

Мультимерный анализ фактора Виллебранда: новые диагностические возможности

А.В. Полетаев¹, Е.А. Серёгина^{1,2}, А.В. Пшонкин¹, Н.А. Карамян¹,
Д.В. Фёдорова¹, С.А. Плясунова¹, П.А. Жарков¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117198, Москва, ул. Саморы Машела, 1;

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук»; Россия, 109029, Москва, ул. Средняя Калитниковская, 30

Контактные данные: Александр Владимирович Полетаев poletaev_alexandr@mail.ru

Актуальность. Мультимерный анализ (МА) является важнейшим инструментом в диагностике болезни Виллебранда (БВ). Существующие методики МА являются сложными, не стандартизованными, занимают много времени.

Цель исследования – оценить диагностические возможности автоматизированного метода МА фактора фон Виллебранда (vWF).

Материалы и методы. Исследованы образцы плазмы здоровых добровольцев, а также пациентов с установленным типом БВ и приобретенным синдромом Виллебранда (СВ). Для постановки типа БВ выполнялись следующие лабораторные тесты: антиген vWF; ристоцетин-кофакторная активность vWF; коллаген-связывающая активность vWF; тест ристоцетин-индуцированной агрегации тромбоцитов; активность фактора VIII, фактор VIII-связывающая и коллаген-связывающая способности vWF. МА проводился с использованием набора HYDRAGEL 5 von Willebrand Multimers на автоматическом анализаторе Hydrasys 2.

Интерпретация распределения мультимеров vWF в геле проводилась визуально: выявлялись высокомолекулярные, промежуточные и низкомолекулярные формы.

Результаты. У здоровых добровольцев было выявлено 9–12 протомеров с нормальным распределением, аналогичным контролям. У пациентов с 1-м типом БВ наблюдалось относительное уменьшение интенсивности мультимерных полос с сохранением их нормального распределения. У пациентов с 3-м типом БВ отмечалось полное отсутствие мультимерного сигнала на геле. У пациентов с 2А типом отсутствовали высоко- и среднемолекулярные мультимеры; у пациентов с 2М и 2N типами БВ на фоне измененных функциональных свойств vWF распределение мультимеров соответствовало нормальному. У большинства пациентов с СВ не выявлено нарушения распределения мультимеров, однако у части больных наблюдались изменения в виде некоторого снижения больших мультимерных форм в фореграмме.

Выводы. МА позволил визуализировать различные типы БВ, метод удобен в применении и может быть использован для определения подтипа болезни. Однако только полная панель тестов позволит с высокой точностью типировать БВ.

Ключевые слова: болезнь Виллебранда, синдром Виллебранда, фактор, диагностика, мультимерный анализ, электрофорез

Для цитирования: Полетаев А.В., Серёгина Е.А., Пшонкин А.В., Карамян Н.А., Фёдорова Д.В., Плясунова С.А., Жарков П.А. Мультимерный анализ фактора Виллебранда: новые диагностические возможности. Российский журнал детской гематологии и онкологии 2021;8(2):35–41.

Von Willebrand factor multimeric assay: novel diagnostics capabilities

A.V. Poletaev¹, E.A. Seregina^{1,2}, A.V. Pshonkin¹, N.A. Karamyanyan¹, D.V. Fedorova¹, S.A. Plyasunova¹, P.A. Zharkov¹

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow, 117198, Russia; ²Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences; 30 Srednyaya Kalitnikovskaya St., Moscow, 109029, Russia

Introduction. Distinguishing between Von Willebrand disease (vWD) types often requires multimer gel analysis. The current techniques for vWF multimer structure are manual, complicated, non-standardized and time consuming. **The aim of this study** was to evaluate diagnostic capabilities of new automated vWF multimer screening assay.

Materials and methods. Children with vWD, acquired von Willebrand Syndrome (aVWS) and 8 healthy donors as a control group were enrolled in this study. Von Willebrand factor antigen (vWF Ag); ristocetin cofactor activity (VWF:Rco); vWF collagen binding (VWF:CB); ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA); factor VIII clotting activity (FVIII:C) and vWF factor VIII binding activity (vWF:FVIIIb) were performed to evaluate vWD. Multimer analysis was carried out using the commercial HYDRAGEL 5 von Willebrand Multimers kit on semi-automatic gel electrophoresis instrument HYDRASYS (SEBIA).

Results. The samples from control group had 9–12 bands of vWF multimers with the same distribution as control plasma. Patients with type I vWD had the proportional decrease in the intensity of the bands with preservation of the normal distribution of the band. Patients with type III vWD reveal the complete absence of the multimer bands on the gel. Multimer analysis in type IIA shows the absence of high molecular weight multimer bands. In other patients the distribution of vWF multimers was normal against the changes in functional properties of vWF (types IIM, N). Most of the children with aVWS also revealed normal distribution of vWF multimers, however, in some patients, the slight decrease in large multimeric forms was observed visually on the gel.

Conclusion. *Multimer analysis allows to visualize the multimer distribution in various types of von Willebrand disease. The method is easy to perform and can be useful for distinguishing between the subtypes of vWD. But only the full test panel including genetic tests would allow the differentiation of vWD types with high precision.*

Key words: *von Willebrand disease, Willebrand syndrome, factor, diagnosis, multimeric assay, electrophoresis*

For citation: *Poletaev A.V., Seregina E.A., Pshonkin A.V., Karamyan N.A., Fedorova D.V., Plyasunova S.A., Zharkov P.A. Von Willebrand factor multimeric assay: novel diagnostics capabilities. Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology 2021;8(2):35–41.*

Информация об авторах

А.В. Поletaев: заведующий лабораторией клинического гемостаза НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, e-mail: poletaev_alexandr@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5209-2099>, Web of Science ResearcherID: AAW-9954-2020

Е.А. Серёгина: научный сотрудник лаборатории клинического гемостаза НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, стажер-исследователь Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии, e-mail: elsereg@inbox.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7534-3863>, Web of Science ResearcherID: A-7499-2014

А.В. Пшонкин: к.м.н., заведующий стационаром кратковременного лечения НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, e-mail: Alexey.Pshonkin@fccho-moscow.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2057-2036>, SPIN-код: 6270-4864

Н.А. Карамян: к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, e-mail: natalia.karamyan@fccho-moscow.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9865-527X>

Д.В. Фёдорова: к.м.н., врач-педиатр, врач-гематолог консультативного отделения, младший научный сотрудник группы исследования гемостаза НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, e-mail: darya.v.fedorova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-4567-1871>

С.А. Плясунова: к.м.н., заведующая клинико-диагностической лабораторией НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, e-mail: Svetlana.Plyasunova@fccho-moscow.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4503-0735>

П.А. Жарков: д.м.н., врач-педиатр, врач-гематолог консультативного отделения, руководитель группы исследования гемостаза НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, e-mail: pavel.zharkov@fccho-moscow.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4384-6754>, Web of Science ResearcherID: AAP-9203-2020

Information about the authors

A.V. Poletaev: Head of the Laboratory of Clinical Hemostasis Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia, e-mail: poletaev_alexandr@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-5209-2099, Web of Science ResearcherID: AAW-9954-2020

E.A. Seregina: Research Associate Laboratory of Clinical Hemostasis of Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia, Research Assistant Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences, e-mail: elsereg@inbox.ru; https://orcid.org/0000-0002-7534-3863, Web of Science ResearcherID: A-7499-2014

A.V. Pshonkin: Cand. of Sci. (Med.), Head of the Hospital for Short-Term Treatment at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia, e-mail: Alexey.Pshonkin@fccho-moscow.ru; https://orcid.org/0000-0002-2057-2036, SPIN-code: 6270-4864

N.V. Karamyan: Cand. of Sci. (Med.), Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics of Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia, e-mail: natalia.karamyan@fccho-moscow.ru, https://orcid.org/0000-0002-9865-527X

D.V. Fedorova: Cand. of Sci. (Med.), Hematologist of Outpatient Consultative Unit, Research Associate of Hemostasis Research Group at Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia, e-mail: darya.v.fedorova@gmail.com; https://orcid.org/0000-0003-4567-1871

S.A. Plyasunova: Cand. of Sci. (Med.), Head of the Clinical Diagnostic Laboratory Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia, e-mail: Svetlana.Plyasunova@fccho-moscow.ru; https://orcid.org/0000-0002-4503-0735

P.A. Zharkov: Dr. of Sci. (Med.), Pediatrician, Hematologist Outpatient Consultative Unit, Head of the Hemostasis Research Group of Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology, Ministry of Health of Russia, e-mail: pavel.zharkov@fccho-moscow.ru; https://orcid.org/0000-0003-4384-6754, Web of Science ResearcherID: AAP-9203-2020

Вклад авторов

Все авторы: обзор литературы по теме статьи, анализ и интерпретация клинических и диагностических данных, разработка концепции и дизайна статьи, написание статьи, научное редактирование статьи

Authors' contributions

All authors: review of publications on the topic of the article, analysis and interpretation of clinical and diagnostic data, concept and design of the article, writing the text of article, scientific edition of the article

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. / **Conflict of interest.** *The authors declare no conflict of interest.*

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки. / **Funding.** *The study was performed without external funding.*

Введение

Болезнь Виллебранда (БВ) является одним из наиболее часто встречающихся наследственных геморрагических состояний в Европе, заболеваемость в популяции достигает 1 % [1, 2]. В России БВ наблюдается значительно реже, что связано с преобладанием легких и бессимптомных форм, не вынуждающих пациентов обращаться за медицинской помощью, а также низкой доступностью лабораторной диагностики [3]. Заболевание связано с количественными или

качественными нарушениями в молекуле фактора Виллебранда (vWF). vWF представляет собой крупный белок с молекулярной массой 280 кДа, синтез которого происходит в эндотелии и мегакариоцитах. Основной функцией vWF является адгезия тромбоцитов к субэндотелиальным структурам. Причем адгезивной способностью обладают крупные формы vWF. Также он обеспечивает защиту фактора свертывания VIII от протеолитической активности протеина С [4, 5].

Текущая классификация БВ включает в себя 6 различных типов [6, 7]. Диагностика типов 1 и 3 не вызывает никаких затруднений и возможна при анализе клинической картины пациента и выполнении скрининговых тестов на определение антигена vWF (vWF:Ag), ристоцетин-кофакторной активности (vWF:RCo), активности фактора свертывания VIII (FVIII:C). В то время как определение подтипов 2A, 2B, 2M и 2N БВ требует выполнения дополнительных тестов, таких как коллаген-связывающая способность (vWF:CB), фактор VIII-связывающая способность vWF (vWF:FVIIIb), которые ввиду гетерогенности получаемых результатов не всегда способны помочь в точном типировании болезни [2]. Поэтому часто необходимы дополнительные исследования. Уникальным является мультимерный анализ (МА) vWF, позволяющий визуализировать распределение мультимерных форм vWF в зависимости от размера. Однако данная методика доступна в очень малом количестве лабораторий, поскольку технически сложна, трудоемка и не стандартизована при мануальной постановке [8]. Недавно стал доступен коммерческий набор для визуализации мультимеров vWF компании Sebia (France), позволяющий в автоматизированном режиме проводить разделение изоформ vWF в геле [9].

Целью нашего исследования стала оценка диагностических возможностей данного автоматизированного метода МА vWF.

Материалы и методы

Пациенты

Были исследованы образцы плазмы 8 здоровых добровольцев в возрасте от 24 до 30 лет и пациентов установленным диагнозом БВ (8 больных с 1-м типом, 10 – со 2-м и 2 – с 3-м типом БВ в возрасте от 1 года до 15 лет), обратившихся в консультативно-поликлиническое отделение НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева с жалобами на кровоточивость. Также исследована плазма 5 пациентов с эссенциальной тромбоцитемией и лабораторными признаками приобретенного синдрома Виллебранда (CB). Диагноз устанавливался на основании клинико-лабораторных данных в соответствии с международными рекомендациями [2, 7].

Взятие образцов и пробоподготовка

Кровь набиралась из периферической вены в вакуумные пробирки Sarstedt Monovette объемом 3,0 мл, содержащих 3,2 % цитрат натрия, в соотношении 1:9 в соответствии с международным стандартом [10]. Забор крови производился утром, натощак. Образцы подвергались центрифугированию (Labofuge 400, ThermoScientific, Германия) при 200g 10 мин – для получения богатой тромбоцитами плазмы (PRP) и при 1500g 15 мин – для получения бедной тромбоцитами плазмы (PPP).

Исследование образцов

Агрегация тромбоцитов с ристоцетином (ristocetin induced platelet aggregation, RIPA) и низкими дозами ристоцетина (low dose ristocetin induced platelet

aggregation, Ld-RIPA) выполнялась на лазерном агрегометре АЛАТ-2.

Исследование активированного частичного тромбoplastинового времени (АЧТВ, АРТТ SynThAsil), концентрации vWF:Ag, vWF:RCo, активности фактора VIII (FVIII:C, FVIII deficient plasma) выполнялось на автоматическом коагулометре ACL TOP 700 (Instrumentation Laboratory, USA) с использованием стандартных наборов.

Определение vWF:CB и vWF:FVIIIb производилось с помощью диагностических наборов Stago (Diagnostica Stago, France) методом твердофазного иммуноферментного анализа.

МА проводился с помощью диагностического набора HYDRAGEL 5 von Willebrand Multimers (Sebia, France) на полуавтоматическом приборе для электрофореза Hydrasys 2 (Sebia, France). Образцы плазмы предварительно были разведены с помощью разбавителя в соответствии с рекомендациями к набору и инкубировались в течение 20 мин при 45 °С. Разбавленные образцы были загружены в гели и подвергнуты следующим этапам: миграция; иммунофиксация 1; иммунофиксация 2; визуализация: сушка геля; обесцвечивание геля; сканирование геля. Сканирование выполнялось на программном обеспечении Phoresis (Sebia, France).

Результаты

Здоровые добровольцы

Исследование мультимерного профиля (МП) у здоровых добровольцев продемонстрировало нормальное распределение всех форм vWF: низкомолекулярных (НМ), средномолекулярных (СМ) и высокомолекулярных (ВМ) (рис. 1). В качестве контроля использовалась рекомендуемая протоколом Sebia нормальная контрольная плазма [9]. На денситограмме видна потеря части высокомолекулярных форм vWF, что объясняется процессом приготовления лиофилизированной плазмы [11]. Поэтому в дальнейшем для контроля мы применяли пул нормальной плазмы (ПНП), набранный в лаборатории (5 здоровых добровольцев с известным количеством vWF (vWF:Ag) – 94,4 %).

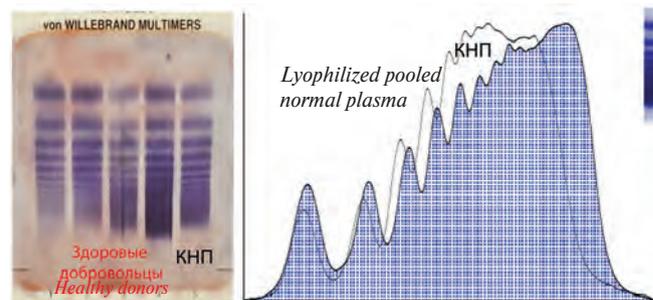


Рис. 1. Здоровые добровольцы (дорожки 1–4), коммерческая нормальная плазма (КНП) – дорожка 5

Fig. 1. Healthy donors (tracks 1–4), lyophilized pooled normal plasma (track – 5)

Результаты лабораторных тестов пациентов с различными типами БВ и СВ

Laboratory test results of samples from patients with different types of vWD and acquired von Willebrand Syndrome (aVWS)

№ пациента <i>Patient No</i>	Тип БВ <i>vWD type</i>	vWF:Ag (42,2–150 %)	vWF:RCo (42–150 %)	vWF:RCo/ vWF:Ag (> 0,7)	vWF:CB (79–147 %)	vWF:FVIII:B (70–144 %)	FVIII:C (50–150 %)	Ld-RIPA (0–10%)	МА <i>Multimeric assay</i>
1	1	34,3	24,1	0,7	34,9	68,9	64,9	2	Нормальный МП <i>Normal multimeric profile</i>
2	2А	51,4	19,1	0,4	9,8	111,8	65,7	2	Потеря ВМ и СМ мультимеров <i>Loss of high and medium molecular multimers</i>
3	2В	47,1	12,3	0,26	62	120	46	86	Потеря преимущественно ВМ мультимеров <i>Loss of predominantly high molecular multimers</i>
4	2М	97,1	24,9	0,3	109,9	78,6	75,9	2	Нормальный МП <i>Normal multimeric profile</i>
5	2М	46,6	14	0,3	13,5	58,1	58,9	6	Нормальный МП <i>Normal multimeric profile</i>
6	2N	32,2	35,2	1,09	110	17,3	12,4	Отсутствует <i>Absent</i>	Нормальный МП <i>Normal multimeric profile</i>
7	3	0,7	7,1	Н/д	0,64	0	4	0	Отсутствие полос на геле <i>No streaks on the gel</i>
8	СВ <i>aVWS</i>	46	1,1	0,02	28,7	60,4	Н/д	6	Частичная потеря ВМ мультимеров <i>Partial loss of high molecular multimers</i>
9	СВ <i>aVWS</i>	138,5	89,4	0,64	109,9	72,1	Н/д	0	Нормальный МП <i>Normal multimeric profile</i>

Примечание. Н/д – нет данных.

Note. Н/д – no data.

У пациента № 1 с 1-м типом БВ наблюдалось снижение плотности полос на геле, без нарушения МП, что коррелирует со снижением количества vWF в плазме (рис. 2).

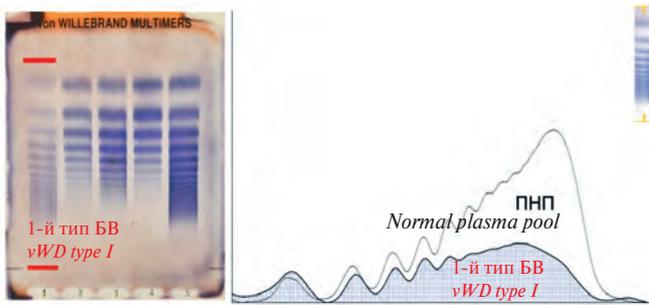


Рис. 2. 1-й тип БВ (дорожка 1)

Fig. 2. vWD type I (track 1)

Пациент № 2 с типом 2А БВ демонстрировал потерю ВМ и СМ форм с увеличением НМ мультимеров vWF (рис. 3).

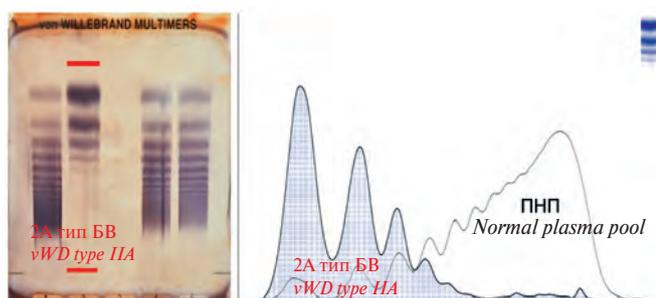


Рис. 3. 2А тип БВ (дорожка 2)

Fig. 3. vWD type IIA (track 2)

Пациенты № 4 и № 5 с типом 2М БВ не имели нарушений в МП (рис. 4), однако у пациента № 5 наблюдалось незначительное снижение ВМ и СМ форм vWF при значительном снижении vWF:CB (рис. 5).

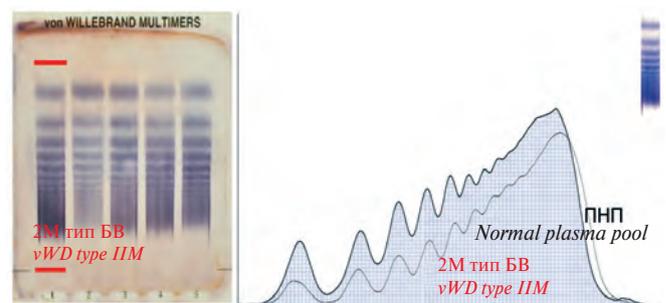


Рис. 4. 2М тип БВ (дорожка 1)

Fig. 4. vWD type 2M (track 1)

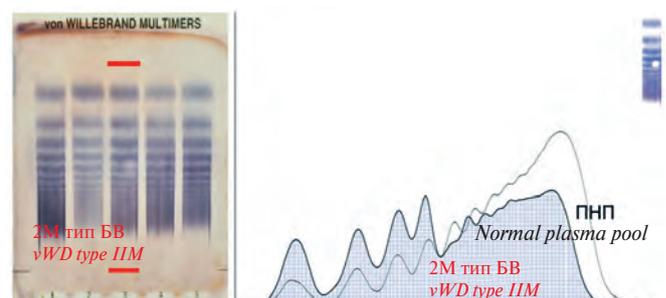


Рис. 5. 2М тип БВ (дорожка 3)

Fig. 5. vWD type 2M (track 3)

Пациент № 3 с типом 2В БВ имел характерную картину отсутствия ВМ форм vWF на электрофореграмме, сниженный уровень СМ и увеличение количества НМ мультимеров (рис. 6).

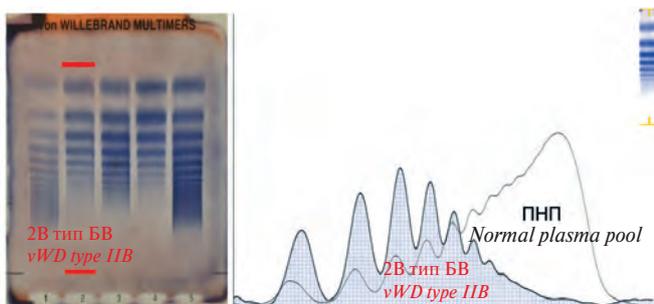


Рис. 6. 2В тип БВ (дорожка 2)

Fig. 6. vWD type 2B (track 2)

Единственный пациент с подозрением на 2N тип БВ – № 6 (выявлено снижение vWF:VIIIb) – имел нормальное распределение мультимеров (рис. 7). Для точного установления подтипа необходимо проведение генетического исследования.

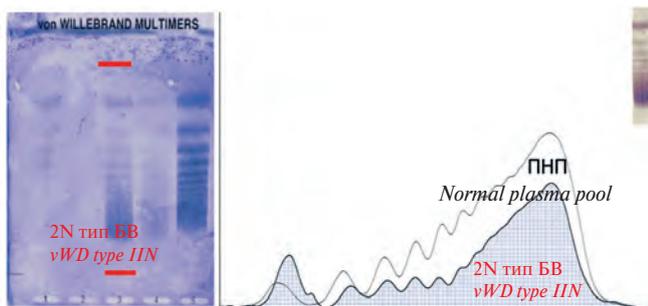


Рис. 7. 2N тип БВ (дорожка 3)

Fig. 7. vWD type 2N (track 3)

У пациента № 7 с 3-м типом БВ наблюдается полное отсутствие форм на фореграмме и сигнала на денситограмме (рис. 8).



Рис. 8. 1-й тип БВ (дорожка 3)

Fig. 8. vWD type I (track 3)

Пациенты с приобретенным синдромом Виллебранда

У пациентов с СВ наблюдались различные изменения на электрофореграммах – у пациента № 8 частично отсутствовали ВМ формы vWF, у пациента № 9 мультимерная структура не нарушена и практически соответствовала ПНП (рис. 9, 10).

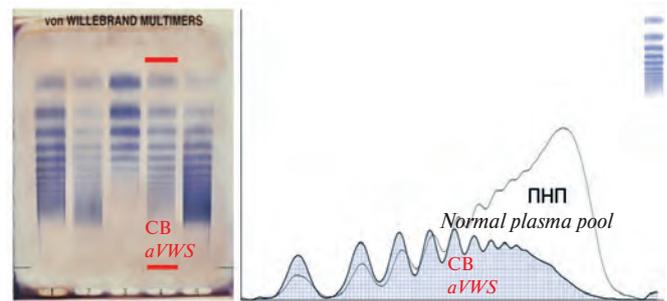


Рис. 9. СВ, потеря ВМ мультимеров (дорожка 4)

Fig. 9. aVWS, loss of high molecular multimers (track 4)

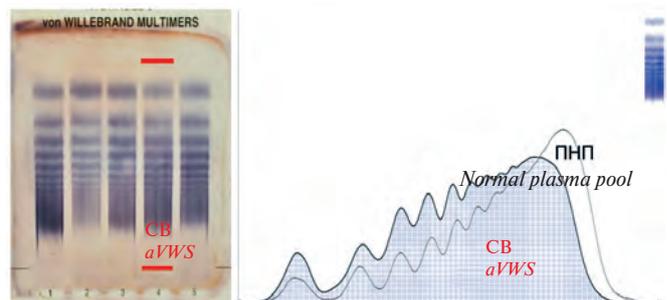


Рис. 10. Приобретенный СВ, нормальный МП (дорожка 4)

Fig. 10. aVWS, normal multimeric profile (track 4)

Обсуждение

МА остается одной из важнейших методик, позволяющих визуализировать распределение изоформ vWF в зависимости от размера. Иногда это единственный способ классифицировать окончательно состояние и диагноз пациента в соотношении с наличием или отсутствием изоформ фактора, даже несмотря на наличие у больных известных мутаций и показателей всего многообразия других тестов для исследования БВ. Классическая постановка МА занимает большое количество времени (от 2 до 4 сут) [8]. Методика Sebia дает возможность получить результаты в среднем в течение 7 ч, позволяя проанализировать от 4 до 10 пациентов в зависимости от типа геля [12, 13]. Данная методика остается крайне полезной в типировании БВ. Как показали недавние исследования, МА оказался ценным тестом в диагностике БВ: из 480 пациентов в 17,3 % случаев МА играл ключевую роль в типировании, в 76 % наблюдений он был полезен в диагностике и лишь в 6,7 % не являлся информативным. Также было показано, что вклад МА в диагностический процесс гораздо выше, чем у vWF:CB [14]. Тесты системы гемостаза для типирования БВ имеют большую вариабельность и могут существенно изменяться в зависимости от возраста, наличия клинических проявлений и даже сезонности у одного и того же больного [15]. В то время как МА позволяет отражать реальное состояние изоформ молекулы фактора свертывания в данный момент у пациента. Также МА включен в последнюю официальную классификацию БВ [7].

По нашим данным, пациенты с 1-м типом БВ, типами 2М, 2N и здоровые добровольцы демонстрируют нормальное распределение полос на геле в зависимости от уровня vWF в крови – чем меньше количество, тем ниже интенсивность окрашивания, меньше плотность на денситограмме (см. рис. 1, 2, 4–6). Больные с 2А типом обычно демонстрируют потерю ВМ и СМ форм, что связано с повышенным клиренсом или высокой активностью металлопротеиназы ADAMTS-13, которая расщепляет ВМ формы vWF. Пациенты с 2В типом демонстрируют потерю только ВМ форм, которые обладают повышенной чувствительностью к рецептору тромбоцитов GpIb-V-IX, связываются с ним и элиминируются из кровотока. Типичным лабораторным показателем, позволяющим предположить наличие данных типов у больного, является соотношение $vWF:RCo/vWF:Ag$, дальнейшее типирование требует выполнения дополнительных тестов, таких как $vWF:CB$ и МА. Нарушение связывания vWF с коллагеном (снижение $vWF:CB$) позволяет заподозрить у пациента 2А или 2В типы БВ, что связано с потерей ВМ форм, но также снижение данного параметра возможно и у больных с 2М и 1-м типами БВ, у которых нарушения мультимерной структуры обычно не происходит [2, 7]. Дифференциальная диагностика типов 2А и 2В БВ крайне затруднительна ввиду сложности визуального определения размера молекул и значительной вариабельности клинико-лабораторной картины, особенно у 2В типа. Даже выполнение Ld-RIPA не во всех случаях позволяет установить подтип 2В [16], к тому же выполнение данной методики невозможно при дистанционной диагностике БВ [17].

Пациенты с 3-м типом не нуждаются в анализе мультимерной структуры ввиду отсутствия vWF. Особый интерес представляет группа больных с активностью vWF 30–50 %, которые в настоящее время отно-

сятся в группу пациентов с «низким уровнем vWF» ввиду отсутствия корреляции между значениями фактора и клиническими проявлениями, ведь частота развития геморрагических осложнений в данной группе выше, чем в здоровой популяции [18].

В основе нарушений vWF при СВ лежит снижение функции за счет связывания аутоантител с комплексом vWF-FVIII или усиление клиренса молекулы из-за адсорбции на злокачественных клетках [19]. МП vWF у пациентов с СВ может быть как нормальным, так и демонстрировать частичную потерю ВМ форм, причем степень потери не коррелирует с $vWF:RCo$. Пациенты с СВ нуждаются в дополнительных исследованиях причин изменения мультимерной структуры vWF, поиска взаимосвязи выявленных нарушений с клиническими проявлениями.

Заключение

Новый набор определения мультимеров vWF (Hydrigel 5 von Willebrand multimers; Sebia, Lisses, France) позволил визуализировать различные подтипы БВ и является хорошей альтернативой большому количеству разнообразных ручных, не стандартизированных методик. Также наличие возможности использования Hydrigel 11 (11 дорожек на геле) позволяет проводить исследование сразу у 10 пациентов одновременно, что сильно облегчает постановку при наличии потока больных. Данный набор необходимо иметь в каждой крупной лаборатории, занимающейся диагностикой нарушений свертывания крови. Обсуждаемая методика не должна быть единственной в диагностике, только полная панель позволит с высокой точностью типировать БВ. Возможно, более детальное исследование мультимерной структуры у пациентов с низким уровнем vWF и СВ позволит выявить взаимосвязь МП с клиническими проявлениями.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Rodeghiero F., Castaman G., Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 1987;69:454–9. doi: 10.1182/blood.v69.2.454.454.
- Nichols W.L., Hultin M.B., James A.H., Manco-Johnson M.J., Montgomery R.R., Ortel T.L., Rick M.E., Sadler J.E., Weinstein M., Yawn B.P. Von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia* 2008;14(2):171–232. doi: 10.1111/j.1365-2516.2007.01643.x.
- Андреева Т.А., Климова Н.И., Тарасова И.С., Лаврухин Д.Б., Чернов В.М. Состояние специализированной помощи детям и взрослым с болезнью Виллебранда в РФ (по данным анкетирования главных гематологов). *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2013;12(1):5–12. [Andreeva T.A., Klimova N.I., Tarasova I.S., Lavrukhin D.B., Chernov V.M. The state of specialized care for children and adults with von Willebrand disease in the Russian Federation (according to a survey of chief hematologists). *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii* = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2013;12(1):5–12. (In Russ.)].
- Leebeek F.W., Eikenboom C.J. Von Willebrand's Disease. *N Engl J Med* 2016;375(21):2067–80. doi: 10.1056/NEJMr1601561.
- Yee A., Kretz C.A. Von Willebrand factor: form for function. *Semin Thromb Haemost* 2014;40(1):17–27. doi: 10.1055/s-0033-1363155.
- 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. PMID: 8052974.
- Sadler J.E., Budde U., Eikenboom J.C.J., Favaloro E.J., Hill F.G.H., Holmberg L., Ingerslev J., Lee C.A., Lillicrap D., Mannucci P.M., Mazurier C., Meyer D., Nichols W.L., Nishino M., Peake I.R., Rodeghiero F., Schneppenheim R., Ruggeri Z.M., Srivastava A., Montgomery R.R., Federici A.B. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost* 2006;4:2103–14. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.02146.x.
- Ledford-Kraemer M.R. Analysis of von Willebrand factor structure by multimer analysis. *Am J Hematol* 2010;85(7):510–4. doi: 10.1002/ajh.21739.
- Oliver S., Edwin K., Lau E., Chapman K., Favaloro E. Laboratory Testing for Von Willebrand Factor Multimers. *Methods Mol Biol* 2017;1646:495–511. doi: 10.1007/978-1-4939-7196-1_36.
- Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition, 2008. [Electronic resource]. URL: https://clsi.org/media/1399/h21a5_sample.pdf.
- Pruthi R.K., Daniels T.M., Heit J.A., Chen D., Owen W.G., Nichols W.L. Plasma von Willebrand factor multimer quantitative analysis by in-gel immunostaining and infrared fluorescent imaging. *Thromb Res* 2010;126:543–9. doi: 10.1016/j.thromres.2010.09.015.
- Pikta M., Zemtsovskaja G., Bautista H., Nouadje G., Szanto T., Viigimaa M., Banys V. Preclinical evaluation of a semi-automated and rapid commercial electrophoresis assay for von Willebrand factor multimers. *J Clin Lab Anal* 2018;32(6):e22416. doi: 10.1002/jcla.22416.
- Crist R.A., Heikal N.M., Rodgers G.M., Grenache D.G., Smock K.J. Evaluation of a new commercial method for von Willebrand factor multimeric analysis. *Int J Lab Hem* 2018;40(5):586–91. doi: 10.1111/ijlh.12869.
- Perez-Rodríguez A., Batlle J., Corrales I., Borràs N., Rodríguez-Trillo Á., Lourés E., Cid A.R., Bonanad S., Cabrera N., Moret A., Parra R., Mingot-Castellano M.E., Navarro N., Altisent C., Pérez-Montes R., Marcellini S., Moreto A., Herrero S., Soto I., Mosteirín N.F., Jiménez-Yuste V., Alonso N., de Andrés Jacob A., Fontanes E., Campos R., Paloma M.J., Bermejo N., Berruoco R., Mateo J., Arribalzaga K., Marco P., Palomo Á., Quismondo N.C., Iñigo B., Del Mar Nieto M., Vidal R., Paz Martínez M., Aguinaco R., Tenorio M., Ferreira M., García-Frade J., Rodríguez-Huerta A.M., Cuesta J., Rodríguez-González R., García-Candel F., Dobón M., Aguilar C., Batlle F., Vidal F., López-Fernández M.F. Role of multimeric analysis of von Willebrand factor (VWF) in von Willebrand disease (VWD) diagnosis: Lessons from the PCM-EVW-ES Spanish project. *PLoS One* 2018;13(6):e0197876. doi: 10.1371/journal.pone.0197876.
- Timm A., Fahrenkrug J., Jørgensen H.L., Sennels H.P., Goetze J.P. Diurnal variation of von Willebrand factor in plasma: the Bispebjerg study of diurnal variations. *Eur J Haematol* 2014;93(1):48–53. doi: 10.1111/ejh.12298.
- Bierkaemper S., Trautmann-Grill K., Marten S., Tiebel O., Knoefler R. High variability of laboratory phenotype in genetically proven von Willebrand Disease type 2B. *Res Pract Thromb Haemost* 2020;4(Suppl 1). ISTH 2020 Virtual Congress.
- Поletaев А.В., Серегина Е.А., Федорова Д.В., Жарков П.А. Современные возможности дистанционной диагностики болезни Виллебранда у детей, проживающих на территории Российской Федерации. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2020;19(3):54–60. doi: 10.24287/1726-1708-2020-19-3-54-60. [Poletaev A.V., Seregina E.A., Fedorova D.V., Zharkov P.A. The current status of remote diagnosis of von Willebrand disease in children in Russia. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii* = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2020;19(3):54–60. (In Russ.)].
- Bykowska K., Ceglarek B. Clinical significance of slightly reduced von Willebrand factor activity. *Pol Arch Intern Med* 2020;130(3):225–31. doi: 10.20452/pamw.15162.
- Veyradier A., Jenkins C.S., Fressinaud E., Meyer D. Acquired von Willebrand syndrome: from pathophysiology to management. *Tromb Haemost* 2000;84:175–82. doi: 10.1023/b:thro.0000011369.70824.e6.

Статья поступила в редакцию: 20.04.2021. Принята в печать: 27.04.2021.
 Article was received by the editorial staff: 20.04.2021. Accepted for publication: 27.04.2021.