type I / J. C. Eikenboom, P. H. Reitsma, K. M. Peerlinck, E. Briët // *Lancet (London, England)*. – 1993. – Vol. 341. – № 8851. – P. 982-986.
134. Reduced von Willebrand factor survival in type Vicenza von Willebrand disease / A. Casonato, E. Pontara, F. Sartorello [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol. 99. – № 1. – P. 180-184.
135. Response of factor VIII/von Willebrand factor to DDAVP in healthy subjects and patients with haemophilia A and von Willebrand's disease / P. M. Mannucci, M. T. Canciani, L. Rota, B. S. Donovan // *British Journal of Haematology*. – 1981. – Vol. 47. – № 2. – P. 283-293.
136. 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 [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1996. – Vol. 76. – № 4. – P. 598-602.
137. Rodeghiero F. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease / F. Rodeghiero, G. Castaman, E. Dini // *Blood*. – 1987. – Vol. 69. – № 2. – P. 454-459.
138. Ruggeri Z. Von Willebrand factor: Looking back and looking forward / Z. Ruggeri // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2007. – Vol. 98. – Von Willebrand factor. – № 07. – P. 55-62.
139. Russell S. D. Pseudo-von Willebrand disease: a mutation in the platelet glycoprotein Ib alpha gene associated with a hyperactive surface receptor / S. D. Russell, G. J. Roth // *Blood*. – 1993. – Vol. 81. – Pseudo-von Willebrand disease. – № 7. – P. 1787-1791.
140. 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. – Vol. 71. – № 4. – P. 520-525.
141. Sadler J. E. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor / J. E. Sadler // *Annual Review of Biochemistry*. – 1998. – Vol. 67. – P. 395-424.

142. Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 2nd edition / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. – Text: electronic // Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1989. – Vol. 11. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/0307-4412%2883%2990068-7> (date accessed: 18.11.2021).
143. 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. – Vol. 14. – № 2. – P. 281-298.
144. Schneppenheim R. von Willebrand factor: the complex molecular genetics of a multidomain and multifunctional protein / R. Schneppenheim, U. Budde // Journal of thrombosis and haemostasis: JTH. – 2011. – Vol. 9 Suppl 1. – von Willebrand factor. – P. 209-215.
145. Seidizadeh O. Von Willebrand disease type 2N: An update / O. Seidizadeh, F. Peyvandi, P. M. Mannucci // Journal of thrombosis and haemostasis: JTH. – 2021. – Vol. 19. – Von Willebrand disease type 2N. – № 4. – P. 909-916.
146. 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 [et al.] // Thrombosis and Haemostasis. – 2001. – Vol. 86. – № 3. – P. 848-854.
147. SIFT - Predict effects of nonsynonmous / missense variants. – URL: <https://sift.bii.a-star.edu.sg/> (date accessed: 02.01.2023). – Text: electronic.
148. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins / N.-L. Sim, P. Kumar, J. Hu [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2012. – Vol. 40. – SIFT web server. – № Web Server issue. – P. W452-457.
149. Structure of the gene for human von Willebrand factor / D. J. Mancuso, E. A. Tuley, L. A. Westfield [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 1989. – Vol. 264. – № 33. – P. 19514-19527.
150. Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain / E. G. Huizinga, S. Tsuji, R. A. P. Romijn [et al.] // Science (New York, N.Y.). – 2002. – Vol. 297. – № 5584. – P. 1176-1179.
151. Substructure of human von Willebrand factor / W. E. Fowler, L. J. Fretto, K. K. Hamilton [et al.] // The Journal of Clinical Investigation. – 1985. – Vol. 76. – № 4. – P. 1491-1500.
152. 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. – Vol. 77. – № 3. – P. 947-951.
153. Successful Perioperative Management of Orthotopic Cardiac Transplantation in a Pediatric Patient With Concurrent Congenital von Willebrand Disease and Acquired von Willebrand Syndrome

Using Recombinant von Willebrand Factor / G. Batsuli, K. L. Zimowski, R. Carroll [et al.] // Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia. – 2022. – Vol. 36. – № 3. – P. 724-727.

154. 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 [et al.] // British Journal of Haematology. – 2014. – Vol. 167. – The diagnosis and management of von Willebrand disease. – № 4. – P. 453-465.

155. The first mutations in von Willebrand disease type IIC Miami / Schneppenheim R, Obser T, Drewke E [et al.]. – Thromb Haemost, 2001. – Vol. Supplement. – P. P1805.

156. The molecular defect in type IIB von Willebrand disease. Identification of four potential missense mutations within the putative GpIb binding domain / K. A. Cooney, W. C. Nichols, M. E. Bruck [et al.] // The Journal of Clinical Investigation. – 1991. – Vol. 87. – № 4. – P. 1227-1233.

157. The Montreal platelet syndrome kindred has type 2B von Willebrand disease with the VWF V1316M mutation / S. C. Jackson, G. D. Sinclair, S. Cloutier [et al.] // Blood. – 2009. – Vol. 113. – № 14. – P. 3348-3351.

158. The mutation spectrum associated with type 3 von Willebrand disease in a cohort of patients from the north west of England / M. S. Sutherland, S. Keeney, P. H. B. Bolton-Maggs [et al.] // Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia. – 2009. – Vol. 15. – № 5. – P. 1048-1057.

159. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study / P. D. James, C. Notley, C. Hegadorn [et al.] // Blood. – 2007. – Vol. 109. – The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease. – № 1. – P. 145-154.

160. The natural history of occult or angiodysplastic gastrointestinal bleeding in von Willebrand disease / M. Makris, A. B. Federici, P. M. Mannucci [et al.] // Haemophilia. – 2015. – Vol. 21. – № 3. – P. 338-342.

161. The “Normandy” variant of von Willebrand disease: characterization of a point mutation in the von Willebrand factor gene / C. Gaucher, S. Jorieux, B. Mercier [et al.] // Blood. – 1991. – Vol. 77. – The “Normandy” variant of von Willebrand disease. – № 9. – P. 1937-1941.

162. 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.

163. The VWF gene homepage - Global Variome shared LOVD. – URL: <https://databases.lovd.nl/shared/genes/VWF> (date accessed: 02.02.2023). – Text : electronic.

164. The Y/C1584 mutation of von Willebrand factor in type 2M von Willebrand disease: frequency and clearance of von Willebrand factor / C. M. Millar, A. F. Riddel, A. Griffioe [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 2005. – Vol. 130. – The Y/C1584 mutation of von Willebrand factor in type 2M von Willebrand disease. – № 3. – P. 462-463.
165. Therapeutic consequences for misdiagnosis of Type 2N von Willebrand disease / M. Gupta, D. Lillicrap, A. M. Stain [et al.] // *Pediatric Blood & Cancer*. – 2011. – Vol. 57. – № 6. – P. 1081-1083.
166. Two novel mutations, Q1053H and C1060R, located in the D3 domain of von Willebrand factor, are responsible for decreased FVIII-binding capacity / L. Hilbert, S. Jorieux, V. Proulle [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 2003. – Vol. 120. – № 4. – P. 627-632.
167. Two novel type 2N von Willebrand disease-causing mutations that result in defective factor VIII binding, multimerization, and secretion of von Willebrand factor / S. Allen, A. M. Abuzenadah, J. L. Blagg [et al.] // *Blood*. – 2000. – Vol. 95. – № 6. – P. 2000-2007.
168. 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 [et al.] // *Blood*. – 2001. – Vol. 98. – Type 1 von Willebrand disease mutation Cys1149Arg causes intracellular retention and degradation of heterodimers. – № 10. – P. 2973-2979.
169. Type 2 von Willebrand disease causing defective von Willebrand factor-dependent platelet function / D. Meyer, E. Fressinaud, L. Hilbert [et al.] // *Best Practice & Research. Clinical Haematology*. – 2001. – Vol. 14. – № 2. – P. 349-364.
170. 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. – Vol. 12. – Type 2B von Willebrand disease with or without large multimers. – № 6. – P. e0179566.
171. Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology / C. Mazurier, J. Goudemand, L. Hilbert [et al.] // *Best Practice & Research. Clinical Haematology*. – 2001. – Vol. 14. – Type 2N von Willebrand disease. – № 2. – P. 337-347.
172. Type 2N von Willebrand disease: rapid genetic diagnosis of G2811A (R854Q), C2696T (R816W), T2701A (H817Q) and G2823T (C858F)--detection of a novel candidate type 2N mutation: C2810T (R854W) / D. J. Bowen, G. R. Standen, C. Mazurier [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1998. – Vol. 80. – Type 2N von Willebrand disease. – № 1. – P. 32-36.
173. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov, the UGENE team // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28. – Unipro UGENE. – № 8. – P. 1166-1167.
174. 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 [et al.] // *Journal*

of Thrombosis and Haemostasis. – 2006. – Vol. 4. – Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease. – № 10. – P. 2103-2114.

175. von Willebrand disease and aging: an evolving phenotype / Y. V. Sanders, M. A. Giezenaar, B. a. P. Laros-van Gorkom [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2014. – Vol. 12. – von Willebrand disease and aging. – № 7. – P. 1066-1075.

176. von Willebrand disease R1374C: type 2A or 2M? A challenge to the revised classification. High frequency in the northwest of Spain (Galicia) / N. Penas, A. Pérez-Rodríguez, J. H. Torea [et al.] // *American Journal of Hematology*. – 2005. – Vol. 80. – von Willebrand disease R1374C. – № 3. – P. 188-196.

177. von Willebrand disease type B: a missense mutation selectively abolishes ristocetin-induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib / I. Rabinowitz, E. A. Tuley, D. J. Mancuso [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1992. – Vol. 89. – von Willebrand disease type B. – № 20. – P. 9846-9849.

178. von Willebrand disease “Vicenza” with larger-than-normal (supranormal) von Willebrand factor multimers / P. M. Mannucci, R. Lombardi, G. Castaman [et al.] // *Blood*. – 1988. – Vol. 71. – № 1. – P. 65-70.

179. von Willebrand factor arginine 1205 substitution results in accelerated macrophage-dependent clearance in vivo / O. Rawley, J. M. O’Sullivan, A. Chion [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2015. – Vol. 13. – № 5. – P. 821-826.

180. von Willebrand factor mutation enhancing interaction with platelets in patients with normal multimeric structure / L. Holmberg, J. A. Dent, R. Schneppenheim [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 1993. – Vol. 91. – № 5. – P. 2169-2177.

181. von Willebrand factor propeptide and the phenotypic classification of von Willebrand disease / Y. V. Sanders, D. Groeneveld, K. Meijer [et al.] // *Blood*. – 2015. – Vol. 125. – № 19. – P. 3006-3013.

182. 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. – Vol. 88. – № 3. – P. 421-426.

183. von Willebrand’s disease characterized by increased ristocetin sensitivity and the presence of all von Willebrand factor multimers in plasma / L. Holmberg, E. Berntorp, M. Donner, I. M. Nilsson // *Blood*. – 1986. – Vol. 68. – № 3. – P. 668-672.

184. VWF: Chr12 - Variation Viewer. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/> (date accessed: 02.02.2023). – Text: electronic.

185. Wagner D. D. Cell biology of von Willebrand factor / D. D. Wagner // *Annual Review of Cell Biology*. – 1990. – Vol. 6. – P. 217-246.

186. Weiss H. J. A new von Willebrand variant (type I, New York): increased ristocetin-induced platelet aggregation and plasma von Willebrand factor containing the full range of multimers / H. J. Weiss, I. I. Sussman // *Blood*. – 1986. – Vol. 68. – A new von Willebrand variant (type I, New York). – № 1. – P. 149-156.
187. Wizard® PCR Preps DNA Purification System. – URL: <https://worldwide.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/clean-up-and-concentration/wizard-pcr-preps-dna-purification-system/> (date accessed: 03.01.2023). – Text: electronic.
188. Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System | PCR Purification | PCR Clean Up. – URL: <https://worldwide.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/clean-up-and-concentration/wizard-sv-gel-and-pcr-clean-up-system/> (date accessed: 30.08.2023). – Text: electronic.
189. 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. – Vol. 50. – № 1. – P. 244-254.

Приложение А

(Справочное)

Таблица 17 – Коагулологические данные пациентов

№	vWF:Ag, %	FVIII:C, %	vWF:RCo, %	RIPA, %	АПТВ, сек	Агрегация тромбоцитов с коллагеном	Агрегация тромбоцитов с низкими дозами ристомицина,% (0–6%)
w2	7,9	8,2	21,1	37 (80–100)	48 (29–38)	–	–
w3	14,3	22,6	6,23	88	43,6	–	–
w4	18	28	12,6	69(80–100)	–	86 (50–85)	–
w6	58,2	5,6	–	42	58,2	–	–
w7	5,3	14	–	11	48	–	–
w8	–	–	–	–	–	–	–
w9	–	35	–	не снижен	36,6	–	–
w10	2,8	4,33	0	–	–	–	–
w11	11	8,19	–	71	41,5	–	–
w13	3	10,1	3	5 (80–100)	75	–	–
w14	6,5	3,3	21,1	–	61,5	–	–
w15	–	3	6	3	73	–	–
w16	4,9	3,6	1	9	69,3	–	–
w17	39	55,5	21	29	36	80	–
w18	5,6	5,1	5,6	23	60,1	83	–
w20	33,9	46	2(50–150)	57 (>65%) за 28	–	–	–
w20-2	45,1	40,7	5	47 за 33	–	–	–
w21		83	63	–	–	–	–
w22	23,8	7,7	35	–	60,3	–	–
w23	1	5,4	2	8	54,5	74	–
w24	36	67	17	77	42	70	–
w25	57,1	53,6	4,5	89	43,3	79	–
w26	0,2	5,7	0,1	81	58,8	87	–
w27	10,8	27	5	22	57	66	–

№	vWF:Ag, %	FVIII:C, %	vWF:RCo, %	RIPA, %	АПТВ, сек	Агрегация тромбоцитов с коллагеном	Агрегация тромбоцитов с низкими дозами ристомицина,% (0–6%)
w28	2,1	2,5	1,4	11	62,3	–	–
A45 6	68,9	5,9	63	84	94	75	–
w29	3	2,4	1	4	68	81	–
w30	34	36		снижена	38	–	–
w31	2,5	3,1	1	–	68,7	–	–
w32	28,3	24	7,4	–	–	–	–
w32- 2	–	–	–	–	–	–	–
w34	8,6	7,3	4,8	78	45,3 (23– 32)	–	–
w35	34	36	–	снижена	38	–	–
w37	–	–	–	–	–	–	–
w37- 2	–	–	–	–	–	–	–
w38	49,6	40	41,1	70	40,9	–	–
w40	43,6 (42– 136)	31,4 (70–150)	11,8	–	38,9	–	–
w40- 2	–	–	–	–	–	–	–
w41	–	–	–	–	–	–	–
w42	38	40,8	45	снижена	42,1	–	–
w43	25,5	55	–	64	–	–	–
w44	–	–	–	–	–	–	–
w46	34,6	75,6	8,79	94	41,3	68	58
w46- 2	87,6	116	47	89	36,7	59	41
w48	1,6	6,5	0,1	7	60,6	–	–
w48- 2	–	–	–	–	–	–	–
w50	40	39,8	10,2	92	42,1	–	79

№	vWF:Ag, %	FVIII:C, %	vWF:RCo, %	RIPA, %	АПТВ, сек	Агрегация тромбоцитов с коллагеном	Агрегация тромбоцитов с низкими дозами ристомицина,% (0–6%)
w51	57,4	90,8	61,7	91,00	33,8	91	–
w51- 2	–	–	–	–	–	–	–
w51- 3	72	98	95	86	34	69	–
w52	21,8	52	3,64	–	38,5	–	–
w53	106,6	29,1	100	–	1,24 (0,8– 1,1)	–	–
w54	79	34,8	73,6	–	1,2	–	–
w55	0,9	4,1	–	–	–	–	–
w56	–	69,8	24,2	–	48,2	–	–
w57	–	33,3	60,5	–	1,25	–	–
w58	–	49	80	–	45 (36 донор)	–	–
w59	48,6 (61,3– 152,6)	–	27,3 (48,2– 201,9)	85 (60–100)	35,4 (25,1– 36,5)	–	70

Приложение Б

(Справочное)

Таблица 18 – Системы праймеров и условия ПЦР

Номер экзона	Название праймера	Последовательность праймера от 5` к 3`	Позиция в гене <i>VWF</i> (NG_009072)	Размер фрагмента, пн	Температура отжига (T _{отжига}), °С	Бетаин
2	VWF2d	cta ctg cat gcc ctg ata gt	1391 – 1410	230	62	–
	VWF2r	gag ctc cag aca cac ctg ct	1620 – 1601			
3	VWF3d	ctg atg gtc cca gtt gtg cc	3275 – 3294	326	62	–
	VWF3r	ttc cgc tca gac act gtc ct	3600 – 3581			
4–5	VWF4-5d	gct gag aaa agg tta cgt aga	13608 – 13628	774	62	–
	VWF4-5r	gaa ggc atg tta gtg aag gtt	14381 – 14361			
6	VWF6d	aac cac cag cag acc tag aa	29001 – 29020	330	62	–
	VWF6r	aat ggc cct gcg taa gtc ca	29330 – 29311			
7	VWF7d	aag tct cag tgc cac act ca	49052 – 49071	371	65	–
	VWF7r	cac agc ccc gaa gca ccc ta	49422 – 49403			
8	VWF8d	gca tgg ctg gtg aga tga tgc a	50862 – 50883	243	62	–
	VWF8r	caa ggg tgc tgg caa ggt ct	51104 – 51085			
9	VWF9d	gaa acc caa cca ttg tcc ct	52135 – 52154	289	62	–
	VWF9r	cct gcc acc acc cct gct ga	52423 – 52404			
10	VWF10d	ttc tgc tag cac cag ctc tt	53191 – 53210	291	62	–
	VWF10r	gca act tct cgc tgc ctt ga	53481 – 53462			
11–12	VWF11d	tgc agt ttt ggg gaa ggg ca	59291 – 59310	1204	62	–
	VWF12r	gtt gag aag gag ggt gct aa	60494 – 60475			
13	VWF13d	gac acc cca ttt cct ccc aa	61529 – 61548	265	62	–
	VWF13r	cca ttc tac cca gag cac aa	61793 – 61774			
14	VWF14d	tac act gca gtt cac ttt ccc	66441 – 66461	460	62	–
	VWF14r	tgc ctc cgg aac gca ctg ca	66900 – 66881			
15	VWF15d	cag att tct ctg cgt gac ct	67469 – 67488	455	62	+
	VWF14-15r	ccc tac gcc ctc ttt cca ca	67923 – 67904			
16	VWF16d	acc aca gtc ctt gct gtc ca	71829 – 71848	340	62	–
	VWF16r	gcc cca gtt tac cca tcc at	72228 – 72209			

Номер экзона	Название праймера	Последовательность праймера от 5`к 3`	Позиция в гене <i>VWF</i> (NG_009072)	Размер фрагмента, пн	Температура отжига (Т _{отжига}), °С	Бетаин
17	VWF17d	aac gtt agc aag ctg tgc ttc a	77711 – 77732	339	62	–
	VWF17r	acg cac atc tga cgg tgt ca	78049 – 78030			
18	VWF18d	gat gcc ctc cca gtc cca ca	80045 – 80064	400	62	–
	VWF18r	ctc act cat ccc tgc cta ca	80444 – 80425			
19	VWF19d	gct gga gga ggg ctt tag at	88117 – 88136	259	62	–
	VWF19r	tgg agg caa gtg cgg aag gt	88375 – 88356			
20	VWF20d	gtg ttc ctt cat tgc ctc cat	89760 – 89780	310	62	–
	VWF20r	cag atc cac aga acc caa cct	90069 – 90049			
21	VWF21d	gat cct gtg aca cgt act ca	92985 – 93004	379	62	–
	VWF21r	tag ctc tgc ctc atc ctc tt	93363 – 93344			
22	VWF22d	tgg ctg tgc agc ctg ccc tt	95128 – 95147	284	62	–
	VWF22r	gtc ctt aga gac cta cga tca	95411 – 95391			
23-24	VWF23d	gga atg ttc ccc ttt ccc ct	98547 – 98566	614	62	–
	VWF23rx	cac tct gtg tcc ata cca cca	99160 – 99140			
25	VWF25dx	cca gac taa gag cca gag ttc c	100817 – 100838	354	62	–
	VWF25rx	cat cca gtc cct act aac act	101170 – 101150			
26–27	VWF2627 dx	cca aca tta tct cca gat ggc	101674 – 101694	1180	62	–
	VWF2627 rx	tta ccc aaa acc tag tct cta a	102853 – 102832			
28	VWF28-1d	cag aag tgt cca cag gtt ct	104871 – 104890	1510	65	–
	VWF28-3r	gca gat gca tgt agc acc aa	106380 – 106361			
29–31	VWF2931 d	cac gcc ctg cag atc cta tt	107705 – 107724	962	60	–
	VWF2931 r	aaa gta acc cca gcc cac tt	108666 – 108647			
32	VWF32	cca gtc cat ttt gag cct tct	110967 – 110987	396	62	–
	VWF32r	cac ctc cca tga aca gaa act t	111362 – 111341			
33–34	VWF33-34d	ctc atg tcc cta tgt ctc ca	112383 – 112402	752	62	–
	VWF33-34r	cct gct cta ctt ttc tgc aca	113134 – 113114			
35	VWF35d	tca cac ctg cct gtc tgc at	128371 – 128390	430	62	–
	VWF35r	tcc tct cct cca ctt aag ca	128800 – 128781			

Номер экзона	Название праймера	Последовательность праймера от 5`к 3`	Позиция в гене <i>VWF</i> (NG_009072)	Размер фрагмента, пн	Температура отжига (Т _{отжига}), °С	Бетаин
36–37	VWF36-37d	tgc agg aac tct cgg taa ct	129981 – 130000	898	65	–
	VWF36-37r	ggc aca gag agg ctg agc aa	130878 – 130859			
38	VWF38d	tca gct gtg ccc att tca ct	132587 – 132606	409	62	+
	VWF38r	ata ctg cct ccc tat ccc ta	132995 – 132976			
39-40	VWF39-40d	cct cac aac ctc ctt tca gcc t	138841 – 138862	868	62	–
	VWF39-40r	aga cac ctt tca gca cct tca	139708 – 139688			
41	VWF41d	gga atg tag cat ccc act ca	141336 – 141355	318	62	–
	VWF41r	ctc cca acc cag att cag ct	141653 – 141634			
42	VWF42d	gca ccc tat agc ata gct ga	142604 – 142623	422	65	–
	VWF42r	cat gag gag cac atg ttg ct	143025 – 143006			
43	VWF43d	ggg gct aac tca ccg ctt gt	148346 – 148365	289	62	+
	VWF43r	acc ctt cct aag atg ccc tc	148634 – 148615			
44	VWF44d	tgc cca gac cag tga tca ct	152844 – 152863	369	62	+
	VWF44r	cat ctg gat aac acc aac agc t	153212 – 153191			
45	VWF45d	cgt cta gaa acc acc ttc ct	155181 – 155200	397	62	–
	VWF45r	tcg gtc cta tcc att tcc ct	155577 – 155558			
46-47	VWF46-47d	cct gct cgc egg tct cac ca	156439 – 156458	820	62	–
	VWF46-47r	gca gtg agg tcc cac tgc ct	157258 – 157239			
48	VWF48d	cca gca aaa tca gcc tac tta ca	170999 – 171031	270	62	–
	VWF48r	cca aac tta gcc cct ctt cct	171268 – 171248			
49-50	VWF49-50d	gca gat tgt ttc gtc atc tcc a	172051 – 172072	847	62	–
	VWF49-50r	gca agc tgc aaa gag ccc ct	172897 – 172878			

Номер экзона	Название праймера	Последовательность праймера от 5` к 3`	Позиция в гене <i>VWF</i> (NG_009072)	Размер фрагмента, пн	Температура отжига ($T_{отжига}$), °C	Бетаин
51	VWF51d	gtt ctc tag aac ccc agc ca	174735 – 174754	266	58	–
	VWF51r	tcc ctt ctc ttc cct gcg aa	175000 – 174981			
52	VWF52d	cca gag ccc tgc cta agc ca	175400 – 175419	444	65	+
	VWF52r	cct gcc cac cgt tgc cat ct	175843 – 175824			

Приложение В

(Справочное)

Таблица 19 – Мутационная картина для каждого пациента, включая родственников пациентов (указаны как номер пациента и «-2»)

№	Мутация	Экзон	Мутация	Экзон
w2	p.Arg1399His (CGC>CAC)	28	p.Pro2527His (CCC>CAC)	45
w3	p.Tyr1146Cys (TAT>TGT)	26	–	–
w4	p.Arg1374Cys (CGC>TGC)	28	–	–
w6	c.2098_2099insG	16	p.Arg816Trp (CGG>TGG)	19
w7	c.2435delC	18	p.Arg273Trp (CGG>TGG)	7
w8	p.Tyr1146Cys (TAT>TGT)	26	p.Tyr1146Cys (TAT>TGT)	26
w9	Нет. Проанализированы все экзоны.	–	–	–
w10	c.2435delC	18	c.6029delC	35
w11	p.Ser1506Leu (TCG>TTG)	28	–	–
w13	c.2435delC	18	p.Arg1659Ter (CGA>TGA)	28
w14	c.2435delC	18	–	–
w15	c.7482delC	44	p.Arg373Ter (CGA>TGA)	10
w16	c.2435delC	18	c.2435delC	18
w17	p.Gly1609Arg (GGA>AGA)	28	–	–
w18	c.2435delC	18	c.2435delC	18
w20	p.Arg1597Trp (CGG>TGG)	28	–	–
w20-2	p.Arg1597Trp (CGG>TGG)	28	–	–
w21	p.Asp853Asn (GAC>AAC)	20	Проанализированы все экзоны.	–
w22	p.Thr791Met (ACG>ATG)	18	c.2435delC	18
w23	c.2435delC	18	p.Arg373Ter (CGA>TGA)	10
w24	p.Arg1597Gln (CGG>CAG)	28	–	–
w25	p.Ser1506Leu (TCG>TTG)	28	–	–
w26	c.2435delC	18	p.Cys1101Arg (TGC>CGC)	25
w27	p.Arg273Trp (CGG>TGG)	7	–	–
w28	c.2435delC	18	c.2435delC	18
A456	p.Thr791Met (ACG>ATG)	18	c.2435delC	18
w29	c.2435delC	18	c.6457_6458insA	37
w30	p.Arg1374Cys (CGC>TGC)	28	–	–

№	Мутация	Экзон	Мутация	Экзон
w31	c.2435delC	18	Проанализированы все экзоны.	–
w32	p.Arg1306Trp (CGG>TGG)	28	–	–
w32-2	p.Arg1306Trp (CGG>TGG)	28	–	–
w34	p.Arg1205His (CGT>CAT)	27	–	–
w35	p.Arg1205His (CGT>CAT)	27	–	–
w37	p.Arg1341Gln (CGA>CAA)	28	–	–
w37-2	p.Arg1341Gln (CGA>CAA)	28	–	–
w38	Нет. Проанализирован экзон 28.	–	–	–
w40	p.Arg1308Cys (CGC>TGC)	–28	–	–
w40-2	Нет. Проанализирован экзон 28.	–	–	–
w41	Нет. Проанализирован экзон 28.	–	–	–
w42	c.2098_2099insG	16	p.Arg924Gln (CGG>CAG)	21
w43	p.Met576Ile (ATG>ATT)	14	–	–
w44	p.Arg1308Pro (CGC>CCC)	28	p.Val1565Leu (GTG>TTG)	28
w46	p.Val1316Met (GTG>ATG)	28	p.Val1565Leu (GTG>TTG)	28
w46-2	p.Val1316Met (GTG>ATG)	28	p.Val1565Leu (GTG>TTG)	28
w48	c.2968-2A>G	23	c.6970delG	40
w48-2	c.6970delG	40	–	–
w50	p.Arg1308Cys (CGC>TGC)	28	–	–
w51	p.Pro1266Leu (CCG>CTG)	28	p.Val1279Ile (GTC>ATC)	28
w51-2	p.Pro1266Leu (CCG>CTG)	28	p.Val1279Ile (GTC>ATC)	28
w51-3	Нет. Проанализирован экзон 28.	–	–	–
w52	p.Phe1293Ser (TTT>TCT)	28	–	–
w53	Нет. Проанализированы экзоны для типа 2N	–	–	–
w54	p.Arg854Gln (CGG>CAG)	20	p.Arg854Gln (CGG>CAG)	20
w55	c.2435delC	18	c.8333_8341delGGACGGAGC	52
	p.Arg924Gln (c.2771G>A)	21		
w56	p.Tyr1271Ter (TAC>TAG)	28	–	–
w57	Нет. Экзоны 17-28.	–	–	–
w58	Нет. Экзоны 17-28.	–	–	–
w59	p.Arg1306Trp (CGG>TGG)	28	–	–

Приложение Г

(Справочное)

Таблица 20 – Соответствие клинического диагноза результатам молекулярно-генетического анализа

Пациент	Возраст, лет	Пол	Входящий диагноз, знаком вопроса обозначена неуверенность врача в диагнозе	Диагноз по найденным вариантам в гене <i>vWF</i>	1-подтверждение 2- уточнение типа 3-смена типа 4- исключен 5- смена диагноза
w2	72	м	БВ	БВ	1
w3	63	ж	БВ	2А	2
w4	44	ж	БВ	2М	2
w6	16	ж	1	2N	3
w7	21	м	1	3	3
w8	15	м	БВ	2А	2
w9	13	м	исключить БВ	не БВ	1
w10	21	ж	3	3	1
w11	18	ж	БВ	2А	2
w13	59	ж	3	3	1
w14	44	ж	БВ	БВ	1
w15	50	ж	3	3	1
w16	48	ж	3	3	1
w17	42	ж	БВ	2А	2
w18	32	м	1	3	3
w20	12	м	2а	2А	1
w20-2	–	м	родственник w20	2А	
w21	–	м	БВ	не БВ	4
w22	50	ж	БВ	2N	2
w23	39	м	3	3	1
w24	44	ж	2	2А	2
w25	57	ж	БВ	2А	2
w26	23	ж	3	3	1
w27	56	ж	1	БВ	1
w28	42	м	БВ	3	2

Пациент	Возраст, лет	Пол	Входящий диагноз, знаком вопроса обозначена неуверенность врача в диагнозе	Диагноз по найденным вариантам в гене <i>vWF</i>	1-подтверждение 2- уточнение типа 3-смена типа 4- исключен 5- смена диагноза
A456	–	м	гемофилия А	2N	5
w29	37	ж	3	3	1
w30	–	ж	2В	2М	3
w31	–	ж	3	БВ	1
w32	–	ж	2В	2В	1
w32-2	–	ж	родственник w32	2В	–
w34	–	ж	1	1С	1
w35	–	м	1	1С	1
w37	–	ж	2А	2В	3
w37-2	–	м	родственник w37	2В	–
w38	–	ж	2В	не 2В	4
w40	–	м	1	2В	3
w40-2	–	м	2В, родственник w40	2В	–
w41	–	ж	2В	не 2В	4
w42	–	ж	1	БВ	1
w43	–	ж	1	1	1
w44	–	ж	1	2В	3
w46	–	м	2В	2В	1
w46-2	–	ж	родственник w46	2В	–
w48	–	м	3	3	1
w48-2	50	ж	родственник w48	не 3	–
w50	64	м	2В	2В	1
w51	47	ж	1	2В	3
w51-2	67	ж	родственник w51	2В	–
w51-3	19	м	родственник w51	не БВ	–
w52	34	ж	БВ	БВ	1
w53	37	ж	2N/гемофилия А	не 2N	4
w54	37	ж	2N/гемофилия А	2N	1
w55	3	м	3	3	1
w56	33	ж	БВ	БВ	1
w57	32	м	2N/гемофилия А	не 2N	4
w58	42	ж	2N/гемофилия А	не 2N	4

Пациент	Возраст, лет	Пол	Входящий диагноз, знаком вопроса обозначена неуверенность врача в диагнозе	Диагноз по найденным вариантам в гене <i>vWF</i>	1-подтверждение 2- уточнение типа 3-смена типа 4- исключен 5- смена диагноза
w59	65	м	2В /тромбоцитопения	2В	1