

На правах рукописи

ЧЕРНЕЦКАЯ ДАРЬЯ МИХАЙЛОВНА

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА
БОЛЕЗНИ ВИЛЛЕБРАНДА

3.1.28. – Гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук **Зозуля Надежда Ивановна**

Официальные оппоненты:

Поляков Александр Владимирович – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией ДНК-диагностики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»

Петров Виктор Юрьевич – доктор медицинских наук, врач-гематолог гематологического отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы»

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

Защита состоится « ____ » _____ 2023 г. в ____ часов
на заседании диссертационного совета 21.1.023.02 (Д 208.135.03) при ФГБУ
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства
здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125167, г. Москва, Новый
Зыковский проезд, 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный
медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения
Российской Федерации и на сайте www.blood.ru.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 года

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат медицинских наук

Е.П. Сысоева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

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

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

Ген *VWF*, кодирующий фактор vWF, локализован на 12-й хромосоме (12p13.31), занимает на ней около 178 тысяч пар нуклеотидов и состоит из 52 экзонов.

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

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

связывание vWF с коллагеном (для типа 2M) и агрегация тромбоцитов с низкими дозами ристоцетина (для типа 2B).

Актуально определение типа БВ молекулярно-генетическими методами, так как такие анализы как электрофорез мультимеров vWF, а также связывание vWF с FVIII, не выполняются в рутинной практике. Анализ связывания vWF с коллагеном, который используется для диагностики типа 2M, не позволяет отличить его от фенотипически идентичного состояния, связанного с нарушениями структуры тромбоцитов, это можно сделать только молекулярно-генетическими методами.

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

Мутационный анализ гена *VWF* позволяет установить диагноз пациента и определить носительство нарушений для его родственников. Молекулярно-генетическая диагностика БВ и типов БВ важна для выбора терапии и для планирования семьи пациентами.

Степень разработанности темы исследования

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

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

Не смотря на огромное количество информации, исследование гена *VWF* продолжается, базы данных не перестают пополняться. Это связано с тем, что на данный момент исследован ряд популяций, и список популяций растет. Так, исследований для российской популяции пациентов с БВ еще не проводилось, и мы поставили своей целью изучить ее. Кроме того, для новых нарушений в гене и для части уже известных, не до конца ясен патогенный эффект. Новые пациенты помогают прояснить связь мутации с клинической картиной заболевания, поэтому новые

пациенты нашей выборки важны для интерпретации уже известных вариантов гена и для описания новых.

Цели исследования

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

Задачи исследования

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

Научная новизна исследования

Впервые проведена оценка распределения патогенных вариантов гена *VWF*, характерного для российской популяции. Показана высокая гетерогенность полученного мутационного спектра. Выявлено 37 разных вариантов гена *VWF*, 11 из которых ранее в мировой популяции не встречались. Показано, что микроделеция с.2435delC, являющаяся мажорной для ряда европейских популяций, преобладает и в отечественной популяции (25%).

Новые варианты гена *VWF* дополнили мировые данные.

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

Положения, выносимые на защиту

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

Апробация

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

Апробация диссертации состоялась «19» июня 2023 года на заседании проблемной комиссии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России «Фундаментальные и клинические исследования в гематологии».

Личный вклад

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

В статьях за первым авторством была основным исполнителем как получения молекулярно-генетических данных, так и их обработки и написания текста. Статья, опубликованная в журнале «Genes» включает результат молекулярно-генетического анализа гена *VWF* для четверых пациентов, выполненного диссертантом.

Публикации

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

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 111 страницах машинописного текста и включает «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Практические рекомендации», «Список сокращений», «Список литературы» и «Приложения А-Г». Работа иллюстрирована 12 рисунками и содержит 20 таблиц. Список литературы включает 189 работ, из них 178 иностранных.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность Вадиму Леонидовичу Сурину за непосредственное участие в формировании научной работы на всех этапах. Также автор благодарит Надежду Ивановну Зозулю за научное руководство и Андрея Борисовича Сударикова за ценные советы и замечания. Автор благодарит всех врачей, сотрудничавших с лабораторией генной инженерии. Также автор благодарен Олеся Сергеевне Пшеничниковой, Валентине Валерьевне Саломашкиной и всему коллективу лаборатории генной инженерии, а также лаборатории физиологии кроветворения за моральную поддержку.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика пациентов и дизайн исследования

Работа выполнена в лаборатории генной инженерии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (руководитель лаборатории Сурин В.Л.). Образцы периферической крови пациентов были предоставлены клинико-диагностическим отделением гематологии и нарушений гемостаза ФГБУ «НМИЦ Гематологии» Минздрава России, Москва; ГАУЗ СО Центр детской онкологии и гематологии,

Екатеринбург; ФГБОУ ВО "СЗГМУ им И.И. Мечникова" Минздрава России, Санкт-Петербург.

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

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

- в случае недифференцированного диагноза БВ, диагноза тип 1 БВ, диагноза тип 3 БВ, а также при запросе исключить БВ (n=35) анализу подвергались все экзоны в порядке, соответствующем убыванию количества мутаций (Goodeve, 2010);
- при запросе дифференцировать 2N тип и гемофилию А (n=5) анализировали экзоны 17–28;
- при диагнозе тип 2 БВ недифференцированный, тип 2А/2М БВ (n=3) анализировали экзоны 12, 14–28, 30–31, 51, 52;
- при запросе дифференцировать 2В тип БВ и тромбоцитопению (n=7) анализировали экзон 28.
- Во всех случаях поиск мутаций начинался с 28-го и 18-го экзонов (кроме запроса подтвердить тип 2В). Далее проверка экзонов производилась, пока не были найдены мутации, объясняющие патологию, то есть 1 мутация для доминантно наследуемых типов, и 2 мутации для рецессивно наследуемых.

Лабораторное исследование

Из периферической крови пациентов выделяли тотальную ДНК фенол-хлороформным методом. Для анализа последовательности гена *VWF* амплифицировали экзоны и прилегающие к ним участки интронов методом ПЦР с помощью праймеров, разработанных в лаборатории генной инженерии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (руководитель лаборатории Сурин В.Л.) и синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва).

Амплификацию проводили с помощью набора PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Реакционная смесь в конечном объеме 25 мкл содержала 0.01–0.02 мкг геномной ДНК и 10 пкмоль каждого из праймеров. Для проведения ПЦР использовался амплификатор ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Полученные ПЦР-продукты очищали с использованием наборов Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega) или Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) и проводили секвенирование по методу Сэнгера с использованием набора ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 (Thermo Fisher Scientific). Капиллярный электрофорез был выполнен на автоматических генетических анализаторах ДНК ABI

PRISM 3500 (Thermo Fisher Scientific) в Центре коллективного пользования «Геном» в Институте молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта, РАН, Москва, и компании ЗАО «Евроген Ру», Москва.

В качестве референсной последовательности гена *VWF* использована NG_009072.1 из базы данных NCBI. Найденные несинонимические замены, делеции и инсерции проверялись по международным базам данных (LOVD3, HGMD, NCBI ClinVar) на патогенность. Патогенность новых мутаций оценивали согласно критериям, приведенным в руководстве по интерпретации данных, полученных методом массового параллельного секвенирования (Рыжкова О.П. и др., 2018). В качестве одного из критериев (PP3) использованы протеомные программы MutationTaster, Polyphen, SIFT, PROVEAN.

Данные коагулологического анализа были взяты из истории болезни пациентов. VWF:Ag был измерен иммунотурбидиметрическим методом, FVIII:C – клоттинговым методом, vWF:RCo и RIPA – агрегационным методом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектр мутаций российской выборки пациентов

В данной работе молекулярно-генетическое исследование было проведено для 50-ти неродственных пациентов с диагнозом БВ. Мутации в гене *VWF*, вызывающие данное заболевание, были выявлены у 44-х пациентов.

Таблица 1 – Распределение найденных вариантов по экзонам; если не указано обратное, то подразумевается, что вариант найден в гетерозиготном состоянии

Экзон	Найденные патогенные варианты	Сколько раз найден патогенный вариант**	Тип БВ, ассоциированный с мутацией
7	p.Arg273Trp	2	3 тип
10	p.Arg373Ter	2	3 тип
14	p.Met576Ile	1	1 тип
16	c.2098_2099insG*	2	–
18	p.Thr791Met	2	тип 2N
	c.2435delC	3 в гомозиготном состоянии, 11 – в гетерозиготном	3 тип
19	p.Arg816Trp	1	2N
20	p.Asp853Asn*	1	–
	p.Arg854Gln	1 раз в гомозиготном состоянии.	2N в гомозиготном состоянии

Экзон	Найденные патогенные варианты	Сколько раз найден патогенный вариант**	Тип БВ, ассоциированный с мутацией
21	p.Arg924Gln	2	полиморфизм, ассоциированный с БВ
23	c.2968-2 A>G*	1	–
25	p.Cys1101Arg	1	тип 1
26	p.Tyr1146Cys	1 раз в гомозиготном состоянии, 1 в гетерозиготном	тип 2А
27	p.Arg1205His	2	тип 1С
28	p.Pro1266Leu	1 (1)	2В, ген. конверсия
	p.Tyr1271Ter*	1	–
	p.Val1279Ile	1 (1)	сцеплена с БВ, генная конверсия
	p.Phe1293Ser*	1	–
	p.Arg1306Trp	2 (1)	2В
	p.Arg1308Pro	1	2В
	p.Arg1308Cys	2	2В
	p.Val1316Met	1 (1)	2В
	p.Arg1341Gln	1 (1)	2В
	p.Arg1374Cys	2	2М
	p.Arg1399His	1	2М/2А
	p.Ser1506Leu	2	тип 2
	p.Val1565Leu	2 (1)	повышенный протеолиз при помощи ADAMTS-13
	p.Arg1597Gln	1	2А
	p.Arg1597Trp	1 (1)	2А
p.Gly1609Arg	1	2А	
p.Arg1659Ter	1	3 (1)	
35	c.6029delC*	1	–
37	c.6457_6458insA*	1	–
40	c.6970delG*	1 (1)	–
44	c.7482delC*	1	–
45	p.Pro2527His*	1	–
52	c.8333_8341delGG ACGGAGC*	1	–

* – новые варианты гена *VWF*

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

Мутационный анализ был также проведен для 8 родственников пациентов с выявленными мутациями. Из них у шести обнаружены патогенные варианты. Всего было найдено 67 нарушений гена *VWF*, из них 37 были разными.

Распределение обнаруженных мутаций по экзонам представлено в таблице 1. Среди них две микроинсерции, пять микроделений, одна мутация сплайсинга, 3 нонсенс-мутации и 26 миссенс-мутаций.

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

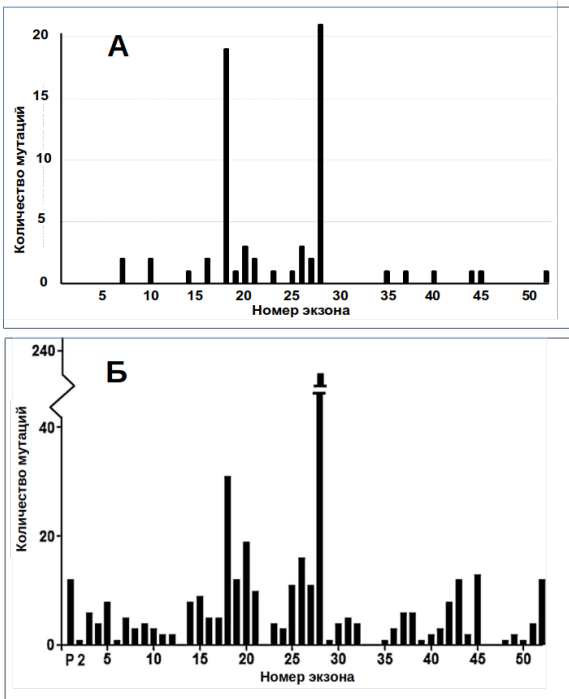


Рисунок 1 – Распределение мутаций по экзонам (А – найденных в данном исследовании; Б – в мировой выборке (Goodeve, 2010))

Распределение патогенных вариантов по гену *VWF* в отечественной популяции (Рисунок 1А) в целом согласуется с мировыми данными (Рисунок 1Б). У 6-ти пациентов мутаций найдено не было. Среди них пациент, для которого требовалось исключить БВ. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что при всех типах БВ целесообразно начинать анализ с экзонов 28 и 18 (для типа 2В только экзон 28), так как именно в них чаще всего локализованы патогенные изменения.

Анализ патогенности новых

вариантов гена *VWF*

Из выявленных патогенных вариантов 11 не были описаны ранее в литературе и отсутствуют в базах данных, а именно одна мутация зоны сплайсинга с.2968-2A>G,

две микроинсерции с.2098_2099insG и с.6457_6458insA, три микроделеции с.6029delC, с.6970delG и с.7482delC, одна делеция с.8333_8341delGGACGGAGC, одна нонсенс-мутация p.Tyr1271Ter и три миссенс-мутации p.Asp853Asn, p.Phe1293Ser, p.Pro2527His.

Микроделеции, микроинсерции, нонсенс-мутация, мутация зоны сплайсинга соответствуют критериям патогенности PM2, PVS1 и и относятся к «вероятно патогенным вариантам». Делеция без сдвига рамки считывания с.8333_8341delGGACGGAGC и замены относятся к «вариантам неопределенной значимости».

ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 1

Тип 1 был представлен в направительных диагнозах достаточно широко (11 пациентов: w6, w7, w18, w27, w34, w35, w40, w42, w43, w44, w51).

У пациентки w6 диагноз не подтвердился, у нее обнаружен тип 2N (подробнее в главе «ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 2N»).

У пациентки w27 (vWF:Ag – 10,8%; FVIII:C – 27%; vWF:RCo – 5%) был проанализирован весь ген, найдена только одна мутация p.Arg273Trp в гетерозиготном состоянии. В гомозиготном состоянии она соответствует типу 3 БВ, но гетерозиготные носители этой мутации не имеют симптомов, что говорит о том, что пациентка w27, вероятно, имеет дополнительное нарушение гена.

Пациенты w18 (vWF:Ag – 5,6%; FVIII:C – 5,1%) и w7 (vWF:Ag – 5,3%; FVIII:C – 14%) имели низкие коагулологические показатели, но были отнесены к типу 1 по формальным критериям (vWF:Ag>5%; FVIII:C> 10%). У пациента w18 найдена делеция с.2435delC в гомозиготном состоянии, что ассоциировано с типом 3 БВ. У пациента w7 обнаружены 2 гетерозиготные мутации, не проявляющиеся при гетерозиготном носительстве: с.2435delC, ассоциированная с типом 3 в случае гомозиготы, и p.Arg273Trp, патогенность которой обсуждалась ранее. Поскольку у пациента имеются две мутации, в гомозиготном состоянии проводящие к типу 3, и сильно снижены коагулологические показатели, логично предположить, что нарушения находятся на разных аллелях, то есть у пациента тип 3 БВ.

У пациента w40 наблюдалась коагулологическая картина, когда vWF:RCo имеет низкие значения, а vWF:Ag и FVIII:C в норме или несильно снижены (vWF:Ag – 43,6%, FVIII:C – 31,4%, vWF:RCo – 11,8%). У пациента w40 найдена мутация p.Arg1308Cys, ассоциированная с типом 2В.

У пациентки w42 были выявлены две мутации: новая инсерция c.2098_2099insG и p.Arg924Gln, которая трактуется и как полиморфизм, и как мутация, ассоциированная с разными типами БВ при наличии второй мутации со сдвигом рамки считывания (в данном случае она присутствует). В случае пациентки w42 высокие показатели vWF:Ag – 38%, FVIII:C – 40,8% не дают основания предположить тип 3 и тип БВ определить не представляется возможным.

У пациентки w43 коагулологическое исследование выявило снижение vWF:Ag (25,5%), при нормальном значении FVIII:C, близком к нижней границе нормы (55%). Найдена замена p.Met576Ile. Эта замена ассоциирована с типом 1 БВ, то есть можно считать тип 1 БВ подтвержденным.

У пациентки w44 (коагулологические данные отсутствуют) найдено два варианта: p.Arg1308Pro и p.Val1565Leu. Первый вариант ассоциирован с типом 2В. Вариант p.Val1565Leu присутствует в базе данных NCBI как полиморфизм, но существуют данные о том, что вариант приводит к повышенному протеолизу при помощи ADAMTS-13. Вероятно, данный случай предпочтительно трактовать как 2В тип БВ.

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

Были найдены мутации, ассоциированные с типом 1С БВ.

Мутация p.Arg1205His, ассоциированная с подтипом 1С, была обнаружена в экзоне 27 у двух неродственных пациентов (w34, w35;) из Екатеринбурга. Не исключено, что и в данном случае имеет место «эффект основателя». Пациенты w34 (vWF:RCo – 4,8, vWF:Ag – 8,6%, FVIII:C – 7,3%), w35 (vWF:Ag 34%, FVIII:C 36%)

поступили с диагнозом тип 1 БВ. Мы не располагаем достаточной информацией, чтобы определить, с чем связано такое различие в показателях у этих пациентов.

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

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

ДНК-диагностика, болезни Виллебранда, тип 2А

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

У пациентки w37 обнаружена мутация, ассоциированная с типом 2В, про этот случай будет рассказано в главе «ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 2В».

У пациента w20 снижены коагулологические показатели, особенно *vWF:RCO* (*vWF:Ag* – 33,9%, *FVIII:C* – 46%, *vWF:RCO* – 2%). У него обнаружена мутация *p.Arg1597Trp*, которую связывают с типом 2А БВ. В данном случае направительный диагноз подтвердился.

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

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

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

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

ДНК-диагностика, болезни Виллебранда, тип 2В

В нашем исследовании было 7 пациентов с направительным диагнозом тип 2В БВ (w30, w32, w38, w41, w46, w50, w59).

Для 4-х пациентов диагноз подтвердился (w32, w46, w50, w59). У троих из них (w46, w50, w59) наблюдалась агрегация тромбоцитов с низкими дозами ристоцетина (58%, 79%, 70% соответственно при норме 0–6%), что, вероятно, и дало основание для подозрения на тип 2В; у пациентки w32 данных нет.

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

У пациента w46 имеется еще одна замена p.Val1565Leu со спорной интерпретацией патогенности. Оба генетических изменения находятся на одном аллеле, что было подтверждено анализом, проведенном для родственницы пациента.

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

У двух пациенток (w38 (vWF:Ag – 49,6%, FVIII:C – 40%, vWF:RCo – 41,1%) и w41 (нет коагулологических данных); данных об агрегации тромбоцитов с низкими дозами ристоцетина нет у обеих) мутаций в экзоне 28 найдено не было, что не подтверждает диагноз тип 2В БВ, так как только изменения в этом экзоне могут приводить к этому типу заболевания. Проанализировали ген *GPIBA* чтобы проверить наличие псевдо-БВ, но отклонений от нормы не обнаружили.

У пациентки w30 с диагнозом 2В обнаружена мутация p.Arg1374Cys, соответствующая типу 2М, описана в главе «ДНК-диагностика болезни Виллебранда тип 2М».

Кроме того, было 4 случая, когда направительный диагноз был БВ иного типа, нежели 2В, но мутации указывают именно на этот тип. Так, пациентка w37 поступила с диагнозом 2А, но найденная у нее мутация p.Arg1341Gln указывает на тип 2В. Пациенты w40, w44 и w51 поступили с диагнозом БВ 1 тип, у них выявлены мутации, ассоциированные с типом 2В (подробнее в главе «ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 1»).

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

Наши данные подтверждают (на примере трех пациентов), что анализ агрегации тромбоцитов с низкими дозами ристоцетина способен подтвердить диагноз 2В тип БВ.

ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 2М

Среди включенных в исследование пациентов не было ни одного с входящим диагнозом тип 2М БВ. В нашей выборке выявлено молекулярно-генетическими методами два пациента с типом 2М (w4: недифференцированная БВ, vWF:Ag – 18%, FVIII:C – 28%, vWF:RCo – 12,6%; w30: тип 2В БВ, vWF:Ag – 34%, FVIII:C – 36%), вызванным одной и той же мутацией p.Arg1374Cys, чье проявление в гетерозиготном состоянии – это ухудшение связывания с тромбоцитами и частичная потеря высокомолекулярных мультимеров, ее относят к типу 2М.

У одного пациента (w2: недифференцированная БВ, vWF:Ag – 7,9%, FVIII:C – 8,2%, vWF:RCo – 21,1%) спорная ситуация, не исключающая тип 2М. Одна из найденных мутаций (p.Arg1399His) встречалась ранее в мировой популяции, вторая (p.Pro2527His) – новая. Вариант p.Arg1399His связывают с типом 2М БВ, однако совокупное действие двух найденных вариантов предсказать сложно.

ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 2N

С запросом на определение типа 2N или носительства гемофилии А обратились 4 женщины (w53, w54, w57, w58). У них наблюдается снижение FVIII:C (29,1%, 34,8%, 33,3%, 49% соответственно) при сохранении нормальных значений vWF:Ag, vWF:RCo. У пациентки w54 была найдена мутация p.Arg854Gln в гомозиготном состоянии, ассоциированная с типом 2N БВ. Остальные 3 пациентки (w53, w57, w58) не имеют изменений и, вероятно, являются носительницами гемофилии А.

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

В случае пациента A456 молекулярно-генетический анализ гена *F8* показал отсутствие патологических изменений. Предположили, что у пациента тип 2N БВ. Анализ соответствующих экзонов выявил замену p.Thr791Met, соответствующая типу 2N и микроделецию c.2435delC, вызывающую сдвиг рамки считывания и в гомозиготном состоянии тип 3. В сумме две эти мутации вызывают симптомы типа 2N БВ. Такой же набор мутаций обнаружен у пациентки w22.

Для всех четырех пациентов с выявленным типом 2N (w6, w22, A456, w54) характерно диагностическое соотношение $FVIII:C/vWF:Ag < 0,7$ и значительное снижение $FVIII:C$.

ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 3

С диагнозом тип 3 БВ поступило 10 пациентов (w10, w13, w15, w16, w23, w26, w29, w31, w48, w55). Среди них тип 3 был подтвержден у всех, кроме w31, у которого найдена только мутация в гетерозиготном состоянии c.2435delC, недостаточной для наблюдающегося у пациента снижения коагулологических показателей ($vWF:Ag - 2,5\%$, $FVIII:C - 3,1\%$, $vWF:RCo - 1\%$). Возможно, во втором аллеле имеется крупная делеция.

У пациентов w10, w13, w15, w16, w23, w29, w48 найдено по два патогенных варианта, представляющих собой нонсенс-мутации (p.Arg373Ter, p.Arg1659Ter), мутацию зоны сплайсинга (c.2968-2A>G) или frameshift-мутации (c.2435delC, c.6029delC, c.7482delC, c.6970delG, c.6457insA). Те мутации из этого списка, которые описаны в литературе, ассоциированы с типом 3. Не описанные ранее варианты:

c.6029delC, c.7482delC, c.6457insA, c.6970delG, c.2968-2A>G. Патогенный эффект этих мутаций не вызывает сомнений. При наличии двух таких нарушений на разных аллелях у пациента будет тип 3. У всех этих пациентов низкие показатели vWF:Ag, FVIII:C, vWF:RCo, соответствующие типу 3 БВ.

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

У пациента w55 с коагулологическими данными vWF:Ag – 0,9%, FVIII:C – 4,1%, соответствующими типу 3 БВ, обнаружено 3 варианта. Вариант p.Arg924Gln встречается в литературе у пациентов с разными типами БВ, часто трактуется как полиморфизм. Было выдвинуто предположение, что этот вариант может быть сцеплен с различными мутациями, как соответствующими типу 1БВ, так и более серьезными, соответствующими типу 3. В случае пациента w55 есть делеция c.2435delC и делеция c.8333_8341delGGACGGAGC. Мы не можем проверить, с какой именно делецией сцеплен вариант p.Arg924Gln. Делеция c.8333_8341delGGACGGAGC не описана ранее в литературе. Она приходится на последний 52-й экзон, который кодирует цистеиновый узел, создающий дисульфидные связи, необходимые для димеризации vWF в эндоплазматическом ретикулуме. Делеция трех кодонов c.8333_8341delGGACGGAGC не сдвигает рамку считывания, но можно предположить, что она нарушает димеризацию. У пациента w55 наличие двух делеций указывает на тип 3 БВ.

У пациента w48 (vWF:Ag – 1,6%), FVIII:C – 6,5%), vWF:RCo – 0,1%) найдено 2 патогенных варианта (c.2968-2A>G и c.6970delG) на разных аллелях (что подтверждено семейным анализом). Оба варианта не описаны ранее, однако являются серьезными нарушениями, сочетание которых, предположительно, ассоциируется с типом 3 БВ.

Тип 3 однозначно диагностируется по гомозиготной делеции c.2435delC у пациента w18, поступившего с типом 1 (подробно случай описан в главе «ДНК-диагностика болезни Виллебранда, тип 1»), и пациента w28, поступившего с недифференцированным диагнозом БВ, его коагулологическая картина (vWF:Ag – 2,1%, FVIII:C – 2,5%, vWF:RCo – 1,4%) также соответствует типу 3 БВ.

Пациент w7, несмотря на входящий диагноз тип 1 БВ, был классифицирован нами как тип 3, подробно этот случай описан в главе про тип 1 БВ.

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

Делция c.2435delC обнаружена трижды в гомозиготном состоянии (w16, w18, w28) и среди типа 3 – 9 раз в гетерозиготном. Эта делция не присутствовала только в одном случае (w48) из 13-ти, то есть ее вклад в формирование типа 3 БВ значителен.

Анализ сложных случаев, не вошедших в предыдущие главы

В одном случае БВ была «исключена» (w9, FVIII:C – 35%), в пяти случаях были обнаружены нарушения, но определить тип БВ не представляется возможным (w14, w21, w27, w52, w56).

У пациента w21 входящий диагноз БВ (FVIII:C – 83% и vWF:RCo – 63%) найден вариант p.Asp853Asn в гетерозиготном состоянии. Согласно оценке протеомных программ, это полиморфизм. Коагулологические данные по этому пациенту в пределах нормы, логично предположить, что у пациента не БВ.

В случае пациенток w14 (c.2435delC; vWF:Ag – 6,5%, FVIII:C – 3,3%, vWF:RCo – 21,1%), w27 (p.Arg273Trp; vWF:RCo – 5% и vWF:Ag – 10,8%, FVIII:C – 27%) найден только один патогенный вариант, но его недостаточно для объяснения наблюдаемых симптомов. В случае пациенток w52 (p.Phe1293Ser; vWF:Ag – 21,8%, FVIII:C – 52%, vWF:RCo – 3,61%), w56 (p.Tyr1271Ter; FVIII:C – 69,8%, vWF:RCo – 24,2%) невозможность установить тип связана с тем, что вариации гена *VWF* обнаружены впервые и их действие еще не изучено.

ДНК-диагностика родственников пациентов

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

Анализ, проведенный для родственников пациентов, позволил определить на одном или на разных аллелях располагаются патогенные варианты в случае, если их было обнаружено два. Для тех родственников, у которых были обнаружены мутации, мы можем прогнозировать их диагноз.

Разработанный алгоритм анализа

Поскольку ген *VWF* сложно организован (52 экзона), его полный анализ достаточно проблематичен. Данный алгоритм позволяет использовать упрощенные схемы поиска мутаций в зависимости от предполагаемого типа БВ:

1. При подозрении на тип 2БВ анализируют только экзон 28 гена. Тип наследуется доминантно, для установления диагноза достаточно 1 мутации.

2. При любом другом запросе анализ начинается с экзонов 28 и 18, так как согласно мировым данным и нашим собственным результатам (Рисунок 1А, Б), в этих экзонах патогенные варианты встречаются значительно чаще, чем в других.

3. Для верификации или «исключения» типа 2N БВ проводится анализ экзонов 17-28. Если в этих экзонах не было обнаружено нарушений, тип 2N считается «исключенным». Подтверждением диагноза 2N БВ считается обнаружение двух патогенных вариантов или одного в гомозиготном состоянии (наследование 2N типа рецессивное), вызывающих согласно базам данных тип 2N, или одного варианта, соответствующего типу 2N, а второго, дезактивирующего аллель, например, нонсенс-мутации. Если в зоне 17-28 экзонов найден 1 патогенный вариант типа 2N, то второй вариант ищут по всему гену и в случае обнаружения нарушения, дезактивирующего аллель, 2N тип считается подтвержденным.

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

5. В случае типов 1, 3 и недифференцированной БВ, анализируются все экзоны в порядке:

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

В случае обнаружения нового варианта, не описанного ранее в литературе, анализируется его патогенность согласно руководству по интерпретации данных,

полученных методом массового параллельного секвенирования (Рыжкова О.П. и др., 2018).

Сопоставление клинического диагноза результатам молекулярно-генетического анализа

Полное совпадение клинического и молекулярно-генетического диагноза наблюдалось почти в половине случаев (46%), изменение диагноза на гемофилию А в одном случае (2%), в трех случаях (6%) найденные нарушения не объясняют тяжести клинической картины. 6 случаев относились к «исключению» конкретного типа БВ (2В или 2N; 12%). «Исключение» БВ или какого-то типа БВ – это некоторое условное



Рисунок 2 – Соотношение клинических и молекулярно-генетических диагнозов

обозначение того, что мы не нашли нашими методами патогенного варианта в соответствующей области гена. В остальных случаях был уточнен тип БВ (34%), то

есть получены новые сведения в пределах диагноза БВ (Рисунок 2).

Генная конверсия

Из 50 пациентов генная конверсия обнаружена у двоих – w58, w51. Из родственников проанализировали w51-2, которая приходится матерью пациентке w51 и имеет тот же вариант гена. В случае пациентки w58 найдены варианты с.3686T>G и с.3692A>C, трактуемые в литературе как полиморфизмы. Варианты с.3686T>G и с.3692A>C заимствованы из псевдогена. У пациентки w51 также наблюдается нетипичная последовательность псевдогена, однако она не заимствована полностью из гена.

Ограничения методов

У метода «секвенирование по Сэнгеру» есть ограничения: не обнаруживаются протяженные делеции; не обнаруживаются глубинные интронные мутации, формирующие эффективные аномальные сайты сплайсинга; не позволяет определить на одном или на разных аллелях расположены найденные нарушения.

ВЫВОДЫ

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

Виллебранда наблюдалось почти в половине случаев (46%). В остальных случаях, был изменен, «исключен» или уточнен тип болезни Виллебранда.

4. Разработан эффективный алгоритм последовательного поиска мутаций в гене *VWF*, учитывающий направительный клинический диагноз, клинические и коагулологические данные.

Практические рекомендации

В рамках данного исследования разработаны рекомендации, не включающие редкие коагулологические анализы (такие как $vWF:CB$, $vWF:FVIII$, агрегация тромбоцитов с низкими дозами ристоцетина) (Рисунок 3).

Анализ всего гена потребуется для подтверждения недифференцированной БВ, а также при подтверждении типов 3 (при снижении коагулологических параметров $vWF:Ag < 0,5\%$, $vWF:RCo < 5\%$, $VIII:C < 10\%$) и 1 БВ (при соотношении $vWF:RCo/vWF:Ag > 0,6$).

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

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

В случае обнаружения изменений в гене *VWF*, их влияние на диагноз пациента трактуется согласно международным базам данных. В случае, если найденное нарушение является новым, рекомендуется изучить его патогенность с помощью функционального анализа. Если нарушения не были обнаружены, это может быть вызвано: ограничениями методов; при подозрении на тип 2N, нарушением в гене *F8*, вызывающими гемофилию А с клинической картиной, сходной с типом 2N БВ; при подозрении на тип 2B, нарушениями в генах *GPIB*, приводящим к патологическим изменениям в тромбоцитах, что клинически может быть сходно с типом 2B БВ.

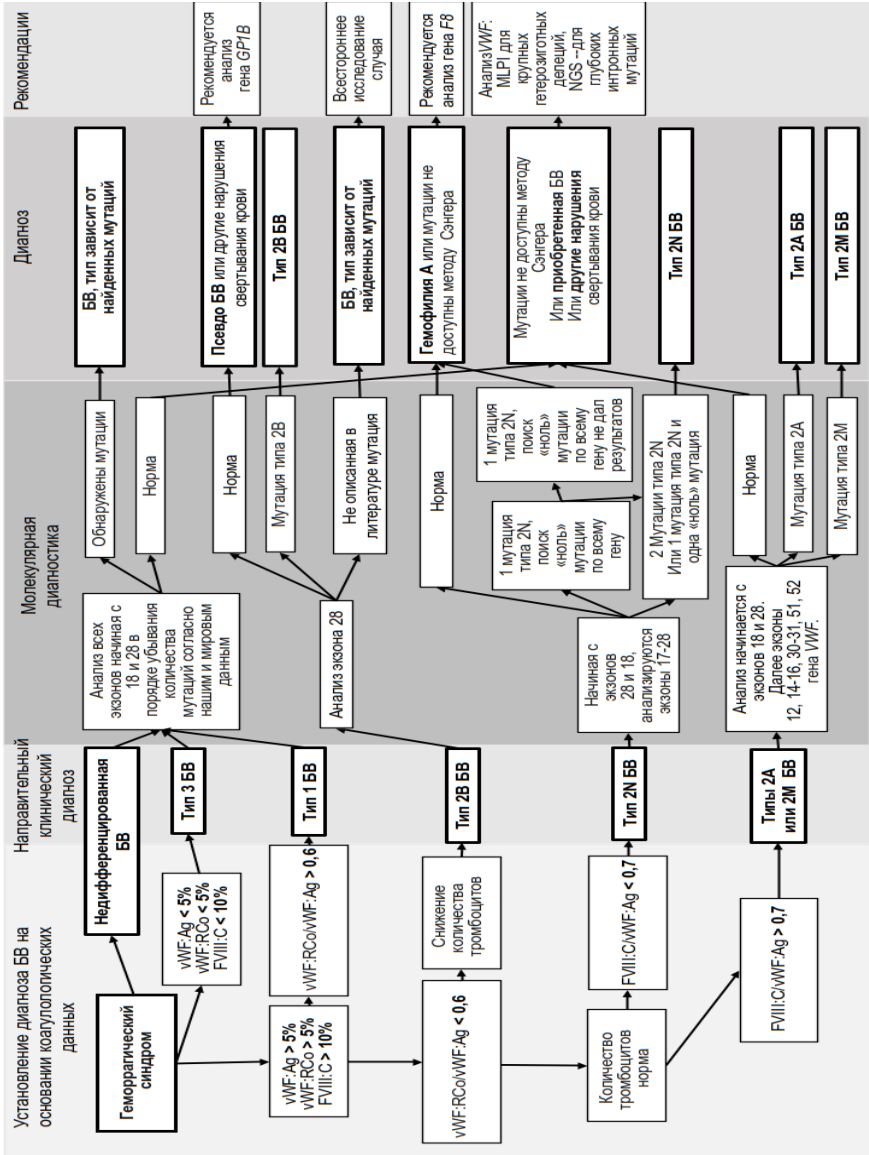


Рисунок 3: Рекомендованный алгоритм установления диагноза, учитывающий коагулологические и молекулярно-генетические данные

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БВ – болезнь Виллебранда

FVIII – фактор VIII

FVIII:C – прокоагулянтная активность фактора FVIII

vWF – фактор Виллебранда

VWF – ген, кодирующий vWF

vWF:RCo – ристоцетин кофакторная активность vWF

vWF :Ag– антиген vWF

vWF:CB – коллагенсвязывающая активность vWF

vWF:FVIII – фактор Виллебранда фактор VIII связывающий тест

RIPA – ристоцетин-зависимая агрегация тромбоцитов

GPIBA – ген, определяющий структуру рецептора на мембране тромбоцитов

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

ISTH – the International Society of Thrombosis and Homeostasis

LOVD3 – Leiden Open Variation Database 3

HGMD – The Human Gene Mutation Database

NCBI – The National Center for Biotechnology Information

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Чернецкая Д.М., Лихачева Е.А., Пшеничникова О.С., Сурин В.Л., Зозуля Н.И. Болезнь Виллебранда: сопоставление клинических, коагулологических и молекулярно-генетических данных. Гематология и трансфузиология. 2019. Т.64. №3. С.246-255.
2. Чернецкая Д.М., Сурин В.Л., Саломашкина В.В., Пшеничникова О.С., Яковлева Е.В., Зозуля Н.И., Судариков А.Б., Лихачева Е.А., Шабанова Е.С., Перина Ф.Г. Молекулярно-генетическая верификация болезни Виллебранда тип 2N. Гематология и трансфузиология. 2022. Т.67. №2. С.172-180.
3. Pshenichnikova O., Salomashkina V., Poznyakova J., Selivanova D., Chernetskaya D., Yakovleva E., Dimitrieva O., Likhacheva E., Perina F., Zozulya N., Surin V. Spectrum of Causative Mutations in Patients with Hemophilia A in Russia. Genes. 2023. Т.14. №2. С.260.

4. Чернецкая Д.М., Лихачева Е.А., Перина Ф.Г., Пшеничникова О.С., Сурин В.Л., Зозуля Н.И. Спектр мутаций в гене vWF у российских пациентов с болезнью Виллебранда. Гематология и трансфузиология. 2020. Т.65. №S1. С.110-111.
5. Лихачева Е.А., Чернецкая Д.М., Пшеничникова О.С., Сурин В.Л., Зозуля Н.И. Режимы гемостатической терапии при различных генотипах болезни Виллебранда. Гематология и трансфузиология. 2020. Т.65. №S1. С.168.
6. Chernetskaya D., Likhacheva E., Perina F., Pshenichnikova O., Surin V., Zozulya N. Molecular verification of von Willebrand disease diagnosis and new mutations in vWF gene. Haemophilia. 2020. Т.26. S2. P210
7. Chernetskaya D.M., Surin V.L., Salomashkina V.V., Pshenichnicova O.S., Yakovleva E.V., Perina F.G., Likhacheva E.A., Zozulya N.I. A single case of gene conversion found during the von Willebrand gene study. Молекулярная диагностика. 2021. Т.1. С.279-280.
8. Chernetskaya D., Likhacheva E., Perina F., Pshenichnikova O., Surin V., Zozulya N. Prevailing c.2435delC and Other VWF Gene Defects in Russian Patients with von Willebrand Disease Type 3. Four New Pathogenic Variants Found. Res Pract Thromb Haemost. 2021. Т.5. S1
9. Чернецкая Д.М., Сурин В.Л., Саломашкина В.В., Пшеничникова О.С., Яковлева Е.В., Зозуля Н.И., Лихачева Е.А., Андреев Н.В., Перина Ф.Г., Шабанова Е.С. Дифференциальная молекулярно-генетическая диагностика типа 2N болезни Виллебранда и гемофилии А. Вестник гематологии. 2022. Т.18. №S2. С.94.
10. Чернецкая Д.М., Сурин В.Л., Саломашкина В.В., Пшеничникова О.С., Яковлева Е.В., Зозуля Н.И., Судариков А.Б., Лихачева Е.А., Перина Ф.Г., Шабанова Е.С., Андреев Н.В. Спектр патогенных вариантов гена vWF у российских пациентов с болезнью Виллебранда. Гематология и трансфузиология. 2022. Т.67. №S2. С.145-146.
11. Chernetskaya D., Surin V., Salomashkina V., Pshenichnikova O., Yakovleva E., Zozulya N., Sudarikov A., Likhacheva E., Perina F., Shabanova E., Andreev N. *VWF* gene pathogenic variants spectrum in Russian patients with von Willebrand disease. Haemophilia. 2022. Т.28. S1. P0153