

БОЛЕЗНЬ ВИЛЛЕБРАНДА: СОПОСТАВЛЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ, КОАГУЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДАННЫХ

Чернецкая Д. М.^{*}, Лихачева Е. А.², Пшеничникова О. С.¹, Сурин В. Л.¹, Зозуля Н. И.²

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

¹Лаборатория генной инженерии

²Научно-консультативный отдел коагулопатий

РЕЗЮМЕ

Введение. Болезнь Виллебранда (БВ), являющаяся одной из самых распространенных коагулопатий, имеет сложный характер наследования, который, в зависимости от типа заболевания, может быть как доминантным, так и рецессивным.

Цель настоящей работы — сопоставление клинических, коагулогических и молекулярно-генетических данных, полученных при обследовании больных различными типами БВ.

Материалы и методы: экзоны гена *vWF* для 16 больных БВ секвенировали по методу Сэнгера.

Результаты. Всего было выявлено 12 различных мутаций, одна из которых (Pro2527His) ранее в мировой популяции не встречалась. Наиболее распространенной оказалась микроделеция с.2435delC, являющаяся мажорной во многих странах Европы. Она встретилась у 9 больных, 6 из которых имели самый тяжелый рецессивный 3-й тип заболевания (3 гомозиготы). Еще у 2 больных это нарушение сочеталось с миссенс-мутацией Thr791Met, что позволило диагностировать у них достаточно редкий рецессивный вариант БВ — 2N. В целом, данные молекулярно-генетического анализа соответствовали результатам дифференциальной диагностики типа БВ, основанной на клинической картине заболевания и коагулогических характеристиках. Только в одном случае у больной с предполагаемым 1-м типом БВ была выявлена мутация Arg1374Cys, характерная для типа 2 (A/M). Большая часть мутаций была обнаружена в экзонах 18 (преимущественно это была делеция с.2435delC) и 28, что делает эти экзоны наиболее перспективными при поиске мутаций.

Заключение. Начинать поиск мутаций в гене *vWF* целесообразно с экзонов 18 и 28. Полученные данные могут послужить основой для создания экономичного алгоритма поиска мутаций в гене *vWF* у отечественных больных БВ.

Ключевые слова: болезнь Виллебранда, коагулопатия, кровотечение, молекулярные методы, ген, мутация

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Чернецкая Д.М., Лихачева Е.А., Пшеничникова О.С., Сурин В.Л., Зозуля Н.И. Болезнь Виллебранда: сопоставление клинических, коагулогических и молекулярно-генетических данных. Гематология и трансфузиология. 2019; 64(3):246–255. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-3-246-255>

VON WILLEBRAND DISEASE: CLINICAL, COAGULOLOGICAL, MOLECULAR AND GENETIC DATA COMPARISON

Chernetskaya D. M.^{*}, Likhacheva E. A.², Pshenichnikova O. S.¹, Surin V. L.¹, Zozulya N. I.²

National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

¹Laboratory of genetic engineering

²Scientific and consulting department of coagulopathies

ABSTRACT

Introduction. Von Willebrand disease (vWD) — one of the most common coagulopathies — is characterised by a rather complicated inheritance pattern, which can be either dominant or recessive depending on the disease type.

Aim. To compare clinical, coagulological and molecular genetic data obtained when examining patients with various types of vWD.

Materials and methods. The vWF gene exons were sequenced in 16 patients suffering from VWD using the Sanger method.

Results. In total, 12 various mutations were identified, one of which (Pro2527His) has not been previously observed in the world population. The c.2435delC microdeletion being a major mutation in many European countries was found to be the most common. This microdeletion was observed in 9 patients, 6 of whom had the most severe recessive form of the disease — type 3 (3 homozygotes). In two patients, this disorder was accompanied by the missense mutation Thr791Met, which allowed the authors to diagnose a rather rare recessive variant of vWD — 2N. In general, the data obtained by molecular genetic analysis correlated with the differential diagnosis of the vWD type, which is based on the clinical picture of the disease and coagulological properties. In only one case, the Arg1374Cys mutation characteristic of type 2 VWD (A/M) was observed in a patient with the alleged type 1 vWD. Most of the mutations were found in exons 18 (mainly c.2435delC deletion) and 28 which makes them the most perspective exons for the mutation search.

Conclusion. The search for mutations in the vWF gene should start from exons 18 and 28. The obtained information provides a basis for developing an economical algorithm aimed at searching for mutations in the vWF gene in our country vWD patients.

Keywords: von Willebrand disease, coagulopathy, bleeding, molecular methods, gene, mutation

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Chernetskaya D.M., Likhacheva E.A., Pshenichnikova O.S., Surin V.L., Zozulya N.I. Von Willebrand disease: clinical, coagulological, molecular and genetic data comparison. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2019; 64(3):246–255 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-3-246-255>

Введение

Болезнь Виллебранда (БВ) относится к наиболее распространенным наследственным коагулопатиям. По результатам эпидемиологического исследования [1], частота встречаемости индивидов со сниженной плазменной активностью фактора Виллебранда в различных популяциях может достигать 1 %, хотя по оценкам специализированных медицинских центров, основанным на данных комплексного анализа, включающего коагулологические и генетические тесты, частота встречаемости БВ не превышает 1:10 000 [2]. Заболевание вызывается дефицитом или структурно-функциональными нарушениями фактора фон Виллебранда (vWF) — крупного мультимерного гликопротеина, играющего важную роль в поддержании гемостаза. Разные домены этого белка взаимодействуют с фактором свертывания крови VIII (FVIII), гликопротеинами на поверхности тромбоцитов и коллагеном [3]. Ген *vWF* локализован в прителомерной области короткого плеча 12-й хромосомы (12p13.31), занимает на ней около 178 тпн и состоит из 52 экзонов [4]. Существует также частичная копия этого гена — непроцессированный псевдоген на длинном плече хромосомы 22 (22q11–13), включающий экзоны 23–34 и имеющий гомологию с геном 97 % [5].

Различают первый, второй и третий типы БВ, причем для второго типа выделяют также четыре подтипа заболевания (2А, 2В, 2М и 2N) [6]. Общая и дифференциальная (по типам) диагностика БВ осуществляется на основе определения клинического, лабораторного и молекулярного фенотипов. Геморрагический синдром преимущественно по микроциркуляторному типу варьирует в широких пределах — от легких, малосимптомных, до тяжелых клинических форм. Фенотипы БВ во многом определяются генетическим фоном и зависят от типа мутации, степени экспрессии гена, а также остаточной функциональной активности гликопротеина. В этой связи внутри каждого типа БВ могут наблюдаться субпопуляции с тяжелыми или более легкими проявлениями [7]. При тяжелых формах, преимущественно 3-м типе БВ, помимо кровоточивости из слизистых оболочек, могут возникать гемартрозы. Однако данные о частоте артропатии при БВ немногочисленны [8–10].

При коагулологическом исследовании оценивают антиген vWF (vWF:Ag), активность FVIII (FVIII:C) (она снижается, если снижена активность vWF) и ристоцетин-кофакторную активность (vWF:RCO). Для уточнения типа заболевания исследуют агрегацию тромбоцитов, индуцированную ристоцетином, и профиль мультимеров vWF с помощью электрофореза в агарозном геле.

Наиболее распространена БВ 1-го типа, она составляет от 55 до 70 % всех диагностированных случаев. Чаще всего при этом варианте заболевания наблю-

дается снижение количества vWF без нарушения его функций. Самая редкая (1–3 %) и тяжелая форма БВ 3-го типа характеризуется практически полным отсутствием vWF. Поскольку одной из функций vWF является связывание с FVIII и его защита от преждевременного протеолиза, у больных БВ 3-го типа наблюдается не только отсутствие vWF, но и очень низкое значение FVIII:C.

При БВ 2-го типа наблюдаются качественные дефекты vWF, которые у большинства больных выражаются в непропорциональном снижении vWF:RCO (или vWF:CB) по отношению к vWF:Ag. Для диагностики подтипов БВ типа 2 используют анализ структуры мультимеров vWF.

У больных БВ типа 2А наблюдаются изолированный дефицит высокомолекулярных мультимеров vWF и сниженная vWF-зависимая адгезия тромбоцитов.

Тип 2В БВ включает различные варианты качественного дефекта vWF, выражающиеся в его повышенном сродстве к рецептору гликопротеину Ib-тромбоцитов.

Тип 2М БВ включает различные варианты качественного дефекта vWF, выражающиеся в снижении vWF-зависимой адгезии тромбоцитов без изолированного дефицита высокомолекулярных мультимеров vWF. Функциональный дефект обусловлен мутациями, в результате которых происходит нарушение связывания vWF с тромбоцитами или субэндотелием.

Тип 2N БВ (Нормандия) был впервые описан в 1990 г. [11]. У больных с БВ типа 2N имеется дефект vWF в месте связывания с FVIII. В результате этого не может образоваться комплекс vWF–FVIII. Данный вариант БВ определяют с помощью теста связывания vWF с FVIII [12]. У многих больных с данным вариантом БВ ранее диагностировали гемофилию А легкой или умеренной степени тяжести (FVIII:C составляет 5–22 %) [13].

Анализ мутаций в гене *vWF* позволяет не только верифицировать диагноз БВ, но и способствует уточнению типа заболевания, поскольку генные дефекты, соответствующие различным типам и подтипам БВ, различаются по своему характеру и локализации [14, 15]. Так, для БВ 1-го и 3-го типов характерны «тяжелые» мутации, приводящие к полному отсутствию функционального белка (нонсенс-мутации, frameshift-мутации, мутации в канонических динуклеотидах сайтов сплайсинга) и рассеянные по всему пространству гена, тогда как при 2-м типе (кроме рецессивных вариантов 2А и 2N) встречаются только приводящие к аминокислотным заменам миссенс-мутации, причем преимущественно в самом большом экзоне 28 гена *vWF* (1399 пн), кодирующем домены А1 и А2, отвечающие за мультимеризацию белка. Варианты БВ 3-го типа и подтипа 2N наследуются рецессивно, и, следовательно, для их проявления необходимо наличие мутаций в обоих аллелях гена *vWF*. Для подтипов 2В и 2М характерно

доминантное наследование, то есть достаточно нарушения только в одном из аллелей. Тип 1 и подтип 2А в генетическом плане более сложны и могут иметь оба варианта наследования [14].

Цель настоящей работы — сопоставление клинических, коагулологических и молекулярно-генетических данных, полученных при обследовании российских больных различными типами БВ.

Больные и методы

Больные

В исследование было включено 15 больных с установленным диагнозом БВ и один больной с генетически не подтвердившимся первичным диагнозом гемофилия А. Критериями диагноза БВ были: клинические проявления геморрагического синдрома, семейный анамнез и снижение $vWF:RCo$. Диагностический алгоритм выполнялся в соответствии с Национальными клиническими рекомендациями Российской Федерации [16]. Характеристика больных: 4 больных 1-м типом БВ (25 %), 5 больных 2-м типом БВ (31 %), 6 больных 3-м типом БВ (37 %), один больной, у которого первоначально был установлен диагнозом легкой формы гемофилии А (7 %); средний возраст (лет) 47 (21–71), средняя масса тела (кг) 72 (48–90); пол м/ж 5/11. Больные старше 40 лет составили 69 % (11/16). Проводилась оценка клинико-анамнестических данных, результатов исследования свертывающей системы крови и генеалогических данных. Тяжелое проявление болезни наблюдалось у 50 % больных, средняя частота геморрагических эпизодов по микроциркуляторному типу была 3–4 раза в месяц. У одной больной 3-м типом БВ в анамнезе было тотальное эндопротезирование коленного сустава. Коморбидные состояния у 11 больных старшей возрастной группы: заболевания желудочно-кишечного тракта были у 27 % (3), онкологические заболевания — у 9 % (1), аутоиммунные заболевания — у 9 % (1), кардиальная патология — у 27 % (3).

С гемостатической целью применялись концентраты FVIII, сбалансированные по vWF в соотношении FVIII/ vWF (500/1200); FVIII/ vWF (450/400). Шесть больных получали лечение в профилактическом режиме 40 МЕ/кг массы тела два раза в неделю. Десяти больным лечение проводилось концентратами FVIII+ vWF по необходимости в стандартных терапевтических дозах.

Коагулологические тесты

Определение FVIII:C, $vWF:RCo$ выполнялось одностадийным клоттинговым методом; $vWF:Ag$ — методом иммуноферментного анализа; агрегацию тромбоцитов, индуцированную ристоцетином, определяли оптическим методом. Оценивали соотношение $vWF:RCo/vWF:Ag$, значение данного показателя $\geq 0,7$ соответствует 1-му типу БВ, до 0,7 — 2-му типу БВ.

Анализ мутаций в гене vWF

ДНК выделяли из периферической крови фенол-хлороформным методом. ПЦР проводили с использованием набора PCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Нуклеотидные последовательности праймеров, температура отжига при ПЦР и использование бетаина (1/5 объема реакционной смеси) для амплификации GC-богатых фрагментов приведены в таблице 1. Очистку ПЦР продуктов для секвенирования проводили при помощи системы Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Олигонуклеотидные праймеры синтезировали в ЗАО «Синтол» (Москва). Секвенирование проводили в ЦКП «Геном» ИМБ РАН с помощью набора реактивов BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100Avant (Applied Biosystems, США).

Найденные мутации анализировали с использованием баз данных EAHAD (https://grenada.lumc.nl/LOVD2/VWF/home.php?select_db=VWF) и HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

Для определения патогенности новой мутации (Pro2527His) использовались следующие ресурсы: Mutation Taster, Provean, SIFT и PolyPhen.

Результаты

В данной работе проведен анализ мутаций в гене vWF у 15 больных БВ. В исследование был также включен больной, у которого первоначально была диагностирована легкая форма гемофилии А (FVIII 3,8 %), но при полном анализе гена $F8$ не найдено никаких отклонений от нормы. Исследовали структуру 23 экзонов из 52 (табл. 1), в которых сосредоточено около 90 % известных к настоящему времени мутаций в гене vWF . Патологические варианты гена vWF были выявлены у всех 16 больных (табл. 2, 3).

Микроделеция с.2435delC, локализованная в экзоне 18, оказалась в исследованной выборке больных самой распространенной, она трижды встретилась в гомозиготном состоянии (№ 6, 8 и 15) и шесть раз — в гетерозиготном (№ 4, 5, 8, 10, 13 и 16). У больных № 9 и 16 эта мутация сочеталась с миссенс-мутацией с.2372 C>T в том же экзоне.

В экзоне 28 выявили пять различных мутаций. У больного № 4 найдена не только мутация с.2435delC в 18-м экзоне, но и с.4975 C>T в 28-м экзоне. В гетерозиготном состоянии в этом экзоне найдены мутации: с.4120 C>T у больного № 3, с.4825 G>A у больного № 7, с.4790 G>A у больного № 11 и с.4517 C>T у больного № 12.

В пяти экзонах было обнаружено по одной мутации. У больного № 2 в 26-м экзоне с.3437 A>G, у больного № 14 в 7-м экзоне с.817 C>T. У больных № 5 и 13

Таблица 1. Системы праймеров, использованные для амплификации и секвенирования гена *vWF*
Table 1. Primer sets used for amplification and sequencing of *vWF* gene

Номер экзона <i>Exon number</i>	Система праймеров <i>Primer set</i>	Позиция в гене <i>vWF</i> GeneBank NCBI NG_009072 <i>Position in vWF gene</i> GeneBank NCBI NG_009072	$T_{отж}$, °C $T_{анн}$, °C	Бетаин <i>Betain</i>
3	CTGATGGTCCCAGTTGTGCC TTCCGCTCAGACACTGTCCT	3275–3294 3660–3581	65	–
4–5	GCTGAGAAAAGGTTACGTAGA GAAGGCATGTTAGTGAAGGTT	13608–13628 14381–14361	62	–
7	AAGTCTCAGTGCCACACTCA CACAGCCCCGAAGCACCCCTA	49052–49071 49422–49403	65	–
11–12	TGCAGTTTTGGGGAAGGGCA GTTGAGAAGGAGGGGTGCTAA	59291–59310 60494–60475	65	–
18	GATGCCCTCCCAGTCCCACA CTCACTCATCCCTGCCTACA	8004 –80064 80444–80425	65	+
19	GCTGGAGGAGGGCTTTAGAT TGGAGGCAAGTGCGGAAGGT	88117–88136 88375–88356	62	–
25	CCAGACTAAGAGCCAGAGTTCC CATCCAGTCCCTACTAACACT	100817–100838 101170–101150	65	+
26–27	CCAACATTATCTCCAGATGGC TTACCCAAAACCTAGTCTCTAA	101674–101694 102853–102832	62	+
28	CAGAAGTGTCCACAGGTTCT GCAGATGCATGTAGCACCAA	104871–104890 106380–106361	62	+
29–31	CACGCCCTGCAGATCCTATT AAAGTAACCCCAGCCCACTT	107705–107724 108666–108647	62	+
33–34	CTCATGTCCCTATGTCTCCA CCTGCTCTACTTTTCTGCACA	112383–112402 114134–113114	62	+
36–37	TGCAGGAAGTCTCGGTAAGT GGCACAGAGAGGCTGAGCAA	129981–130000 130878–130859	65	+
42	GCACCCTATAGCATAGCTGA CATGAGGAGCACATGTTGCT	142604–142623 143025–143006	65	–
43	GGTGCTAACTACCGCTTGT ACCCCTTCCTAAGATGCCCTC	148346–148365 148634–148615	62	+
45	CGTCTAGAAACCACTTCCT TCGGTCCTATCCATTCCCT	155181–155200 155577–155558	65	+
52	CCAGAGCCCTGCCTAAGCCA CCTGCCACCGTTGCCATCT	175400–175419 180843–180824 (NG_009072.1)	65	+

мутация с.2435delC была дополнена гетерозиготными мутациями в других экзонах: в 37-м с.6532 и 25-м с.3301 Т>С соответственно.

Отдельный интерес представляет мутация с.7580 С>А у больного № 1 в экзоне 45. Она не встречалась ранее в литературе, поэтому для определения патогенности найденной вариации использовали различные системы анализа белковых структур, которые дали следующие результаты: Mutation Taster (disease causing: $p = 0,799$), Provean (neutral: score –2,38), SIFT (damaging: score 0,018) и PolyPhen (HumDiv probably damaging: score 1,000, HumVar probably damaging: score 0,972). Таким образом, три из четырех использованных программ указали на патогенность найденной замены, а в системе Provean полученный коэффициент был близок к границе между нейтральностью и патогенностью.

Обсуждение

В соответствии с клинической картиной заболевания и коагулологическими характеристиками, у 4 больных был определен тип 1 БВ, у 5 — тип 2 и у 6 — тип 3. У больных БВ 3-го типа наблюдалось тяжелое течение болезни с высокой частотой геморрагических эпизодов и определялись низкие значения *vWF*-Ag (0–3,8 %) и *vWF*:RCo (1,21–3,5 %). У всех 6 больных была найдена одна и та же микроделеция в экзоне 18 с.2435delC, приводящая к синтезу сильно укороченного нефункционального белка, причем у 3 больных в гомозиготном состоянии (№ 6, 8 и 15).

В группе больных, у которых мутации выявлены в гомозиготном состоянии, наиболее выраженное поражение опорно-двигательного аппарата наблюдалось у больной № 6 (рис. 1). Дебют геморрагического синдрома у нее возник в раннем детском возрасте, а с 4 лет наблюдались рецидивирующие гемартрозы коленных суставов с по-

Таблица 2. Коагулогические и генетические характеристики больных БВ
Table 2. Coagulological and genetic characteristics of vWD patients

Номер больного Patient's No.	Тип БВ по фенотипу vWD type by phenotype	Коагулогические тесты Coagulological tests	Экзон Exon	Мутация Mutation	Тип БВ по генотипу VWD type by genotype
1	1	FVIII 7,9 % vWF:RCo 21 % AgVWF 7,9 % RIPA 37 %	45	c.7580 C>A Pro2527His	?
2	2	FVIII 22,6 % vWF:RCo 6,23 % AgVWF 14 % RIPA 88 %	26	c.3437 A>G Tyr1146Cys	2A
3	1	FVIII 28 % vWF:RCo 12,6 % AgVWF 18 % RIPA 69 %	28	c.4120 C>T Arg1374Cys	2A/2M
4	3	FVIII 10,1 % vWF:RCo 3 % AgVWF 3 % RIPA 5 %	18 28	c.2435delC c.4975 C>T Arg1659X	3
5	1	FVIII 3,3 % vWF:RCo 21,1 % AgVWF 6,5 % RIPA 4 %	18 37	c.2435delC c.6532 G>T Ala2178Ser	1 rec
6	3	FVIII 3,6 % vWF:RCo 1,21 % AgVWF 3,8 % RIPA 6 %	18 18	c.2435delC c.2435delC	3
7	2	FVIII 55 % vWF:RC 6 % AgVWF 34 % RIPA 29 %	28	c.4825 G>A Gly1609Arg	2A
8	3	FVIII 6,7 % vWF:RCo 2,2 % AgVWF 0 % RIPA 10 %	18 18	c.2435delC c.2435delC	3
9	2	FVIII 13 % vWF:RCo 109 % Ag VWF 27,5 % RIPA 92 %	18 18	c.2435delC c.2372 C>T Thr791Met	2N
10	3	FVIII 9,25 % vWF:RCo 3,5 % AgVWF 0,8 % RIPA 6 %	18	c.2435delC	3
11	2	FVIII 105 % vWF:RCo 16,4 % Ag vWF 48,4 % RIPA 80 %	28	c.4790 G>A Arg1597Gln	2A
12	2	FVIII 53,6 % vWF:RCo 4,5 % AgVWF 57,1 % RIPA 89 %	28	c.4517 C>T Ser1506Leu	2A
13	3	FVIII 3,5 % vWF:RCo 2,1 % Ag VWF 2,7 % RIPA 11 %	18 25	c.2435delC c.3301 T>C Cys1101Arg	3
14	1	FVIII 20,9 % vWF:RCo 2,21 % AgVWF 1,4 % RIPA 17 %	7	c.817 C>T Arg273Trp	?
15	3	FVIII 2,5 % vWF:RCo 1,4 % AgVWF 2,1 RIPA 11 %	18 18	c.2435delC c.2435delC	3
16	Гемофилия А	FVIII 3,8 %	18 18	c.2435delC c.2372 C>T Thr791Met	2N

Примечание. Норма FVIII (50–120 %) vWF:RCo (50–150 %) vWF-Ag (50–150 %) RIPA (80–100 %).

Note. Norm of FVIII (50–120 %) vWF:RCo (50–150 %) vWF-Ag (50–150 %) RIPA (80–100 %).

следующим формированием тяжелой артропатии. В возрасте 39 лет было произведено тотальное эндопротезирование левого коленного сустава. Кроме того, у больной в анамнезе были меноррагии и апоплексия яичников.

Мутация c.2435delC широко распространена в странах Балтии, но найдена также и в других европейских популяциях [17, 18]. У больной № 4 она встретилась в сочетании с нонсенс-мутацией Arg1659X, также приводящей к синтезу укороченного нефункционального белка и являющейся мажорной в Финляндии [19], а у больной № 13 — в сочетании с миссенс-мутацией Cys1101Arg в области гена *vWF*, кодирующей домен D3. Замены цистеина в домене D3 обычно приводят к нарушению мультимеризации *vWF*.

Кроме того, данная микроделеция в сочетании с другими мутациями была выявлена у больных БВ 1-го

(№ 5) и 2-го (№ 9) типов, а также у больного, у которого первоначально были диагностирована гемофилия А (№ 16). У больного № 10 мутация c.2435delC оказалась в гетерозиготном состоянии и других мутаций не найдено. Возможно, у него есть дополнительная мутация в одном из экзонов, не охваченных в данном исследовании. У больной № 5 микроделеция c.2435delC была идентифицирована в сочетании с миссенс-мутацией Ala2178Ser. Низкие уровни vWF-Ag (6,5 %) и активности FVIII (3,3 %) в сочетании с высокой остаточной vWF:RCo (21,1 %) свидетельствуют в данном случае в пользу редкой рецессивной формы БВ 1-го типа. У этой больной наблюдался геморрагический синдром (меноррагии, длительные кровотечения после удаления зубов), и по поводу поликистоза яични-

Таблица 3. Мутации в гене *vWF*, выявленные у больных БВ**Table 3.** Mutations in *vWF* gene identified in *vWD* patients

№	Мутация Mutation	Экзон Exon	Число больных Number of patients	Статья с первым описанием First description
1	c.817 C>T Arg273Trp	7	1	Allen et al., [22]
2	c.2372 C>T Thr791Met	18	2	Gaucher, [20]
3	c.2435delC	18	9 (3)*	Zhang et al., [17]
4	c.3301 T>C Cys1101Arg	25	1	Gadisseeur, et al. [26]
5	c.3437 A>G Tyr1146Cys	26	1	James et al. [27]
6	c.4120 C>T Arg1374Cys	28	1	Hilbert et al., 1995 [24]
7	c.4517 C>T Ser1506Leu	28	1	Pérez-Casal, [28]
8	c.4790 G>A Arg1597Gln	28	1	Ginsburg, et al. [29]
9	c.4825 G>A Gly1609Arg	28	1	Donner et al., [30]
10	c.4975 C>T Arg1659X	28	1	Zhang et al., [17]
11	c.6532 G>T Ala2178Ser	37	1	Cumming et al., [31]
12	c.7580 C>A Pro2527His	45	1	Новая New

Примечание. (3)* — трое больных являлись гомозиготами по данной мутации.

Note. (3)* — three patients were homozygous by this mutation.

ков, полипов эндометрия, внематочной беременности ей выполнялись оперативные вмешательства на фоне гемостатической терапии концентратом FVIII, сбалансированным по *vWF*. К настоящему времени отмечается отсутствие геморрагического синдрома, специфическая гемостатическая терапия не требуется.

У больной № 9 и больного № 16 вторым дефектом была миссенс-мутация Thr791Met, относящаяся к группе рецессивных вариантов *vWF*, при которых нарушено связывание с FVIII [20]. Таким образом, оба этих случая можно классифицировать как БВ типа 2N. У многих больных данным вариантом БВ ранее диагностировали гемофилию А легкой или умеренной степени тяжести [13, 21]. У больной № 9 наблюдалась клиническая картина рецидивирующих десневых кровотечений, длительных луночковых кровотечений после удаления зубов, меноррагий, послеоперационных (аппендэктомия) гематом. Диагноз БВ был верифицирован в возрасте 23 лет. Амбулаторно наблюдается в НМИЦ гематологии с 1994 г. Отмечено волнообразное течение заболевания с отсутствием клинических проявлений до 6 мес. В настоящее время, учитывая сопутствующий множественный генерализованный пародонтит, больной планируется хирургическая санация полости рта на фоне гемостатической терапии концентратом FVIII/*vWF* (450/400) (нагрузочная доза 70 МЕ/кг, поддерживающая доза 25 МЕ/кг).

Дифференциальная диагностика БВ по типам и подтипам довольно часто представляет собой непростую задачу, особенно это относится к 1-му типу заболевания, которое может иметь как доминантную, так и рецессивную форму наследования. У больной № 14 с предполагаемым 1-м типом БВ на настоящий момент времени выявлена только миссенс-мутация Arg273Trp в гетерозиготном состоянии. Известно, что гомозиготность по этому генетическому дефекту приводит

к нарушению мультимеризации и секреции *vWF* и ассоциируется с 3-м типом заболевания [22, 23]. Наблюдающиеся крайне низкие показатели *vWF*:RCo (2,21 %) и *vWF*-Ag (1,4 %) предполагают возможное наличие у больной нарушения и во втором аллеле, и в данном случае необходимо полное исследование гена *vWF*.

У больной № 3 выявлена в гетерозиготной форме миссенс-мутация Arg1374Cys, которую ранее относили к 1-му типу БВ, но затем было показано, что она соответствует 2A/2M типам заболевания [24, 25]. Данное нарушение локализовано в домене A1 и вызывает aberrantную мультимеризацию белка.

У больного № 1 с предполагаемым 1-м типом БВ была обнаружена в гетерозиготном состоянии миссенс-мутация Pro2527His, единственная из найденных нами в данном исследовании мутаций, не описанная в литературе. Локализованные в соседних участках домена C1 замены Gln2520Pro и Gly2518Ser нарушают мультимеризацию белка и соответствуют 1-му типу БВ [25]. По нашим данным, она оказалась патогенной. Основные геморрагические проявления у этого больного представляли собой рецидивирующие носовые кровотечения, кроме того, возникали кровоизлияния в склеру глаз на фоне подъема АД до 130/90 мм рт. ст. В возрасте 62 лет после операции уретеролитоэкстракции возникла гематурия. При обследовании был верифицирован диагноз БВ 1-го типа и диагностирована моноклональная гаммапатия. Секреция белка Бенс-Джонса не выявлена. Больной получает гемостатическую терапию концентратом FVIII/*vWF* (450/400) в профилактическом режиме 2700 МЕ × 2 раза в неделю.

У 4 больных БВ 2-го типа были выявлены в гетерозиготном состоянии известные доминантные миссенс-мутации, нарушающие мультимеризацию *vWF*. В трех случаях (№ 7, 11 и 12) они были найдены в экзоне 28, где чаще всего встречаются нарушения, приводящие к БВ

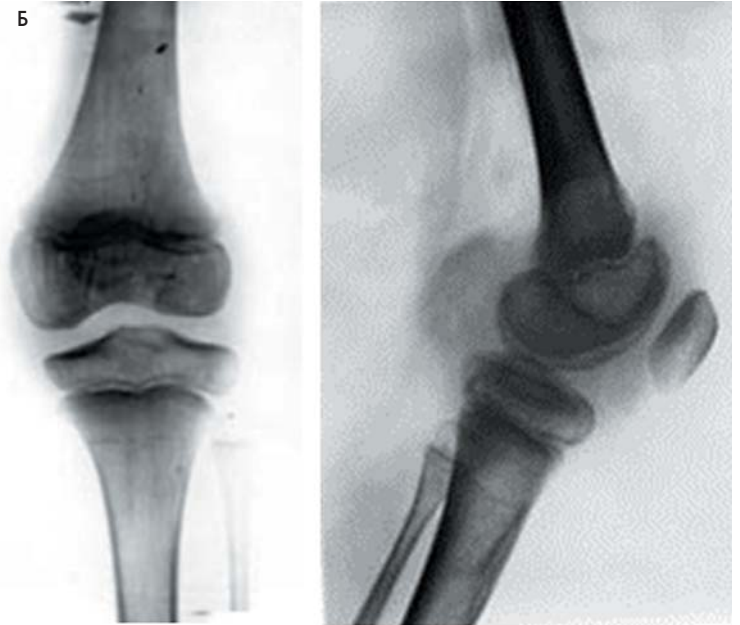
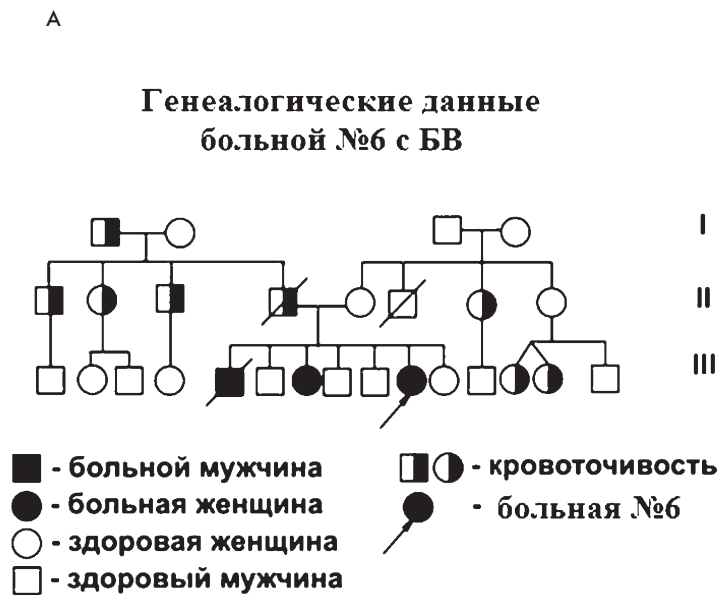


Рисунок 1. А — генеалогические данные больной БВ (№ 6) с 3-м типом БВ

Б — рентгенологические снимки левого коленного сустава больной с признаками гемартроза

Figure 1. А — pedigree of the patient №6 with VWD 3 type. Б — Roentgenograms of the left knee-joint of the patient with hemarthrosis signs

2-го типа [14]. Все три мутации (Ser1506Leu, Arg1597Gln, Gly1609Arg) были локализованы в области гена, кодирующей домен A2. У больной № 2 мутация Tyr1146Cys была найдена в экзоне 26, кодирующем домен D3.

Таким образом, в данном исследовании были определены мутации в гене *vWF* у 16 больных БВ. Всего было выявлено 12 различных мутаций, одна из которых (Pro2527His) оказалась новой. Наиболее распространенной в отечественной популяции является микроделеция с.2435delC, встретившаяся у 9 из 16 больных преимущественно с 3-м типом заболевания, причем у 3 больных — в гомозиготном состоянии. В целом, данные молекулярно-генетического анализа соответ-

ствовали результатам дифференциальной диагностики типа БВ, основанной на клинической картине заболевания и коагулологических характеристиках. Только в одном случае у больной предполагаемым 1-м типом БВ была выявлена мутация, характерная для типа 2 (A/M), и еще в 2 случаях уточнен подтип 2-го типа заболевания (2N). Из 24 найденных мутаций 14 пришлось на экзон 18 (преимущественно это была делеция с.2435delC) и еще 5 — на экзон 28. Из этих результатов следует, что начинать поиск мутаций в гене *vWF* целесообразно с экзонов 18 и 28. Полученные данные могут послужить основой для создания экономичного алгоритма поиска мутаций в гене *vWF* у отечественных больных БВ.

Литература

1. Rodeghiero F., Castaman G., Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood*. 1987; 69: 454–9.
2. Werner E.J., Broxson E.H., Tucker E.L. et al. Prevalence of von Willebrand disease in children: a multiethnic study. *J Pediatr*. 1993; 123: 893–8.
3. Zimmerman T., Ruggeri Z. Von Willebrand disease. *Human Pathology*. 1987; 18(2): 140–52. DOI: 10.1016/S0046-8177(87)80332-5
4. Mancuso D.J., Turley E.A., Westfield L.A. et al. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 1989; 264(33): 19514–27.
5. Mancuso D.J., Tuley E.A., Westfield L.A. et al. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry*. 1991; 30(1): 253–69. DOI: 10.1021/bi00215a036
6. Sadler J. A Revised Classification of von Willebrand Disease. *Thromb Haemost.* 1994; 72(04): 520–5. DOI: 10.1055/s-0038-1642471
7. Federici A.B., Castaman G., Thompson A., Berntorp E. Von Willebrand's disease: clinical management. *Haemophilia*. 2006; 12(3): 152–8.
8. Federici A.B., Mannucci P.M. Diagnosis and management of von Willebrand disease. *Haemophilia*. 1999; 5(2): 28–37.

References

1. Rodeghiero F., Castaman G., Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood*. 1987; 69: 454–9.
2. Werner E.J., Broxson E.H., Tucker E.L. et al. Prevalence of von Willebrand disease in children: a multiethnic study. *J Pediatr*. 1993; 123: 893–8.
3. Zimmerman T., Ruggeri Z. Von Willebrand disease. *Human Pathology*. 1987; 18(2): 140–52. DOI: 10.1016/S0046-8177(87)80332-5
4. Mancuso D.J., Turley E.A., Westfield L.A. et al. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 1989; 264(33): 19514–27.
5. Mancuso D.J., Tuley E.A., Westfield L.A. et al. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry*. 1991; 30(1): 253–69. DOI: 10.1021/bi00215a036
6. Sadler J. A Revised Classification of von Willebrand Disease. *Thromb Haemost.* 1994; 72(04): 520–5. DOI: 10.1055/s-0038-1642471
7. Federici A.B., Castaman G., Thompson A., Berntorp E. Von Willebrand's disease: clinical management. *Haemophilia*. 2006; 12(3): 152–8.
8. Federici A.B., Mannucci P.M. Diagnosis and management of von Willebrand disease. *Haemophilia*. 1999; 5(2): 28–37.

9. Blomback M., Eikenboom J., Lane D. et al. Von Willebrand disease biology. *Haemophilia*. 2012; 18(4): 141–7.
10. Баркаган З.С. Болезнь Виллебранда. В кн.: Руководство по гематологии. Ред. Воробьев А.И. М.: Ньюдиамед. 2005; 3: 71–3.
11. Drewke E., Krey S., Schneppenheim R., Budde U. A variant of von Willebrand disease (Type 2N) resembling phenotypically mild or moderately severe haemophilia. *Infusionsther Transfusionsmed*. 1995; 22 (1): 48–50.
12. Папаян Л.П., Головина О.Г. Вариантные формы болезни Виллебранда. *Терапевтический архив*. 1990; 7: 86–92.
13. Mazurier C. Von Willebrand disease masquerading as haemophilia A. *Thromb. Haemost.* 1992; 67: 391–6.
14. Goodeve A.C. The genetic bases of von Willebrand disease. *Blood Reviews*. 2010; 24: 123–34. DOI: 10.1016/j.blre.2010.03.003
15. Flood V.H. New insights into genotype and phenotype of VWD. *Hematology*. 2014; 2014(1): 531–5. DOI: 10.1182/asheducation-2014.1.531
16. Лихачева Е.А., Полянская Т.Ю., Зоренко В.Ю. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Виллебранда. М.: Национальное гематологическое общество, 2014.
17. Zhang Z.P., Falk G., Blombäck M. et al. A single cytosine deletion in exon 18 of the von Willebrand factor gene is the most common mutation in Swedish vWD type III patients. *Hum Mol Genet*. 1992; 1(9): 767–8.
18. Schneppenheim R., Krey S., Bergmann F. et al. Genetic heterogeneity of severe von Willebrand disease type III in the German population. *Hum Genet*. 1994; 94 (6): 640–52.
19. Jokela V., Lassila R., Szanto T. et al. Phenotypic and genotypic characterization of 10 Finnish patients with von Willebrand disease type 3: discovery of two main mutations. *Haemophilia*. 2013; 19(6): 344–8. DOI: 10.1111/hae.12225
20. Gaucher C., Jorieu S., Mercier B. et al. The “Normandy” variant of von Willebrand disease: characterization of a point mutation in the von Willebrand factor gene. *Blood*. 1991; 77(9): 1937–41.
21. Casonato A., Galletta E., Sarolo L., Daidone V. Type 2N von Willebrand disease: Characterization and diagnostic difficulties. *Haemophilia*. 2018; 24(1): 134–40. DOI: 10.1111/hae.13366
22. Allen S., Abuzenadah A.M., Hinks J. et al. A novel von Willebrand disease-causing mutation (Arg273Trp) in the von Willebrand factor propeptide that results in defective multimerization and secretion. *Blood*. 2000; 96(2): 560–8.
23. Bowman M., Tuttle A., Notley C. et al. The genetics of Canadian type 3 von Willebrand disease: further evidence for co-dominant inheritance of mutant alleles. *J Thromb Haemost*. 2013; 11(3): 512–20. DOI: 10.1111/jth.12130
24. Hilbert L., Gaucher C., Mazurier C. Identification of two mutations (Arg611Cys and Arg611His) in the A1 loop of von Willebrand factor (vWF) responsible for type 2 von Willebrand disease with decreased platelet-dependent function of vWF. *Blood*. 1995; 86(3): 1010–8.
25. Goodeve A., Eikenboom J., Castaman G. et al. 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). *Blood*. 2007; 109(1): 112–21.
26. Gadisseur A., Berneman Z., Schroyens W. et al. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease type 1/2E (2A subtype IIE), type 1 Vicenza and mild type 1 caused by mutations in the D3, D4, B1–B3 and C1–C2 domains of the von Willebrand factor gene. Role of von Willebrand factor multimers and the von Willebrand factor propeptide/antigen ratio. *Acta Haematol*. 2009;121(2–3):128–38. Doi: 10.1159/000214853.
27. James P.D., Notley C., Hegadorn C. et al. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study. *Blood*. 2007; 109(1):145–54.
28. Pérez-Casal M., Daly M., Peake I. et al. A de novo mutation in exon 28 of the von Willebrand factor gene in a patient with type IIA von Willebrand’s disease
9. Blomback M., Eikenboom J., Lane D. et al. Von Willebrand disease biology. *Haemophilia*. 2012; 18(4): 141–7.
10. Barkagan Z.S. Willebrand Disease. In: Manual of Hematology. Vorobiev A.I., ed. Moscow: Newdiamed. 2005; 3: 71–3 (In Russian).
11. Drewke E., Krey S., Schneppenheim R., Budde U. A variant of von Willebrand disease (Type 2N) resembling phenotypically mild or moderately severe haemophilia. *Infusionsther Transfusionsmed*. 1995; 22 (1): 48–50.
12. Papayan L.P., Golovina O.G. Variant forms of von Willebrand disease. *Therapeutic Archive*. 1990; 7: 86–92 (In Russian).
13. Mazurier C. Von Willebrand disease masquerading as haemophilia A. *Thromb. Haemost.* 1992; 67: 391–6.
14. Goodeve A.C. The genetic bases of von Willebrand disease. *Blood Reviews*. 2010; 24: 123–4. DOI: 10.1016/j.blre.2010.03.003
15. Flood V.H. New insights into genotype and phenotype of VWD. *Hematology*. 2014; 2014(1): 531–5. DOI: 10.1182/asheducation-2014.1.531
16. Likhacheva E.A., Polyanskaya T.Yu., Zorenko V.Yu., ed. acad. Savchenko V.G. Clinical recommendations for von Willebrand disease diagnosis and treatment. Moscow: National hematological society. 2014.
17. Zhang Z.P., Falk G., Blombäck M. et al. A single cytosine deletion in exon 18 of the von Willebrand factor gene is the most common mutation in Swedish vWD type III patients. *Hum Mol Genet*. 1992; 1(9): 767–8.
18. Schneppenheim R., Krey S., Bergmann F. et al. Genetic heterogeneity of severe von Willebrand disease type III in the German population. *Hum Genet*. 1994; 94 (6): 640–52.
19. Jokela V., Lassila R., Szanto T. et al. Phenotypic and genotypic characterization of 10 Finnish patients with von Willebrand disease type 3: discovery of two main mutations. *Haemophilia*. 2013; 19(6): 344–8. DOI: 10.1111/hae.12225
20. Gaucher C., Jorieu S., Mercier B. et al. The “Normandy” variant of von Willebrand disease: characterization of a point mutation in the von Willebrand factor gene. *Blood*. 1991; 77(9): 1937–41.
21. Casonato A., Galletta E., Sarolo L., Daidone V. Type 2N von Willebrand disease: Characterization and diagnostic difficulties. *Haemophilia*. 2018; 24(1): 134–40. DOI: 10.1111/hae.13366
22. Allen S., Abuzenadah A.M., Hinks J. et al. A novel von Willebrand disease-causing mutation (Arg273Trp) in the von Willebrand factor propeptide that results in defective multimerization and secretion. *Blood*. 2000; 96(2): 560–8.
23. Bowman M., Tuttle A., Notley C. et al. The genetics of Canadian type 3 von Willebrand disease: further evidence for co-dominant inheritance of mutant alleles. *J Thromb Haemost*. 2013; 11(3): 512–20. DOI: 10.1111/jth.12130
24. Hilbert L., Gaucher C., Mazurier C. Identification of two mutations (Arg611Cys and Arg611His) in the A1 loop of von Willebrand factor (vWF) responsible for type 2 von Willebrand disease with decreased platelet-dependent function of vWF. *Blood*. 1995; 86(3): 1010–8.
25. Goodeve A., Eikenboom J., Castaman G. et al. 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). *Blood*. 2007; 109(1): 112–21.
26. Gadisseur A., Berneman Z., Schroyens W. et al. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease type 1/2E (2A subtype IIE), type 1 Vicenza and mild type 1 caused by mutations in the D3, D4, B1–B3 and C1–C2 domains of the von Willebrand factor gene. Role of von Willebrand factor multimers and the von Willebrand factor propeptide/antigen ratio. *Acta Haematol*. 2009;121(2–3):128–38. Doi: 10.1159/000214853.
27. James P.D., Notley C., Hegadorn C. et al. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study. *Blood*. 2007; 109(1):145–54.
28. Pérez-Casal M., Daly M., Peake I. et al. A de novo mutation in exon 28 of the von Willebrand factor gene in a patient with type IIA von Willebrand’s disease

coincides with an Mbol polymorphism in the von Willebrand factor pseudogene. Hum Mol Genet. 1993;2(12):2159–61.

29. Ginsburg D., Konkle B.A., Gill J.C. et al. Molecular basis of human von Willebrand disease: analysis of platelet von Willebrand factor mRNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(10):3723–7.

30. Donné M., Kristoffersson A.C., Berntorp E. et al. Two new candidate mutations in type IIA von Willebrand's disease (Arg834-->Gly, Gly846-->Arg) and one polymorphism (Tyr821-->Cys) in the A2 region of the von Willebrand factor. Eur J Haematol. 1993;51(1):38–44.

31. Cumming A., Grundy P., Keeney S. et al. An investigation of the von Willebrand factor genotype in UK patients diagnosed to have type 1 von Willebrand disease. Thromb Haemost. 2006;96(5):630–41.

coincides with an Mbol polymorphism in the von Willebrand factor pseudogene. Hum Mol Genet. 1993;2(12):2159–61.

29. Ginsburg D., Konkle B.A., Gill J.C. et al. Molecular basis of human von Willebrand disease: analysis of platelet von Willebrand factor mRNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(10):3723–7.

30. Donné M., Kristoffersson A.C., Berntorp E. et al. Two new candidate mutations in type IIA von Willebrand's disease (Arg834-->Gly, Gly846-->Arg) and one polymorphism (Tyr821-->Cys) in the A2 region of the von Willebrand factor. Eur J Haematol. 1993;51(1):38–44.

31. Cumming A., Grundy P., Keeney S. et al. An investigation of the von Willebrand factor genotype in UK patients diagnosed to have type 1 von Willebrand disease. Thromb Haemost. 2006;96(5):630–41.

Информация об авторах

Чернецкая Дарья Михайловна*, научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: gnomicha@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2479-2623>

Лихачева Елена Аркадьевна, кандидат медицинских наук, врач-гематолог отдела коагулопатий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: likhachyova.elena@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6098-5735>

Пшеничникова Олеся Сергеевна, старший научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: pshenichnikovaolesya@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5752-8146>

Сури́н Вадим Леонидович, старший научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: vadsurin@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1890-4492>

Золуля Надежда Ивановна, врач-гематолог, заведующая научно-консультативным отделом коагулопатий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: zozulya.n@blood.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7074-0926>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила: 04.04.2019

Принята к печати: 14.05.2019

Information about the authors

Daria M. Chernetskaya*, Researcher, Laboratory of genetic engineering, National Research Center for Hematology, e-mail: gnomicha@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2479-2623>

Elena A. Likhacheva, Cand. Sci. (Med.), Hematologist, Department of coagulopathies, National Research Center for Hematology, e-mail: likhachyova.elena@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6098-5735>

Olesya S. Pshenichnikova, Senior Researcher, Laboratory of genetic engineering, National Research Center for Hematology, e-mail: pshenichnikovaolesya@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5752-8146>

Vadim L. Surin, Senior Researcher, Laboratory of genetic engineering, National Research Center for Hematology, e-mail: vadsurin@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1890-4492>

Nadezhda I. Zozulya, Hematologist, Head of the Scientific and consulting department of coagulopathies, National Research Center for Hematology, e-mail: zozulya.n@blood.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7074-0926>

*** Corresponding author**

Received 04 Apr 2019

Accepted 14 May 2019