

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ БОЛЕЗНИ ВИЛЛЕБРАНДА ТИП 2N

Чернецкая Д. М.^{1*}, Сурин В. Л.¹, Саломашкина В. В.¹, Пшеничникова О. С.¹, Яковлева Е. В.¹, Зозуля Н. И.¹, Сударииков А. Б.¹, Лихачева Е. А.¹, Шабанова Е. С.², Перина Ф. Г.³

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, 191015, Санкт-Петербург, Россия

³ГБУЗ Свердловской области «Областная детская клиническая больница», 620149, Екатеринбург, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Болезнь Виллебранда (БВ) вызывается различными вариантами нарушения функции фактора фон Виллебранда (vWF), определяемыми патологическими изменениями в кодирующем его гене vWF. Особый интерес представляет тип 2N, характеризующийся близким к нормальному значением антигена vWF (vWF:Ag) при утрате им способности связываться с фактором VIII (FVIII) и отсутствием защиты последнего от протеолиза. За счет этого коагуляционная активность FVIII может быть низкой, что приводит к сходным фенотипическим проявлениям у больных с типом 2N БВ и гемофилией А.

Цель — выявление больных с типом 2N БВ на основании молекулярно-генетических методов.

Материалы и методы. Использованы данные из историй болезни больных БВ. Учитывали соотношение FVIII:C и vWF:AG, которое при 2N типе БВ должно быть меньше 0,7. Поиск патогенных вариаций проводили секвенированием экзонов и прилежащих к ним интронных областей гена vWF по методу Сэнгера. Поскольку наследование 2N типа БВ рецессивное, для диагноза требовалось найти два патогенных варианта.

Результаты. По данным исследования параметров гемостаза (FVIII:C/vWF:Ag < 0,7) были отобраны 3 больных, у которых предполагался диагноз «2N тип БВ». Проведен анализ показателей больного, у которого предполагался диагноз «гемофилия А», который, однако, не подтвердился при секвенировании гена F8. Во всех перечисленных случаях определение первичной структуры функционально значимых областей гена vWF позволило верифицировать диагноз БВ тип 2N. Одна больная (№ 4) была гомозиготна по патогенному варианту p.Arg854Gln (c.2561 G>A). У больной № 3 была найдена гетерозиготная замена p.Arg816Trp (c.2446 C>T), соответствующая типу 2N, и ранее не описанная инсерция c.2098_2099insG, вызывающая сдвиг рамки считывания. У больной № 1, выявленной по параметру (FVIII:C/vWF:Ag < 0,7), и у больного № 2 с изначальным диагнозом «гемофилия А» было выявлено сочетание делеции c.2435delC и замены p.Thr791Met (c.2372 C>T) в гетерозиготном состоянии. Генные варианты p.Thr791Met и p.Arg854Gln ассоциированы с типом 2N, а делеция c.2435delC приводит к дисфункциональности аллеля.

Заключение. Молекулярные методы позволили диагностировать 2N тип БВ, дифференцируя его и от других типов БВ, и от гемофилии А.

Ключевые слова: 2N тип болезни Виллебранда, ген vWF, фактор фон Виллебранда, гемофилия А, молекулярно-генетические методы, кровотечение

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках государственных заданий РК № AAAA-A18-118032290163-2 и РК № AAAA-A21-121011290080-1..

Для цитирования: Чернецкая Д.М., Сурин В.Л., Саломашкина В.В., Пшеничникова О.С., Яковлева Е.В., Зозуля Н.И., Сударииков А.Б., Лихачева Е.А., Шабанова Е.С., Перина Ф.Г. Молекулярно-генетическая верификация болезни Виллебранда тип 2N. Гематология и трансфузиология. 2022; 67(2): 172–180. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-67-2-172-180>

MOLECULAR AND GENETIC VERIFICATION OF VON WILLEBRAND DISEASE TYPE 2N

Chernetskaya D. M.^{1*}, Surin V. L.¹, Salomashkina V. V.¹, Pshenichnikova O. S.¹, Yakovleva E. V.¹, Zozulya N. I.¹, Sudarikov A. B.¹, Likhacheva E. A.¹, Shabanova E. S.², Perina F. G.³

¹National Medical Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, 191015, Saint-Petersburg, Russian Federation

³Sverdlovsk Regional Children's Clinical Hospital, 620148, Ekaterinburg, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. Von Willebrand disease (vWD) is caused by von Willebrand factor (vWF) dysfunction resulting from pathogenic variants in the vWF gene coding the vWF protein. vWD type 2N is of particular interest, as it is characterized by almost normal vWF antigen level (Ag:vWF) and vWF loss of ability to bind FVIII and protect it from premature clearance, which leads to a low FVIII coagulation activity (FVIII:C). Therefore, the same phenotype occurs in patients with 2N type of vWD and hemophilia A.

Aim — to identify patients with 2N type vWD using molecular genetic methods.

Methods. Data from the medical histories of vWD patients were used. The major parameter in consideration was FVIII:C to vWF:Ag ratio, which is expected to be below 0.7 in type 2N of vWD. Pathogenic variants in exons and exon-intron junctions of the vWF gene were identified by Sanger sequencing. Due to recessive inheritance of type 2N, verification of the 2N vWD diagnosis required the identification of two pathogenic variants.

Results. Three patients were considered as suffering from type 2N of vWD according to hemostasis parameters (FVIII:C/vWF:Ag < 0.7). One patient with a preliminary hemophilia A diagnosis was included after sequencing of the F8 gene, which showed no alterations, so 2N type of vWD was suspected. In all cases, sequencing of the relevant functional regions of the vWF gene led to verification of vWD type 2N. One woman (patient # 4) had a homozygous pathogenic variant p.Arg854Gln (c.2561 G>A) associated with type 2N vWD. One woman (patient # 3) was a compound heterozygote for the pathogenic variant p.Arg816Trp (c.2446 C>T) associated with type 2N and a newly described insertion c.2098_2099insG, that leads to a frameshift. The woman with FVIII:C/vWF:Ag < 0.7 (patient # 1) and the patient # 2 with preliminary hemophilia A diagnosis were both compound heterozygotes for the same combination of pathogenic variants — c.2435delC and p.Thr791Met (c.2372 C>T). Pathogenic variant p.Thr791Met is associated with type 2N, while the deletion c.2435delC should lead to allele disabling.

Conclusion. Molecular methods allow more precise differentiation of type 2N from other types of vWD and hemophilia A.

Keywords: von Willebrand disease type 2N, vWF gene, von Willebrand factor, hemophilia A, molecular methods, bleeding

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

Financial disclosure: the study was carried out within the framework of the state tasks PKN[®]AAAA-A18-118032290163-2 and PKN[®]AAAA-A21-121011290080-1.

For citation: Chernetskaya D.M., Surin V.L., Salomashkina V.V., Pshenichnikova O.S., Yakovleva E.V., Zozulya N.I., Sudarikov A.B., Likhacheva E.A., Shabanova E.S., Perina F.G. Molecular and genetic verification of von Willebrand disease type 2N. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2022; 67(2): 172–180 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-67-2-172-180>

Введение

Болезнь Виллебранда (БВ) названа именем финского врача Эрика Адольфа фон Виллебранда, который впервые описал ее в 1926 г., выделив среди других случаев врожденных геморрагических диатезов и гемофилии [1]. От гемофилии, по его описанию, это наслед-

ственное заболевание отличалось тем, что подвержены ему были и женщины, и мужчины, а также тем, что оно не было ассоциировано с кровоизлияниями в мышцы и суставы, а проявлялось носовыми кровотечениями, а также спонтанными желудочно-кишечными крово-

течениями, меноррагиями, а также неконтролируемыми кровотечениями при травмах [1]. Заболевание наследуется аутосомно (есть доминантные и рецессивные формы) и обусловлено изменениями в гене *vWF* [2], кодирующем фактор фон Виллебранда (von Willebrand Factor, *vWF*) — мультимерный гликопротеин, имеющий две основные функции: связывание с поверхностью тромбоцитов и с субэндотелиальной соединительной тканью с образованием мостиков между тромбоцитами и поврежденными участками сосудов; и связывание с фактором свертывания VIII (FVIII), препятствуя деградации последнего [3]. БВ делится на типы: 1-й тип, обусловленный уменьшением количества *vWF*, 3-й тип, обусловленный отсутствием *vWF*, и 2-й тип, обусловленный изменением структуры *vWF*. В свою очередь, 2-й тип делится на подтипы А, В, М и N [4]. Тип 2N называют «нормандским» в честь региона Франции, где был выявлен первый больной с этим диагнозом. Он характеризуется нарушением связи *vWF* с FVIII [4] и дифференцируется от других типов БВ на основании соотношения FVIII:C/*vWF*:Ag меньше 0,7 [5]. В то же время отличие типа 2N БВ от гемофилии А не всегда бывает очевидным [2]. Однозначный ответ на вопрос, есть ли у больного 2N тип БВ, дает прямой анализ на способность *vWF* связываться с FVIII [5]. Для этого анализа производятся коммерческие наборы [6], однако они применяются редко [5]. Необходимость различать 2N тип БВ, БВ других типов и гемофилию А продиктована различными подходами к их лечению.

Первая линия лечения БВ — это терапия десмопрессинном (DDAVP, аналог вазопрессино), он используется как при легкой форме гемофилии А, так и при легком течении БВ [5]. Такое лечение может быть как эффективным, так и неэффективным. Эффективность при типе 2N зависит от генных изменений, вызвавших болезнь [7, 8]. В России десмопрессин не используется, а основным методом лечения БВ является заместительная терапия [9]. Ее же используют и за рубежом при неэффективности лечения десмопрессинном [5]. В случае БВ, включая тип 2N, важно, чтобы используемый препарат содержал одновременно *vWF* и FVIII, причем концентрация FVIII не должна превышать концентрацию *vWF*, т.к. создание избыточной активности FVIII в крови больных БВ в сравнении с активностью *vWF* может привести к развитию тромбозов [10].

БВ вызывается патологическими изменениями в гене *vWF*, а гемофилия А — изменениями в гене *F8*. Однако имеются больные, у которых присутствуют изменения в обоих генах [5]. Ген *vWF* находится в области короткого плеча 12-й хромосомы (12p13.31), его длина около 178 тпн, и он состоит из 52 экзонов [11]. Существует частичная копия этого гена — непроцессированный псевдоген на длинном плече 22-й хромо-

сомы (22q11–13), включающий экзоны 23–34 и имеющий гомологию с геном 97% [12]. Тип 2N наследуется рецессивно, т.е. вызывается либо патогенными вариантами в гомозиготном состоянии, либо двумя гетерозиготными вариантами, расположенными на разных аллелях (компаунд). В случае компаундного генотипа оба патогенных варианта могут быть ассоциированы с типом 2N, т.е. нарушать структуру сайта связывания с FVIII, либо один из вариантов может быть ассоциирован с 2N типом, а второй (на другом аллеле) — выводить из строя аллель целиком (нонсенс-мутация, делеция, инсерция, мутации зоны сплайсинга) — «нулевая мутация» [13]. *vWF* имеет доменную структуру. За связь с FVIII отвечают домены D' и D3, которые, в свою очередь, делятся на субдомены TIL'-E'-VWD3-C8_3-TIL3-E3 и кодируются экзонами 18–28 [14, 15] (рис. 1). D' домен непосредственно контактирует с FVIII, но домен D3 тоже играет в этой связи определенную роль [5]. Теоретически можно предположить, что патогенные варианты, вызывающие БВ типа 2N, должны располагаться в экзонах 18–28. Патогенные варианты у больных, у которых диагностирован 2N тип, локализованы в экзонах 17–21, 24, 25, 27 [3]. Если соотнести экзоны с доменами, то окажется, что экзон 17 находится за пределами доменов D'D3, но патогенные варианты в нем все равно могут вызывать тип 2N [3]. Экзоны же 22, 23, 26 и начало 28-го попадают в домен D3, но в них неизвестны варианты, ассоциированные с 2N.

Целью настоящей работы было выявление больных с типом 2N БВ на основании молекулярно-генетических методов.

Материалы и методы

В работу включены 4 больных, для каждого из которых были получены образцы крови и анамнестические данные: двое больных из ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (Москва) и по одному больному — из ГАУЗ СО Центр детской онкологии и гематологии (Екатеринбург) и ФГБОУ ВО «СЗГМУ им И.И. Мечникова» Минздрава России (Санкт-Петербург).

Кровь больных была направлена в лабораторию генной инженерии для проведения генетического исследования после того, как лечащим врачом на основании наличия в анамнезе кровотечений, характерных для БВ, и данных коагулологических тестов был установлен диагноз БВ. Для больных, у которых были определены *vWF*:Ag и FVIII:C, рассчитывали соотношение FVIII:C/*vWF*:Ag. В исследование включали только больных с соотношением FVIII:C/*vWF*:Ag менее 0,7. Было выявлено двое таких больных (№ 1, № 3).

Кровь больного № 2 была направлена в лабораторию для подтверждения диагноза «гемофилия А»,

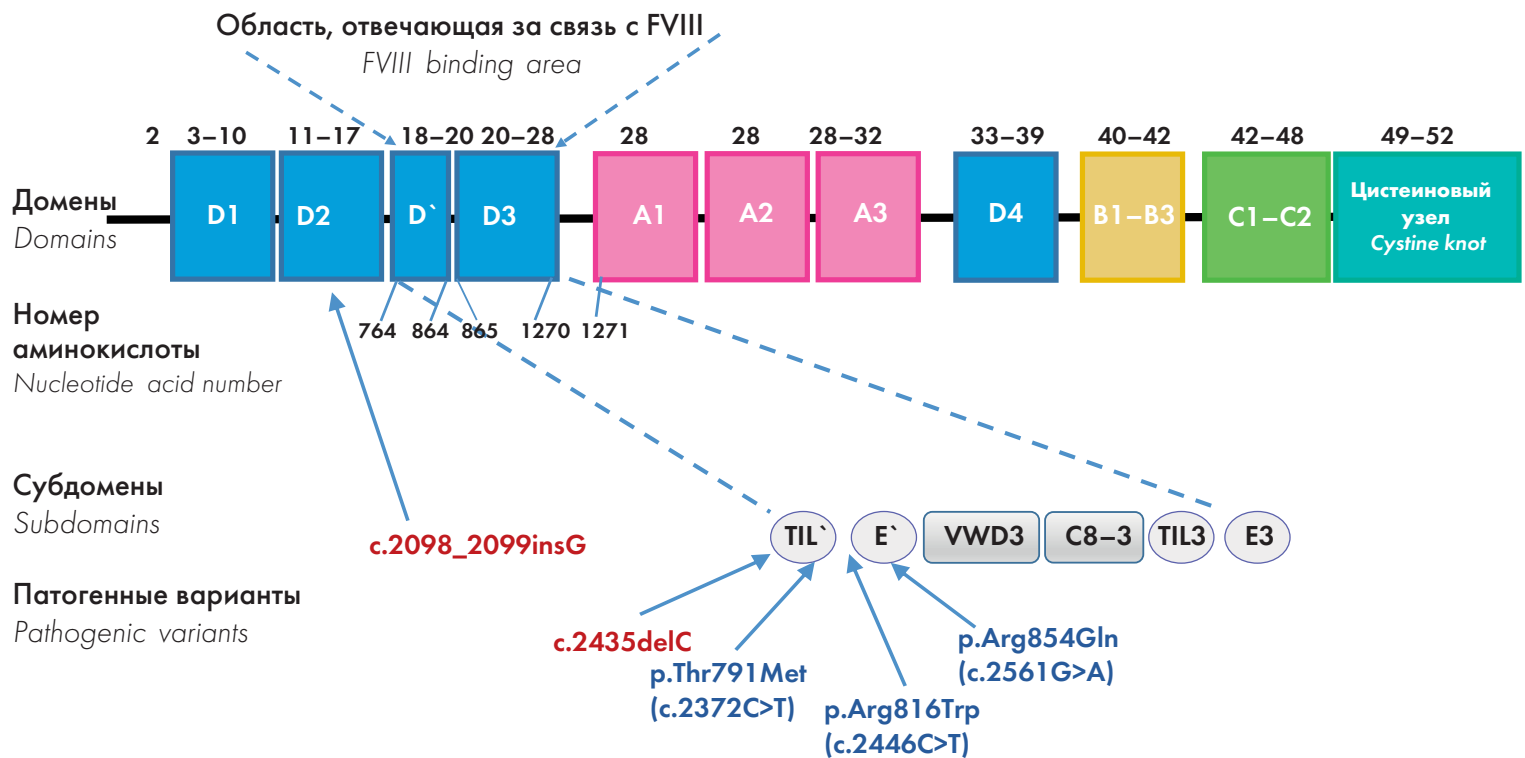


Рисунок 1. Доменная структура vWF [3, 15]. Расположение найденных патогенных вариантов обозначено на схеме гена. Красным цветом выделены варианты, связанные со сдвигом рамки считывания и дисфункциональностью аллеля. Синим цветом обозначены замены, вызывающие тип 2N

Figure 1. Domain structure of vWF [3, 15]. Location of the pathogenic variants found is shown on gene map. Red color marks frameshifts leading to allele dysfunction. Blue color marks pathogenic variants causing 2N type

который был установлен на основании анамнестических данных о тяжелых кровотечениях в сочетании со сниженной плазменной активностью FVIII:C, однако по результатам исследования гена *F8* у него не было выявлено патогенных вариантов. Результаты исследования соотношения FVIII:C/vWF:Ag у этого больного были получены уже после получения данных молекулярно-генетического анализа гена *vWF* и оказались меньше 0,7.

У больной № 4 проводили дифференциальный диагноз между типом 2N БВ и носительством гемофилии А. У этой больной были исследованы FVIII:C и vWF:Ag, соотношение FVIII:C/vWF:Ag составило < 0,7, поэтому образцы ее крови были направлены на исследование.

Концентрация в плазме vWF:Ag была измерена иммунотурбидиметрическим методом. Активность в плазме фактора VIII (FVIII:C) была измерена клоттинговым методом, ристоцетин кофакторную активность (vWF:RC₀) измеряли агрегационным методом, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) — клоттинговым методом (табл. 2).

Методы экстракции ДНК, полимеразной цепной реакции (ПЦР), очистки продуктов ПЦР, секвенирования и анализа полученных нуклеотидных последовательностей описаны ранее [16].

Для постановки молекулярно-генетического диагноза были проанализированы следующие экзоны гена

vWF: 17–21, 24, 25, 27, 28. Праймерные системы для амплификации вышеперечисленных экзонов представлены в таблице 1. Позиции праймеров и номенклатура патогенных вариантов указаны согласно референсной последовательности NCBI NG_009072. Температура отжига для всех пар праймеров была 62 °С.

Поскольку наследование типа 2N рецессивное, то диагноз считали подтвержденным при наличии двух патогенных вариантов. В случае, если в указанных экзонах обнаруживали два патогенных варианта, соответствующих типу 2N, поиск завершали. Если в указанных экзонах находили только один вариант, соответствующий типу 2N, то проводили поиск по остальным экзонам гена *vWF*, чтобы найти нарушение, целиком прекращающее работу второго аллеля. Пары праймеров для экзонов, где были обнаружены изменения, приведены в таблице 1. Праймерные системы, разработанные в лаборатории генной инженерии, позволяют исключить параллельную амплификацию соответствующих фрагментов псевдогена. Патогенность новой мутации была определена согласно классификатору American College of Medical Genetics (ACMG) [17].

Результаты

У всех включенных в исследование больных диагноз тип «2N БВ» был подтвержден молекулярно-генетическими методами. У каждого больного найдено два

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

Номер экзона Exon number	Система праймеров от 5' к 3' Primer set from 3' to 5'	Позиция в гене <i>vWF</i> (NG_009072) Position in <i>vWF</i> gene (NG_009072)	Размер фрагмента, пн Fragment length, bp
16	ACC ACA GTC CTT GCT GTC CA	71829–71848	340
	GCC CCA GTT TAC CCA TCC AT	72228–72209	
17	AAC GTT AGC AAG CTG TGC TTC A	77711–77732	339
	ACG CAC ATC TGA CGG TGT CA	78049–78030	
18	GAT GCC CTC CCA GTC CCA CA	80045–80064	400
	CTC ACT CAT CCC TGC CTA CA	80444–80425	
19	GCT GGA GGA GGG CTT TAG AT	88117–88136	259
	TGG AGG CAA GTG CGG AAG GT	88375–88356	
20	GTG TTC CTT CAT TGC CTC CAT	89760–89780	310
	CAG ATC CAC AGA ACC CAA CCT	90069–90049	
21	GAT CCT GTG ACA CGT ACT CA	92985–93004	379
	TAG CTC TGC CTC ATC CTC TT	93363–93344	
23–24	GGA ATG TTC CCC TTT CCC CT	98547–98566	614
	CAC TCT GTG TCC ATA CCA CCA	99160–99140	
25	CCA GAC TAA GAG CCA GAG TTC C	100817–100838	354
	CAT CCA GTC CCT ACT AAC ACT	101170–101150	
26–27	CCA ACA TTA TCT CCA GAT GGC	101674–101694	1180
	TTA CCC AAA ACC TAG TCT CTA A	102853–102832	
28	CAG AAG TGT CCA CAG GTT CT	104871–104890	1510
	GCA GAT GCA TGT AGC ACC AA	106380–106361	

Таблица 2. Данные истории болезни больных (в скобках — референсные значения)
Table 2. Patient's medical history data (in parenthesis — normal range)

Номер больного Patient No.	Возраст, годы Age, years	Пол Sex	<i>vWF</i> : Ag, % (40–150)	FVIII: C, % (50–150)	FVIII: C/ VWF: Ag	<i>vWF</i> : RCo, % (40–150)	АЧТВ, с APTT, s (29–38)	Предполагаемый диагноз Assumed diagnosis
1	50	Ж/Ф	27,5	13	0,47	109	61	БВ/ <i>vWD</i>
2	53	М	68,9	5,9	0,09	63	94	ГА/HA
3	16	Ж/Ф	58,2	5,6	0,1	нд/ <i>nd</i>	58,2	БВ/ <i>vWD</i>
4	37	Ж/Ф	79	34,8	0,44	73,6	1,2**	2N/ГА*/2N/HA*

Примечания: АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время, ГА — гемофилия А, БВ — болезнь Виллебранда, * — носитель, нд — нет данных, Ж — женщина, М — мужчина
Note: APPT — activated partial thromboplastin time, HA — Hemophilia A, *vWD* — von Willebrand disease, * — carrier, *nd* — no data, F — female, M — male

патогенных варианта гена *vWF*, и хотя бы один из них локализован в области, отвечающей за связь с FVIII (табл. 3).

У двух больных (№ 1 и № 2) найден один и тот же набор патогенных вариантов в гетерозиготном состоянии в субдомене TIL домена D': с.2435delC и с.2372 C>T Thr791Met. Это компаундное сочетание замены Thr791Met, ассоциированной с БВ типа 2N, и делеции с.2435delC, приводящей к отсутствию функционального фактора [18]. Исходно в одном случае была диагностирована БВ, в другом — гемофилия А.

У больной № 3 выявлена замена p.Arg816Trp в сочетании с неописанной ранее инсерцией

с.2098_2099insG. Обе вариации представлены в гетерозиготном состоянии и локализованы в субдомене TIL домена D'. Новый вариант с.2098_2099insG соответствует критериям патогенного варианта ACMG (PVS:1, PS:1, PM:1).

У больной № 4 обнаружена замена p.Arg854Gln в гомозиготном состоянии в субдомене E' домена D'.

Обсуждение

Данные по двум (№ 1 и № 2) из 4 больных, включенных в исследование, были частично опубликованы ранее [16]. Изменения в гене, выявленные у этих больных, одинаковы, но тяжесть заболевания различна. Значение

Таблица 3. Генетические характеристики больных БВ типа 2N
Table 3. Genetic characteristics of vWD 2N patients

Номер больного Patient No.	Патогенный вариант Pathogenic variant	Описание Reference	Экзон Exon	Домен Domain	Тип БВ VWD type
1	c.2435delC	[18]	18	D ⁻ , субдомен TIL ⁻ D ⁻ , subdomain TIL ⁻	3 (потеря функциональности гена) 3 (total loss of function)
	p.Thr791Met c.2372 C>T	[19]	18	D ⁻ , субдомен TIL ⁻ D ⁻ , subdomain TIL ⁻	2N
2	c.2435delC	[18]	18	D ⁻ , субдомен TIL ⁻ D ⁻ , subdomain TIL ⁻	3 (потеря функциональности гена) 3 (total loss of function)
	p.Thr791Met c.2372 C>T	[19]	18	D ⁻ , субдомен TIL ⁻ D ⁻ , subdomain TIL ⁻	2N
3	p.Arg816Trp c.2446 C>T	[20]	19	D ⁻ , субдомен IL ⁻ D ⁻ , subdomain TIL ⁻	2N тяжелый 2N severe
	c.2098_2099insG	Новая / New	16	D2	
4	p.Arg854Gln c.2561 G>A	[21]	20	D ⁻ , субдомен E ⁻ D ⁻ , subdomain E ⁻	2N легкий 2N mild
	p.Arg854Gln c.2561 G>A				

FVIII:C для больного № 2 составило 5,9%, а наблюдаемая клиническая картина соответствовала течению гемофилии А. У больного были гемофилические артропатии всех крупных суставов в результате кровоизлияний, что характерно для тяжелого течения гемофилии А, но при этом в анамнезе были также десневые, носовые и желудочно-кишечные кровотечения, более характерные для БВ. Кровь больного была направлена в лабораторию для верификации диагноза «гемофилия А», но в гене *F8* патогенных изменений найдено не было, поэтому был проанализирован ген *vWF*. Пример этого больного подтверждает важность использования молекулярных методов для дифференциального диагноза между 2N типа БВ и гемофилией А.

У больной № 1 была диагностирована БВ, но не уточнен тип заболевания. У нее наблюдались симптомы, типичные для БВ: меноррагии, десневые кровотечения, кровотечения из лунок после удаления зубов и гематома после аппендэктомии.

Генетический анализ больной № 4 был проведен для дифференциальной диагностики между 2N БВ и носительством гемофилии А с целью планирования семьи. Молекулярный анализ позволил определить выявленную у нее замену p.Arg854Gln в гомозиготном состоянии как патогенный вариант, обуславливающую развитие типа 2N БВ.

Кровь больной № 3 была направлена в лабораторию в связи с диагнозом БВ у больной, однако тип БВ не был установлен. Значение vWF:Ag, составившее 58,2%, было в пределах нормы, при этом определялась низкая активность FVIII:C, оставлявшая 5,6%, что было характерно для типа 2N БВ. Выявленная у нее замена p.Arg816Trp описана как вызывающая тип 2N, но в гетерозиготном состоянии ее недостаточно для появления симптомов. У этой больной найден второй патогенный вариант в гетерозиготном состоянии — c.2098_2099insG. Эта

инсерция не описана ранее в литературе, однако ее патогенность очевидна (frameshift-мутация в середине гена — это «нулевая мутация»). Сочетание «нулевой мутации» с патогенным вариантом типа 2N, а также лабораторные данные позволяют заключить, что у больной именно 2N тип БВ.

Результаты коагулологического анализа (табл. 2) характерны для больных с типом 2N БВ [5], но для больных № 2, № 3, № 4 эти данные также можно было бы интерпретировать как гемофилию А или ее носительство: АЧТВ удлинено, vWF:Ag, vWF:Co в пределах нормы, активность FVIII:C снижена. Больные № 1, 3, 4 — женщины. Возможно, что представления о гемофилии А как болезни, свойственной только для мужчин, а БВ как болезни, не привязанной к полу, позволили в их случае верно определить диагноз как БВ, в то время как для больного № 2, учитывая мужской пол, по умолчанию предположили гемофилию А.

Выявленные замены p.Thr791Met, p.Arg816Trp и p.Arg854Gln являются наиболее частыми среди патогенных изменений, вызывающих тип 2N [13]. Для них известен механизм патогенного эффекта, обуславливающего развитие типа 2N [14]. Данные замены находятся в домене D⁻, ответственном за связь с FVIII (рис. 1). Замены p.Thr791Met и p.Arg816Trp расположены в субдоме TIL⁻ в области, формирующей положительный заряд этого субдомена. Положительный заряд необходим для связи с а3 доменом FVIII, который является главным из двух сайтов, обеспечивающих связь между vWF и FVIII [14]. Моделирование показывает, что эти замены ведут к потере положительного заряда в предполагаемом регионе связывания домена а3 FVIII [14]. Замена p.Arg854Gln локализована в субдоме E⁻ и тоже ведет к потере положительного заряда, однако точный механизм ее влияния остается неясным. Эта замена встречается очень часто среди

европеоидов [3]. Известна реакция на лечение десмопрессином больных, имеющих найденные в настоящей работе варианты. Для больных с заменой p.Arg854Gln оно эффективно [7], это частый патогенный вариант, и нарушения, вызываемые им, сравнительно легкие. При заменах p.Arg816Trp, p.Thr791Met лечение десмопрессином неэффективно [7, 8].

Литература

1. Berntorp E. Erik von Willebrand. Thromb Res. 2007; 120(1): S3–4. DOI: 10.1016/j.thromres.2007.03.010.
2. Leebeek F.W.G., Eikenboom J.C.J. Von Willebrand's disease. N Engl J Med. 2016; 375(21): 2067–80. DOI: 10.1056/NEJMra1601561.
3. Goodeve A.C. The genetic bases of von Willebrand disease. Blood Rev. 2010; 24(3): 123–34. DOI: 10.1016/j.blre.2010.03.003.
4. 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. Thromb Haemost. 1994; 71(4): 520–5.
5. Seidizadeh O., Peyvandi F., Mannucci P.M. Von Willebrand disease type 2N: An update. Thromb Haemost. 2021; 19(4): 909–916. DOI: 10.1111/jth.15247.
6. Veyradier A., Caron C., Ternisien C., et al. Validation of the first commercial ELISA for type 2N von Willebrand's disease diagnosis. Haemophilia. 2011; 17(6): 944–51. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2011.02499.x.
7. Federici A.B., Mazurier C., Berntorp E., et al. Biologic response to desmopressin in patients with severe type 1 and type 2 von Willebrand disease: Results of a multicenter European study. Blood. 2004; 103(6): 2032–8. DOI: 10.1182/blood-2003-06-2072.
8. Mazurier C., Goudemand J., Hilbert L., et al. Type 2N von Willebrand disease: Clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. Best Pract Res Clin Haematol. 2001; 14(2): 337–47. DOI: 10.1053/beha.2001.0138.
9. Абрамова А.В., Абдуллаев А.О., Азимова М.Х. и др. Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний систем крови. Т. 1. Под ред. В.Г. Савченко. М.: Практика; 2018; 359–75.
10. Лихачева Е.А., Полянская Т.Ю., Зоренко В.Ю. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Виллебранда. М.: Национальное гематологическое общество; 2014.
11. 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. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)47144-5.
12. 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.
13. Goodeve A. Diagnosing von Willebrand disease: Genetic analysis. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2016; 2016(1): 678–82. DOI: 10.1182/asheducation-2016.1.678.
14. Shiltagh N., Kirkpatrick J., Cabrita L.D., et al. Solution structure of the major factor VIII binding region on von Willebrand factor. Blood. 2014; 123(26): 4143–51. DOI: 10.1182/blood-2013-07-517086.
15. Zhou Y.F., Eng E.T., Zhu J., et al. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. Blood. 2012; 120(2): 449–58. DOI: 10.1182/blood-2012-01-405134.
16. Чернецкая Д.М., Лихачева Е.А., Пшеничникова О.С. и др. Болезнь Виллебранда: сопоставление клинических, коагулологических и молекулярно-

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что молекулярно-генетический анализ, основанный на определении мутаций в гене *vWF*, дает возможность эффективно отличать БВ 2N типа не только от других типов этого заболевания, с чем вполне успешно справляются коагулологические тесты, но и от гемофилии А, что не всегда удастся сделать с их помощью [5].

References

1. Berntorp E. Erik von Willebrand. Thromb Res. 2007; 120(1): S3–4. DOI: 10.1016/j.thromres.2007.03.010.
2. Leebeek F.W.G., Eikenboom J.C.J. Von Willebrand's disease. N Engl J Med. 2016; 375(21): 2067–80. DOI: 10.1056/NEJMra1601561.
3. Goodeve A.C. The genetic bases of von Willebrand disease. Blood Rev. 2010; 24(3): 123–34. DOI: 10.1016/j.blre.2010.03.003.
4. 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. Thromb Haemost. 1994; 71(4): 520–5.
5. Seidizadeh O., Peyvandi F., Mannucci P.M. Von Willebrand disease type 2N: An update. Thromb Haemost. 2021; 19(4): 909–916. DOI: 10.1111/jth.15247.
6. Veyradier A., Caron C., Ternisien C., et al. Validation of the first commercial ELISA for type 2N von Willebrand's disease diagnosis. Haemophilia. 2011; 17(6): 944–51. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2011.02499.x.
7. Federici A.B., Mazurier C., Berntorp E., et al. Biologic response to desmopressin in patients with severe type 1 and type 2 von Willebrand disease: Results of a multicenter European study. Blood. 2004; 103(6): 2032–8. DOI: 10.1182/blood-2003-06-2072.
8. Mazurier C., Goudemand J., Hilbert L., et al. Type 2N von Willebrand disease: Clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. Best Pract Res Clin Haematol. 2001; 14(2): 337–47. DOI: 10.1053/beha.2001.0138.
9. Abramova A.V., Abdullaev A.O., Azimova M.Kh., et al. Diagnostic algorithms and curing protocols of blood system diseases. Vol. 1. Ed. Savchenko V.G. Moscow: Praktika; 2018; 359–75. (In Russian).
10. Likhacheva E.A., Polyanskaya T.Yu., Zorenko V.Yu., et al. Clinical recommendations for von Willebrand disease diagnosis and treatment. Ed. Savchenko V.G. Moscow: National Hematological Society; 2014. (In Russian).
11. 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. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)47144-5.
12. 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.
13. Goodeve A. Diagnosing von Willebrand disease: Genetic analysis. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2016; 2016(1): 678–82. DOI: 10.1182/asheducation-2016.1.678.
14. Shiltagh N., Kirkpatrick J., Cabrita L.D., et al. Solution structure of the major factor VIII binding region on von Willebrand factor. Blood. 2014; 123(26): 4143–51. DOI: 10.1182/blood-2013-07-517086.
15. Zhou Y.F., Eng E.T., Zhu J., et al. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. Blood. 2012; 120(2): 449–58. DOI: 10.1182/blood-2012-01-405134.
16. Chernetskaya D.M., Likhacheva E.A., Pshenichnikova O.S., et al. Von Willebrand disease: Clinical, coagulological, molecular and genetic data comparison.

генетических данных. Гематология и трансфузиология. 2019; 64(3): 246–55. DOI: 10.35754/0234-5730-2019-64-3-246-255.

17. Richards S., Aziz N., Bale S., et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015; 17(5): 405–23. DOI: 10.1038/gim.2015.30.

18. 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. DOI: 10.1093/hmg/1.9.767

19. Gaucher C., Jorieux S., Mercier B., Mazurier C. The “Normandy” variant of von Willebrand disease: Characterization of a point mutation in the von Willebrand factor gene. *Blood.* 1991; 77(9): 1937–41.

20. Mazurier C., Gaucher C., Jorieux S., et al. Evidence for a von Willebrand factor defect in factor VIII binding in three members of a family previously misdiagnosed mild haemophilia A and haemophilia A carriers: Consequences for therapy and genetic counselling. *Br J Haematol.* 1990; 76(3): 372–9. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1990.tb06371.x.

21. Montgomery R.R., Hathaway W.E., Johnson J., et al. A variant of von Willebrand’s disease with abnormal expression of factor VIII procoagulant activity. *Blood.* 1982; 60(1): 201–7.

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>

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>

Саломашкина Валентина Валерьевна, ведущий специалист лаборатории генной инженерии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: prodoljenie-banketa@yandex.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5669-3948>

Пшеничникова Олеся Сергеевна, кандидат биологических наук, 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>

Яковлева Елена Владимировна, кандидат медицинских наук, гематолог отдела коагулопатий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: hemophilia2012@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6991-7437>

Gematologiya i Transfusiologiya. 2019; 64(3): 246–55. DOI: 10.35754/0234-5730-2019-64-3-246-255. (In Russian).

17. Richards S., Aziz N., Bale S., et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015; 17(5): 405–23. DOI: 10.1038/gim.2015.30.

18. 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. DOI: 10.1093/hmg/1.9.767

19. Gaucher C., Jorieux S., Mercier B., Mazurier C. The “Normandy” variant of von Willebrand disease: Characterization of a point mutation in the von Willebrand factor gene. *Blood.* 1991; 77(9): 1937–41.

20. Mazurier C., Gaucher C., Jorieux S., et al. Evidence for a von Willebrand factor defect in factor VIII binding in three members of a family previously misdiagnosed mild haemophilia A and haemophilia A carriers: Consequences for therapy and genetic counselling. *Br J Haematol.* 1990; 76(3): 372–9. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1990.tb06371.x.

21. Montgomery R.R., Hathaway W.E., Johnson J., et al. A variant of von Willebrand’s disease with abnormal expression of factor VIII procoagulant activity. *Blood.* 1982; 60(1): 201–7.

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>

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

Valentina V. Salomashkina, Researcher, Laboratory of Genetic Engineering, National Medical Research Center for Hematology, e-mail: prodoljenie-banketa@yandex.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5669-3948>

Olesya S. Pshenichnikova, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Genetic Engineering, National Medical Research Center for Hematology, e-mail: pshenichnikovaolesya@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5752-8146>

Elena V. Yakovleva, Cand. Sci. (Med.), Hematologist, Department of Coagulopathies, National Medical Research Center for Hematology, e-mail: hemophilia2012@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6991-7437>

Зозуля Надежда Ивановна, доктор медицинских наук, 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>

Судариков Андрей Борисович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной гематологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: dusha@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>

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>

Шабанова Елена Сергеевна, генетик, ассистент кафедры медицинской генетики, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: le_shaja@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8701-2754>

Перина Фарида Галимовна, гематолог, ГАУЗ Свердловской области «Областная детская клиническая больница», Центр детской онкологии и гематологии,
e-mail: perinafg@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3531-1664>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила: 27.10.2021

Принята в печать: 16.02.2022

Nadezhda I. Zozulya, Dr. Sci. (Med.), Hematologist, Head of the Department of Coagulopathy, National Medical Research Center for Hematology,
e-mail: zozulya.n@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7074-0926>

Andrey B. Sudarikov, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology,
e-mail: dusha@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>

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

Elena S. Shabanova, Geneticist, Assistant of Department of Medical Genetics, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
e-mail: le_shaja@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8701-2754>

Farida G. Perina, Hematologist, Sverdlovsk Regional Children's Clinical Hospital,
e-mail: perinafg@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3531-1664>

*** Corresponding author**

Received 27.10.2021

Accepted 16.02.2022