



Обзорная статья / Review article

Роль фактора фон Виллебранда в патологии гемостаза

Ю.Н. Автаева¹, И.С. Мельников^{1,2}, С.А. Васильев³, З.А. Габбасов^{1✉}, zufargabbasov@yandex.ru¹ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова; 121552, Россия, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а² Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук; 123007, Россия, Москва, Хорошевское шоссе, д. 76а³ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии; 126167, Россия, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 44

Резюме

Фактор фон Виллебранда (ФВ) – мультимерный гликопротеин плазмы крови, который присутствует в эндотелиальных клетках, мегакариocyтах, тромбоцитах и соединительной ткани. Он опосредует адгезию тромбоцитов в условиях артериального кровотока. ФВ также связывает и защищает от деградации фактор свертывания крови VIII. Было показано, что ФВ участвует в воспалении, опосредуя связь между гемостазом и воспалением. Мультимеры ФВ и тромбоциты, прикрепленные к поврежденному или активированному эндотелию, опосредуют рекрутирование лейкоцитов, что создает условия для распространения воспалительной реакции. Молекулы ФВ способны к гидродинамической активации, изменяя свою конформацию с глобулярной на фибриллярную при скоростях сдвига выше 5000 с⁻¹. ФВ играет ключевую роль в обеспечении клеточного гемостаза при высоких скоростях сдвига. Нарушение функций ФВ, врожденные дефекты, дефицит синтеза его мультимеров или усиление протеолиза приводят к кровотечениям как при болезни Виллебранда, так и при синдроме Хейда (Heyde). Патологическая активация ФВ может приводить к развитию тромботических осложнений ишемической болезни сердца. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19), особенно ее тяжелое течение, характеризуется тромботическими изменениями в макро- и микрососудах легких. Было выявлено, что у пациентов с COVID-19 повышается количество ФВ в плазме вследствие повреждения эндотелия и снижается активность ADAMTS-13. Изменение в оси ФВ/ADAMTS-13 у пациентов с COVID-19 увеличивает риск тромбоэмболических осложнений. Таким образом, оценка гидродинамической активации ФВ в потоке может быть информативным показателем в фундаментальных исследованиях и лабораторной диагностике.

Ключевые слова: гемостаз, ишемическая болезнь сердца, синдром Хейда, COVID-19, микрофлюидные технологии**Благодарности.** Работа поддержана грантом РФ №21-15-00029.**Для цитирования:** Автаева Ю.Н., Мельников И.С., Васильев С.А., Габбасов З.А. Роль фактора фон Виллебранда в патологии гемостаза. *Атеротромбоз*. 2022;12(2):79–102. <https://doi.org/10.21518/2307-1109-2022-12-2-79-102>.**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The role of von Willebrand factor in hemostasis pathology

Yuliya N. Avtaeva¹, Ivan S. Melnikov^{1,2}, Sergey A. Vasiliev³, Zufar A. Gabbasov^{1✉}, zufargabbasov@yandex.ru¹ National Medical Research Center for Cardiology named after academician E.I. Chazov; 15a, 3rd Cherepkovskaya St., Moscow, 121552, Russia² State Scientific Center of the Russian Federation – The Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences; 76a, Khoroshevskoye Shosse, Moscow, 123007, Russia³ National Medical Research Center for Hematology; 44, Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow, 126167, Russia

Abstract

Von Willebrand factor (VWF) is a multimeric plasma glycoprotein present in endothelial cells, megakaryocytes, platelets, and connective tissue. It mediates platelet adhesion in small arteries. VWF also binds and protects coagulation factor VIII from degradation. Moreover, VWF is involved in inflammatory response, linking hemostasis and inflammation. VWF multimers and platelets attached to damaged or activated endothelium mediate leukocyte recruitment, facilitating local inflammatory response. At shear rates above 5000 s⁻¹, VWF molecules are capable of hydrodynamic activation that changes their conformation from globular to fibrillar. Therefore, VWF plays a key role in cellular hemostasis at high shear rates. Acquired and inherited dysfunction, defective synthesis or increased proteolysis of VWF multimers lead to bleeding, as in von Willebrand disease or Heyde syndrome. Pathological activation of VWF may lead to the development of thrombotic complications of coronary artery disease. COVID-19, especially severe form, is characterized by prothrombotic shift in pulmonary vascular bed. Following endothelial damage, VWF plasma level rises and ADAMTS-13 activity decreases. In patients with COVID-19, a change in the VWF/ADAMTS-13 ratio is associated with an increase in the risk of thromboembolic complications. Therefore, assessment of hydrodynamic activation of VWF under flow conditions may be valuable in fundamental research and laboratory diagnostics.

Keywords: hemostasis, coronary artery disease, Heyde syndrome, COVID-19, microfluidic technology

Acknowledgments. The work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 21-15-00029.

For citation: Avtaeva Yu.N., Melnikov I.S., Vasiliev S.A., Gabbasov Z.A. The role of von Willebrand factor in hemostasis pathology. *Atherothrombosis*. 2022;12(2):79–102. (In Russ.) <https://doi.org/10.21518/2307-1109-2022-12-2-79-102>.

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

ВВЕДЕНИЕ

Фактор фон Виллебранда (ФВ) – это большой мультимерный гликопротеин плазмы крови и субэндотелиального матрикса, который также присутствует в эндотелиальных клетках в тельцах Вейбеля – Паладе (тельца ВП) и тромбоцитах (α -гранулы) [1]. Этот белок был назван в честь финского врача Эрика фон Виллебранда, который в 1924 г. начал изучать наследственное нарушение свертываемости крови. В своей первой работе в 1926 г. он назвал это состояние псевдогемофилией [2]. Сегодня описанное ученым состояние называют болезнью Виллебранда (БВ). ФВ был впервые очищен и выделен в начале 1970-х гг., а его полная аминокислотная последовательность была описана в 1986 г. [3]. В последние десятилетия произошел значительный прогресс в понимании процесса биосинтеза ФВ, его структурных особенностей и молекулярных основ БВ. Также была предложена новая модель свертывания крови, благодаря которой роль ФВ в гемостазе стала более значимой.

МОДЕЛИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И ПОЛОЖЕНИЕ В НИХ ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА

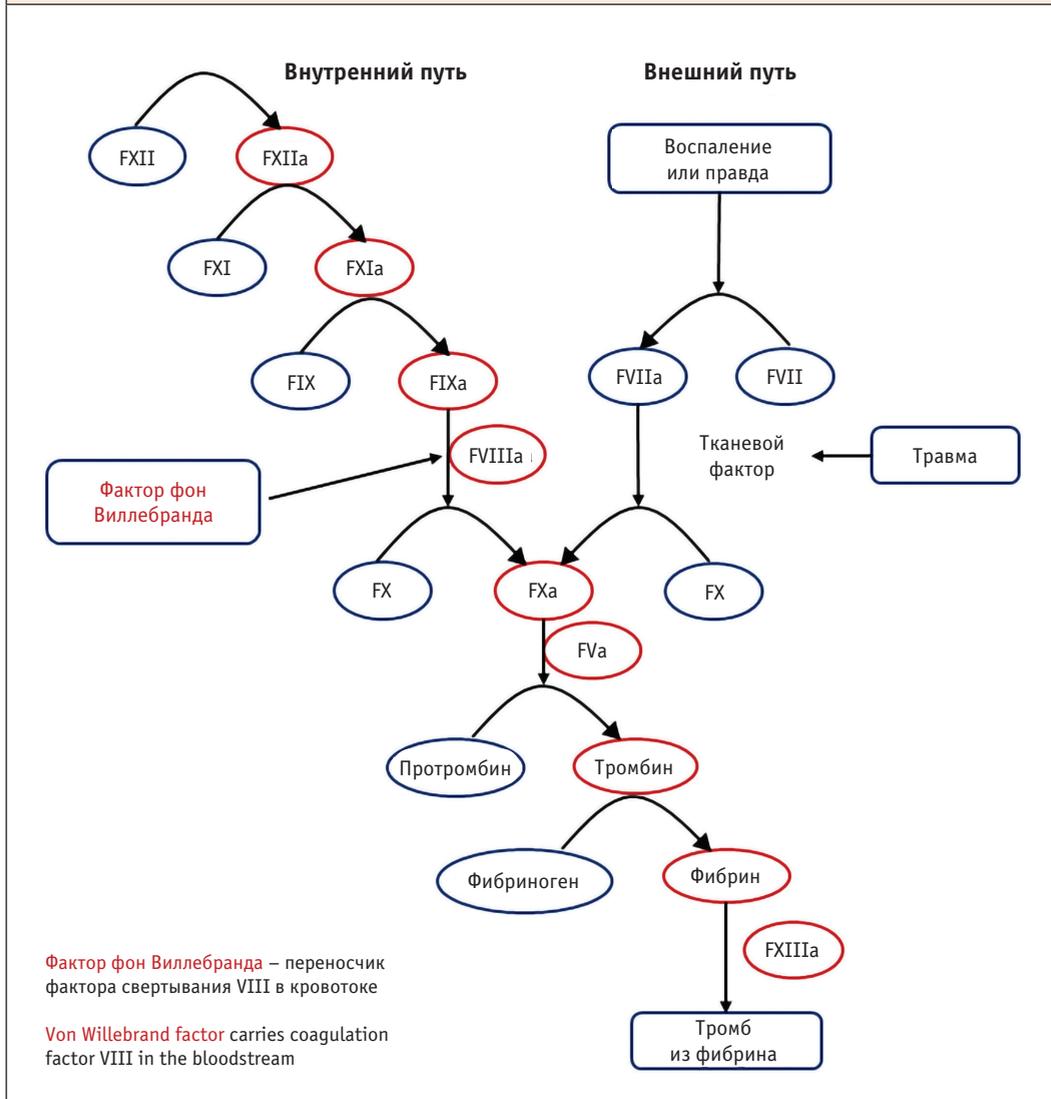
На протяжении многих лет с начала изучения гемостаза не существовало модели, которая могла бы объяснить процессы, происходящие с участием факторов свертывания крови и приводящие к остановке кровотечения. Важным шагом на пути к современному пониманию гемостаза была публикация в 1964 г. двух независимых работ E.W. Davie, O.D. Ratnoff [4] и R.G. Macfarlane [5]. Они

предложили две модели свертывания крови: «водопад» и «каскад» («водопад/каскад»), описывающие последовательность активации и взаимодействия факторов свертывания крови (рис. 1). Позже в эту модель были внесены дополнения и изменения, а именно описан внешний путь тканевого фактора (ТФ) и внутренний (контактный) путь активации тромбина. Модель «водопад/каскад» [6] сыграла решающую роль в понимании процесса коагуляции *in vitro*.

Однако на момент выхода этих публикаций и на протяжении последующих нескольких лет ФВ в эту модель коагуляции не входил, так как только в 1971 г. T.S. Zimmerman et al. [7, 8] продемонстрировали, что фактор свертывания VIII (FVIII) и ФВ – это разные белки. Но уже в модели «водопад/каскад» ФВ служил переносчиком FVIII в кровотоке (рис. 1). Согласно этой модели, FVIII участвует во внутреннем пути активации тромбина, взаимодействуя с активированным фактором свертывания IXa (FIXa) в качестве кофактора с образованием внутренней теназы (ферментный комплекс, который расщепляет неактивный фактор свертывания X в активный Xa). FVIII необходим для нормального гемостаза, его дефицит приводит к гемофилии А. В отсутствие ФВ FVIII нестабилен и подвержен быстрой деградации. ФВ значительно продлевает период полужизни и защищает FVIII от протеолиза, в конечном счете доставляя его к участкам повреждения сосудов [9].

Благодаря модели «водопад/каскад» широкое распространение получили плазменные тесты (например, активированное

РИСУНОК 1. Модель гемостаза «водопад/каскад»
FIGURE 1. Waterfall/cascade hemostasis model



частичное тромбопластиновое время, протромбиновое время, тромбиновое время), позволяющие определить нарушения во внутреннем, внешнем и общем путях коагуляции [6]. Эти тесты для оценки состояния коагуляционного гемостаза используются и сегодня. Однако такая модель

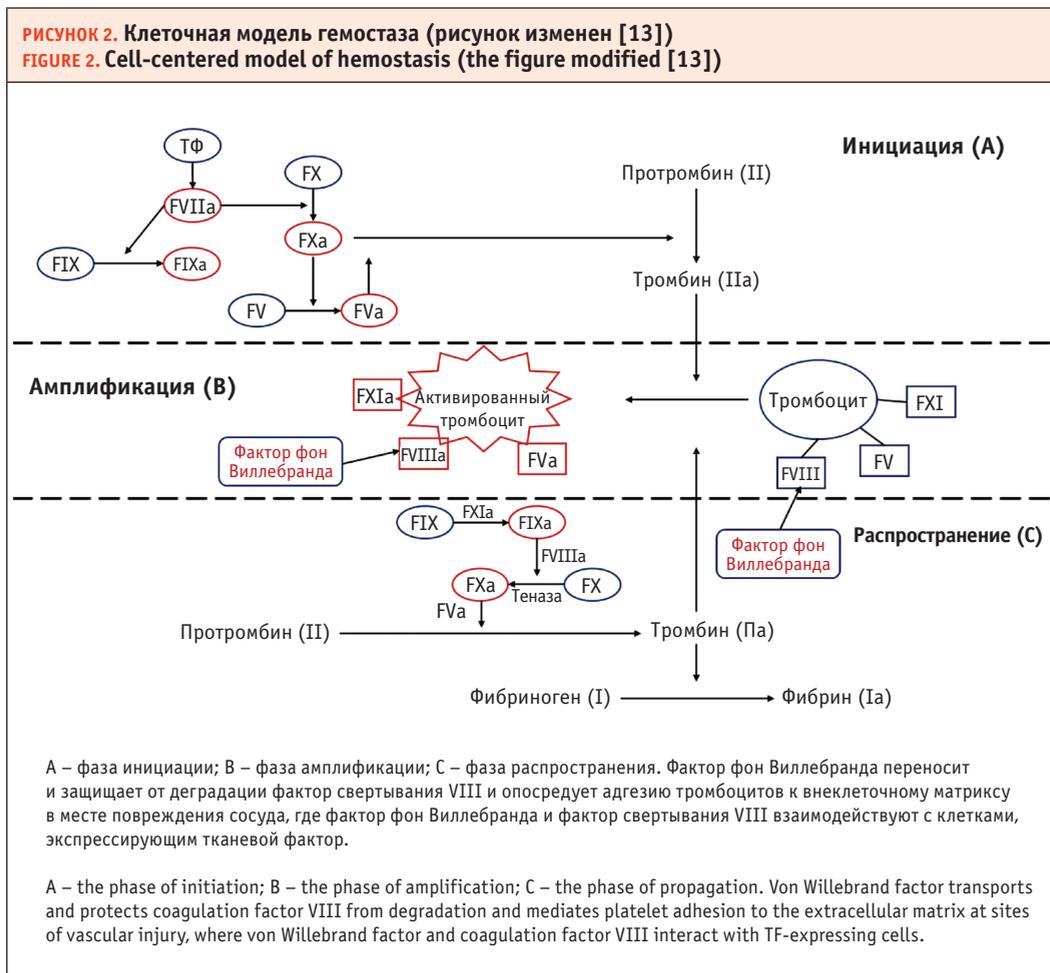
не совсем точно отражает функционирование системы коагуляции. Модель «водопад/каскад» описывает этапность свертывания *in vitro*, но не объясняет его *in vivo*.

Недостатки модели «водопад/каскад» привели к тому, что в 2001 г. M. Hoffman et al. предложили клеточную модель гемостаза [10].

Клеточная модель основана на том, что взаимодействие ТФ, экспрессирующегося на различных клетках (гладкомышечные клетки сосудов, адвентициальные клетки и т. д.) с FVII запускает процесс коагуляции, приводящий в итоге к образованию фибрина. На сегодняшний день нет однозначного мнения о количестве стадий данной модели гемостаза, так как не все авторы описывают в клеточной теории механизмы, препятствующие дальнейшему распространению процесса тромбообразования. М. Hoffman et al. первоначально описали три перекрывающиеся

стадии клеточной модели гемостаза: *инициация, усиление и распространение* [11]. Однако они не выделили в отдельную стадию описание процессов, препятствующих тромбообразованию вне поврежденного участка сосуда. Тем не менее сегодня некоторые авторы относят эти процессы к отдельной стадии – *терминации* [12]. Клеточная модель (рис. 2) [13], включающая разнообразную и сложную сеть факторов, позволяет лучше понимать и определять параметры, необходимые для адекватного образования тромбина, катализирующего переход фибриногена в фибрин.

РИСУНОК 2. Клеточная модель гемостаза (рисунок изменен [13])
FIGURE 2. Cell-centered model of hemostasis (the figure modified [13])



Клеточная модель гемостаза демонстрирует, что внешний и внутренний пути активации тромбина являются параллельными процессами, происходящими на клеточных поверхностях, а не дублирующими путями, как предлагала модель «водопад/каскад». Для эффективного процесса свертывания крови и формирования тромба необходимо, чтобы тромбин генерировался непосредственно на поверхности активированного тромбоцита, а не только на поверхности клеток, экспрессирующих ТФ [14]. Таким образом, тромбоциты не только участвуют в активации факторов свертывания крови, но и регулируют весь процесс коагуляции. Клеточная платформа обеспечивает условия для сборки коагуляционного комплекса в потоке и активации факторов свертывания крови точно в месте повреждения сосуда, не позволяя потоку крови уносить их в другое место.

Современная клеточная концепция также позволяет лучше понимать роль ФВ в гемостазе. С. Ferreira et al. показали, что фаза инициации остается постоянно активной с небольшим количеством активированных факторов свертывания (FVII, FX и протромбин). Гемостатический процесс переходит в фазу амплификации только при повреждении сосудистой стенки [12].

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА

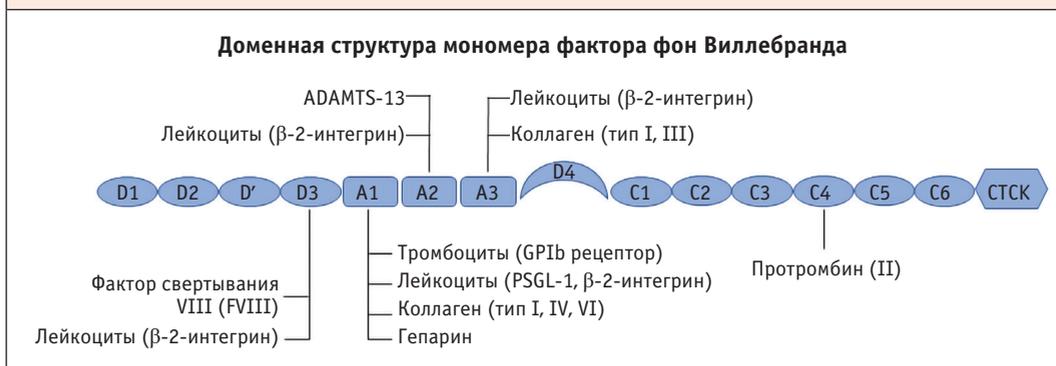
Ген и доменная структура фактора фон Виллебранда

Ген ФВ локализован в коротком плече 12-й хромосомы (12p13.2) [15]. Также в длинном плече 22-й хромосомы присутствует частичный псевдоген ФВ (22q11.2) [16]. Псевдоген дублирует часть последовательности гена ФВ с гомологией 97% и вносит вклад в спектр мутаций, приводящих к развитию БВ, за счет генной конверсии.

В 2012 г. Y. Zhou et al. [17] пересмотрели доменную структуру ФВ, которая впервые была описана в 1980-е гг. [18]. Они представили обновленную последовательность доменов ФВ на основе наблюдаемых с помощью электронной микроскопии структур в виде D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-СК (рис. 3) [17]. Домены А (А1, А2, А3) выглядят как глобулярные структуры с гидрофобным ядром и имеют основные функциональные сайты связывания с лейкоцитами, тромбоцитами, коллагеном (рис. 3). Домен А1 в основном связывается с GPIb (гликопротеином Ib) рецепторами тромбоцитов, также он может взаимодействовать с коллагенами I, IV, VI типов и гепарином. Домен А2 имеет

РИСУНОК 3. Схема доменной структуры мономера фактора фон Виллебранда

FIGURE 3. Domain structure of the von Willebrand factor monomer



сайт связывания с ADAMTS-13. Также он участвует в самоассоциации молекул ФВ. Главный сайт связывания для коллагенов находится в домене А3. Домен С4 имеет RGD (Arg-Gly-Asp) участок для взаимодействия с рецепторами α IIb β 3 (GP IIb/IIIa) тромбоцитов. D'D3 домен связывает FVIII. С-концевой домен «цистеиновый узел» (СТСК) участвует в димеризации мономеров ФВ. Домены С удлиняют и обеспечивают гибкость молекул ФВ, что важно для их функционирования при различных скоростях сдвига в потоке. Домены D принимают участие в димеризации и образовании дисульфидных связей димеров ФВ в длинные, характерные для телец ВП. ФВ связывает лейкоциты через взаимодействие домена А1 с гликопротеиновым лигандом Р-селектина (PSGL-1), доменов D'D3 и А1, А2, А3 с β -2-интегринами.

Биосинтез и процессинг фактора фон Виллебранда

ФВ синтезируется в эндотелиальных клетках и мегакариоцитах в виде препро-ФВ-молекулы. После синтеза молекула препро-ФВ, состоящая из 2813 аминокислот, включая сигнальный пептид из 22 аминокислот, пропептид из 741 аминокислоты и зрелую субъединицу из 2050 аминокислот [19], подвергается серии посттрансляционных модификаций, включая мультимеризацию. После всех посттрансляционных изменений мультимеры ФВ либо секретируются в кровотоки, либо депонируются в специализированных органеллах – тельцах ВП эндотелиальных клеток или α -гранулах тромбоцитов [20]. Мультимеризация ФВ происходит в несколько этапов.

После синтеза полипептид препро-ФВ подвергается димеризации с образованием «димерных букетов» путем образования дисульфидных связей между С-концевыми доменами по типу «хвост к хвосту» (рис. 4А).

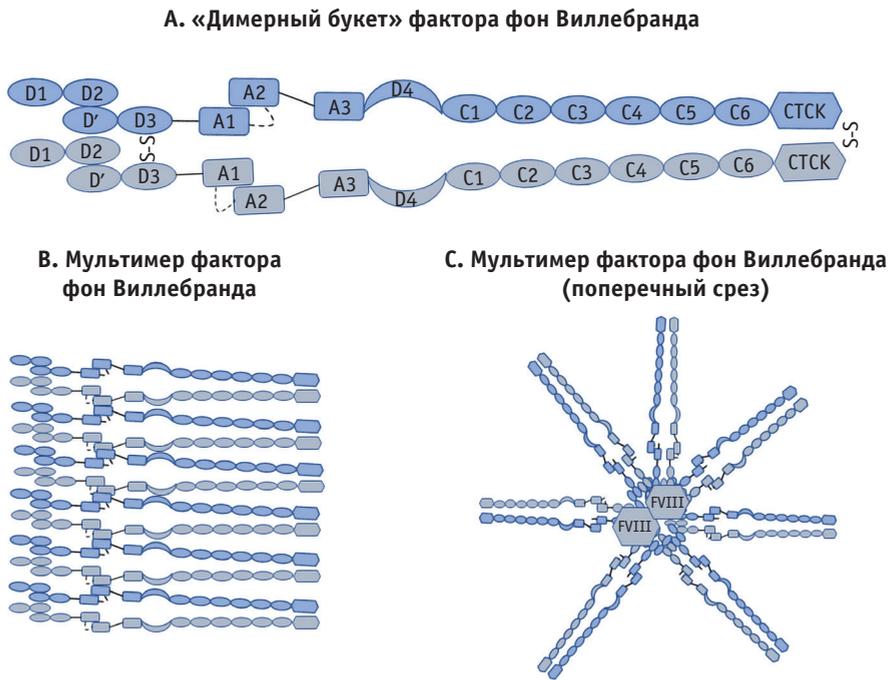
Затем димеры молекул ФВ собираются в спирали, которые соответствуют канальцам телец ВП (рис. 4В) [21]. Близкое расположение соседних D'D3 доменов в спираль способствует образованию между ними дисульфидных связей. Пропептид, состоящий из D1-D2 доменов, отщепляется в присутствии фурина, но остается ковалентно связанным с D'D3 доменом (рис. 4В) [22]. Таким образом, дисульфидные связи N-N D3-D3 и С-С СТСК-СТСК располагаются по спирали по типу «свернутой веревки» вокруг оси канальца ФВ (рис. 4С).

Гликозилирование – один из важных посттрансляционных процессов, происходящих во время мультимеризации ФВ. В эндотелиальных клетках к молекулам ФВ добавляются гликаны – детерминанты групп крови по системе АВО, соответствующие АВО-генотипу [23]. По некоторым данным, к молекулам тромбоцитарного ФВ не добавляются детерминанты групп крови АВО [19]. Конечным результатом этого дифференциального гликозилирования является то, что ФВ тромбоцитарного происхождения более устойчив к протеолизу ADAMTS-13, чем ФВ плазмы крови [24].

Хранение и высвобождение молекул фактора фон Виллебранда

Молекулы ФВ организованы в мультимеры с низкой (НМФВ), средней (СМФВ), высокой (ВМФВ) и сверхвысокой (СВМФВ) молекулярной массой. Уникальная способность ФВ к мультимеризации критически важна для понимания БВ, так как мультимерная структура обуславливает функцию ФВ. Более крупные мультимеры (ВМФВ и СВМФВ) наиболее эффективны в обеспечении гемостаза [7]. ФВ, депонированный в тельцах ВП эндотелиальных клеток и α -гранулах мегакариоцитов, представлен в основном СВМФВ-мультимерами.

РИСУНОК 4. Мультимеризация молекул фактора фон Виллебранда в процессе биосинтеза
FIGURE 4. Multimerization of von Willebrand factor molecules during biosynthesis



А – «димерный букет»; В – мультимер фактора фон Виллебранда, собранный из «димерных букетов»; С – мультимер фактора фон Виллебранда, собранный по спирали по типу «свернутой веревки» вокруг оси канала фактора фон Виллебранда. В оси канала фактора фон Виллебранда фактор свертывания VIII связан с доменом D3.

A – dimeric bouquet; B – von Willebrand factor multimer assembled from dimeric bouquets; C – von Willebrand factor multimer assembled in a spiral like a 'rolled rope' around the axis of the von Willebrand factor tubule. Coagulation factor von Willebrand factor is stored in the coagulation factor tubule associated with the D3 domain.

Секреция содержимого телец ВП и α-гранул тромбоцитов происходит двумя путями – индуцированным и конститутивным [1]. Из эндотелиальных клеток сразу после синтеза конститутивно секретируются 95% мультимеров ФВ (НМФВ, СМФВ и ВМФВ). Индуцированно из телец ВП секретируются СВМФВ. В физиологических условиях уровень ФВ в плазме крови резко повышается вследствие адренергического стресса, образования тромбина или после введения

препарата десмопрессина. Способность десмопрессина повышать уровень ФВ в плазме крови сделала его основным препаратом для лечения БВ и гемофилии [25].

Высвобождение содержимого α-гранул тромбоцитов происходит только по индуцированному пути после их активации с участием таких агонистов, как тромбин, аденозиндифосфат (АДФ), – рецепторов, активируемых протеазами 1 и 4 (PAR-1 и PAR-4) [26]. В α-гранулах тромбоцитов

содержится 15–20% мультимеров ФВ от его общего пула. Относительный вклад ФВ из эндотелиальных клеток или тромбоцитов в гемостаз в настоящее время является предметом дискуссии. Возможно, высвобождаемый из тромбоцитов ФВ может опосредовать развитие тромбоза, но не участвовать в процессе первичного гемостаза [27]. Результаты исследований последних лет свидетельствуют о том, что тромбоцитарный ФВ может вносить вклад в развитие тромбоза при ишемическом инсульте [28].

Влияние гидродинамических сил на конформацию и размер мультимеров фактора фон Виллебранда

ФВ существует в кровотоке в одной из двух конформаций – глобулярной и фибриллярной [29]. Конформация ФВ зависит от скорости сдвига кровотока (γ) в сосудах. В условиях низких скоростей сдвига (например, в венах, где $\gamma = 15\text{--}200\text{ с}^{-1}$, или в крупных артериях, где $\gamma = 300\text{--}800\text{ с}^{-1}$) ФВ представлен в глобулярной форме, которая скрывает сайты связывания и не взаимодействует с циркулирующими тромбоцитами. В случае повреждения сосуда и при высоких скоростях сдвига (например, в интактных мелких артериях и артериолах $\gamma = 450\text{--}1600\text{ с}^{-1}$, в то время как на участках с атеросклеротическим сужением просвета артерий γ может достигать $11\ 000\text{ с}^{-1}$ и выше), ФВ разворачивается и открывает сайты связывания, в частности, для GPIb рецепторов тромбоцитов (рис. 5). Изменение конформации молекулы ФВ происходит при достижении порогового значения скорости сдвига 5000 с^{-1} [29]. Механо-чувствительным элементом молекулы ФВ является домен A2. Его особенная вторичная и третичная структура позволяет осуществлять конформационный переход под действием гидродинамических сил, который далее передается на A1 и последующие домены [30, 31]. ФВ активируется

под действием скоростей сдвига не только в суспензии, но и при взаимодействии с коллагеном субэндотелиального матрикса кровеносных сосудов [32].

ФВ высвобождается в кровотоке в виде СВМФВ, которые чрезвычайно реактивны и гиперадгезивны. Они склонны к взаимодействию с тромбоцитами, вызывая их спонтанную адгезию и агрегацию, связываясь с рецепторами GPIb. Поэтому сразу после секреции молекулы ФВ подвергаются протеолизу металлопротеиназой ADAMTS-13 (дизинтегрин и металлопротеиназа с тромбоспондиновым мотивом 1-го типа, 13) [33].

ADAMTS-13 является плазменной металлопротеиназой, которая расщепляет циркулирующий ФВ между аминокислотами Тур 1605 и Met 1606 в домене A2 до более коротких, менее гемостатически активных мультимеров. Для «разрезания» СВМФВ ADAMTS-13 необходимо, чтобы ФВ развернулся в потоке и обнажил сайт расщепления в домене A2 [33]. Важно отметить, что для выполнения своих функций ADAMTS-13 также нуждается в конформационном изменении. Было показано, что активация ADAMTS-13 происходит при его взаимодействии с D4-CK фрагментом молекулы ФВ [34]. Нарушение баланса между активностью ADAMTS-13 и протеолизом ФВ может привести к ряду патологических состояний. При врожденном или приобретенном дефиците ADAMTS-13 наблюдается увеличение доли СВМФВ среди циркулирующих в крови мультимеров ФВ, что может приводить к развитию тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП) [35]. С другой стороны, усиленный протеолиз мультимеров ФВ может вызывать клинически значимые кровотечения. Например, мутантный ФВ, который присутствует при БВ типа 2А, подвержен усиленному расщеплению ADAMTS-13, что приводит к потере

ВМФВ [36]. При синдроме Хейда (Heyde) также наблюдается усиление протеолитической активности ADAMTS-13 в отношении ВМФВ, активируемых при прохождении через стенозированное устье аорты [37].

Еще одним важным механизмом в регуляции размера мультимеров ФВ, а следовательно, и его функции является процесс самоассоциации молекул ФВ (рис. 5). Конформационные изменения домена А2 способствуют гомотипическому взаимодействию между молекулами ФВ [38]. Процесс самоассоциации позволяет ФВ создавать сети, где один тромбоцит через рецепторы GPIb связывает больше одной молекулы ФВ (рис. 5). Кроме того, сети из ФВ не подвергаются расщеплению протеазой ADAMTS-13. Механо-чувствительный домен А2 обеспечивает баланс регуляции размера мультимеров ФВ, уменьшая их посредством протеолиза ADAMTS-13 и увеличивая путем самоассоциации. Регулирующим фактором в разделении этих путей, по-видимому, являются ионы Ca^{2+} . Снижение уровня Ca^{2+} способствует смещению баланса в сторону процесса самоассоциации мультимеров ФВ [38].

Таким образом, функциональное состояние молекул ФВ зависит от двух значимых механизмов – влияния условий потока крови и размера мультимеров ФВ. Развернутый ФВ открывает участки связывания с тромбоцитами, лейкоцитами и коллагенами. ФВ выполняет три основные функции: опосредование адгезии тромбоцитов к месту повреждения сосудистой стенки, связывание и защита FVIII и рекрутирование лейкоцитов для их последующей экстравазации. Помимо этих основных функций, ФВ является переносчиком в кровотоке некоторых белков (остеопротегерин, ангиопоэтин-2, галектины 1 и 3), участвует в ангиогенезе, а также пролиферации гладкомышечных клеток [39].

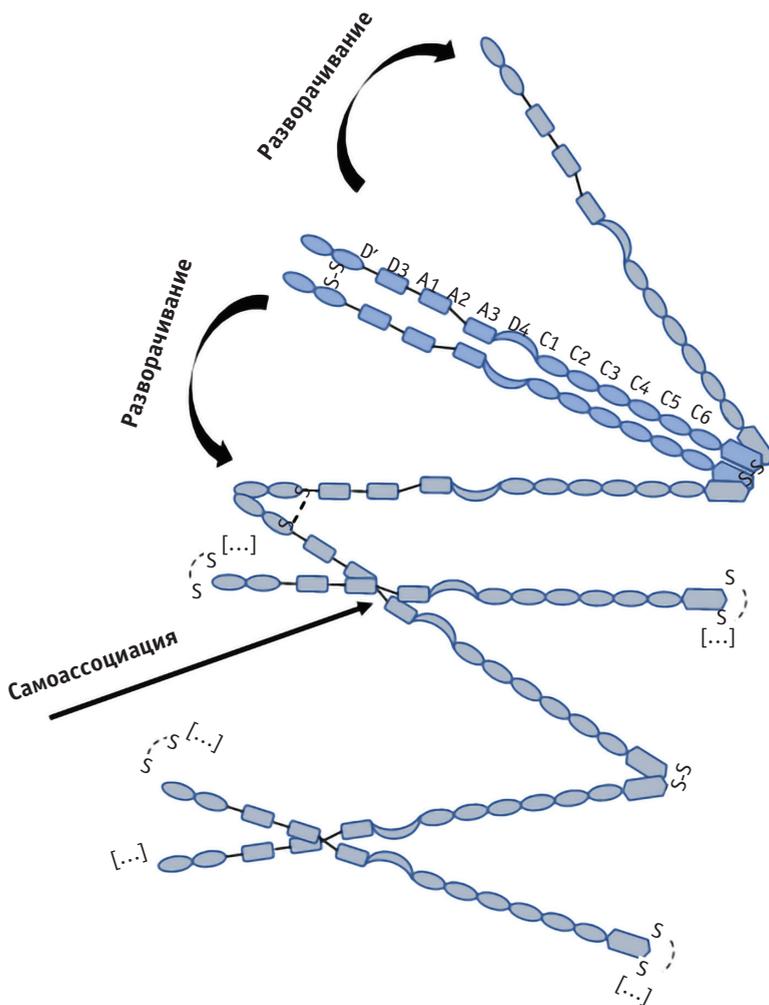
В последние годы появляется все больше данных о том, что тромбоциты не только осуществляют нормальный гемостаз и участвуют в развитии тромботических осложнений, но и играют важную роль в развитии воспалительных заболеваний [40]. Для описания взаимодействия между воспалительными и тромботическими механизмами в 2020 г. на Третьей Маастрихтской консенсусной конференции по тромбозам был предложен термин «тромбовоспаление» [41]. ФВ может представлять собой возможный связующий мост между гемостатическим и воспалительным путями, опосредующий адгезию и рекрутирование как тромбоцитов, так и лейкоцитов. Этот связующий мост – процесс, состоящий из активации эндотелия, секреции мультимеров ФВ, его разворачивания и расщепления ADAMTS-13, построения гиперадгезивных нитей ФВ, а также ФВ-опосредованной адгезии тромбоцитов [42]. ФВ может связывать тромбоз и воспаление при развитии артериального и венозного тромбоза, в том числе атеротромбоза и инсульта [42, 43].

ПАТОЛОГИИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ФАКТОРОМ ФОН ВИЛЛЕБРАНДА

В нормальных условиях молекулы ФВ и тромбоциты циркулируют в кровотоке, не взаимодействуя друг с другом. Этот баланс регулируется концентрацией ФВ и размером его молекул, скоростью сдвига в кровотоке и протеолитической активностью ADAMTS-13. При сдвиговом потоке сила, действующая на молекулу ФВ, увеличивается пропорционально квадрату длины мультимера ФВ [44]. Таким образом, обеспечивается эффективный механизм гидродинамической регуляции размеров мультимеров ФВ за счет их разворачивания и расщепления в домене А2 посредством ADAMTS-13. Активация ВМФВ гидродинамическими силами при

РИСУНОК 5. Схематическое изображение регуляции размера молекулы фактора фон Виллебранда под действием гидродинамических сил (изменен из [30])

FIGURE 5. A scheme of hydrodynamic force-induced regulation of the von Willebrand factor molecule size (modified from [30])



При высоких скоростях сдвига фактора фон Виллебранда разворачивается и открывает сайты связывания для тромбоцитов, лейкоцитов, белков и факторов свертывания. В то же время благодаря механизму трехмерного обмена развернутые димеры могут взаимодействовать друг с другом, обеспечивая самоассоциацию фактора фон Виллебранда.

At high shear rates, von Willebrand factor unfolds and presents binding sites for platelets, leukocytes, proteins, and coagulation factors. At the same time, unfolded dimers can interact with each other and self-associate through the mechanism of three-dimensional exchange.

повреждении стенки артерии необходима для обеспечения нормального гемостаза. Однако в случае патологической активации нерасщепленного ФВ (СВМФВ) при более низких физиологических скоростях сдвига может развиваться тромбоз в интактных артериях.

Нарушение этого баланса за счет изменений в каких-либо элементах может приводить к геморрагическим нарушениям (БВ, приобретенный синдром Виллебранда) или тромботическим нарушениям (ТТП). Высокий уровень ФВ в плазме крови может быть одним из факторов риска тромботических осложнений сердечно-сосудистых заболеваний. Нарушение соотношения уровня ФВ/ADAMTS-13 в плазме крови у пациентов с новой коронавирусной инфекцией связано с тяжелым течением заболевания и развитием тромбозэмболических осложнений.

Болезнь Виллебранда

БВ – наиболее распространенная патология, развивающаяся вследствие дефицита или дисфункции ФВ, наиболее частое нарушение свертываемости крови. Частота распространения БВ в популяции достигает 1% [36]. Постановка диагноза БВ может вызывать затруднения в связи с вариабельностью фенотипа кровотечения, уровня ФВ в плазме крови и классификацией заболевания по широкому спектру подтипов. Диагностический подход к БВ основан на двух основных аспектах – изучении анамнеза для оценки тяжести фенотипа кровотечений и лабораторном определении количества и активности связывания тромбоцитов и ФВ, а также активности FVIII.

Современная классификация БВ, предложенная в 2006 г. Международным обществом по тромбозу и гемостазу (ISTH), включает 3 типа БВ: тип 1 – частичный количественный дефицит ФВ, тип 2 – качественные отклонения в структуре ФВ, тип 3 – почти

полное отсутствие ФВ с очень низким уровнем FVIII. БВ типа 2 подразделяется на 4 подтипа: тип 2А характеризуется снижением или отсутствием ВМФВ, тип 2В – усилением функции ФВ с увеличением сродства к тромбоцитам, тип 2М – снижением способности ФВ связываться с тромбоцитами или коллагеном, а тип 2N – уменьшением способности ФВ связываться с FVIII [45]. В 2021 г. в рамках этой классификации была добавлена БВ типа 1С, при которой происходит повышенный клиренс ФВ, сказывающийся на его гемостатической функции [46].

БВ характеризуется чрезмерными кожно-слизистыми кровотечениями, например, носовым кровотечением, длительным кровотечением из мелких ран и полости рта, желудочно-кишечным кровотечением. Кровотечения в полость суставов развиваются в более тяжелых случаях – у пациентов с БВ типа 3, поскольку они также связаны с тяжелым дефицитом фактора свертывания VIII [47]. При БВ типа 2 и 3 также описаны ангиодисплазии желудочно-кишечного тракта [48].

Диагностика БВ основывается в первую очередь на выявлении клинических симптомов и применении лабораторных тестов – определении активности и уровня ФВ в плазме крови, а также определении активности фактора VIII. Более специализированные лабораторные методы позволяют классифицировать БВ по различным типам и подтипам. Лечение БВ основано на повышении уровня ФВ в плазме крови, которое достигается тремя основными подходами. Это заместительная терапия ФВ и FVIII, полученными из плазмы здоровых добровольцев, терапия десмопрессинем (синтетический аналог вазопрессина, стимулирующего высвобождение молекул ФВ из эндотелиальных клеток), введение рекомбинантного ФВ, одобренного к применению в 2015 г. [49].

Приобретенный синдром Виллебранда и синдром Хейда

Помимо наследственной БВ, существует приобретенный синдром Виллебранда, впервые описанный в 1968 г. J.V. Simone et al. [50]. В отличие от БВ, приобретенный синдром Виллебранда возникает у взрослых пациентов без кровотечений в личном или семейном анамнезе и часто ассоциируется со множеством основных заболеваний, таких как лимфо-, миелопролиферативные и сердечно-сосудистые заболевания. Из-за отсутствия крупных исследований фактическая распространенность приобретенного синдрома Виллебранда в общей популяции остается неопределенной и недооцененной. Одной из причин может являться гиподиагностика патологии ФВ среди пациентов с гематологическими заболеваниями, не говоря уже об иммунологических или сердечно-сосудистых.

Приобретенный синдром Виллебранда приводит к тяжелым кровотечениям не только из-за снижения уровня ФВ в плазме крови, но также из-за сопутствующего снижения уровня FVIII. Спектр кровотечений варьирует от кровотечений из сосудов слизистых оболочек, включая носовые кровотечения, кожные гематомы, гематурию и желудочно-кишечные кровотечения, до суставных и мышечных кровотечений [51]. Связь между приобретенным синдромом Виллебранда и желудочно-кишечным кровотечением была хорошо описана при синдроме Хейда в 1958 г. Долгое время считалось, что синдром Хейда развивается вследствие артериовенозных мальформаций в основном в толстой кишке. Позже при эндоскопических исследованиях были выявлены мелкие сосудистые сплетения в подслизистой оболочке кишечника [52]. Впоследствии было обнаружено, что клинические проявления синдрома Хейда эффективнее исчезают после

замены аортального клапана, чем после резекции толстой кишки [52]. Позже, в 1992 г., T.E. Warkentin et al. выдвинули гипотезу, что механические факторы в месте стенозированного аортального клапана приводят к истощению ВМФВ, в связи с чем основной причиной развития желудочно-кишечных кровотечений может быть приобретенный синдромом Виллебранда [53]. Было показано, что истощение ВМФВ усиливает васкуляризацию и ангиогенез [54], что может объяснить ангиодисплазию желудочно-кишечного тракта, наблюдаемую у пациентов с тяжелым стенозом аортального клапана и приобретенным синдромом Виллебранда.

По последним данным у 70–80% пациентов с тяжелым стенозом аортального клапана наблюдается снижение ВМФВ, однако желудочно-кишечные кровотечения (развитие синдрома Хейда) наблюдаются у 7–20% людей [55]. Синдром Хейда развивается вследствие потери ВМФВ при их прохождении через стенозированный аортальный клапан, что приводит к развитию приобретенного синдрома Виллебранда и кровотечениям из ангиодисплазии желудочно-кишечного тракта [55]. При гипертрофической кардиомиопатии с обструкцией выносящего тракта левого желудочка, выраженной митральной регургитации и использовании устройств вспомогательного кровообращения также могут возникать условия для высокоскоростных потоков, приводящих к снижению количества ВМФВ за счет усиления протеолиза ADAMTS-13 при сохранении массовой концентрации ФВ в плазме крови [52]. В работе A. Casonato et al. продемонстрированы данные о том, что за приобретенным синдромом Виллебранда может скрываться ранее не диагностированная врожденная БВ типа 2А [37].

Диагностика приобретенного синдрома Виллебранда является сложной задачей, поскольку клинические и лабораторные

характеристики частично совпадают с признаками наследственной БВ, но у пациентов отсутствуют эпизоды кровотечения в личном или семейном анамнезе. Лабораторные тесты, используемые для диагностики приобретенного синдрома Виллебранда, аналогичны применяемым при врожденной БВ. Однако наиболее важными являются оценка размеров мультимеров ФВ с помощью электрофореза, а также исследование плазмы крови на наличие антител к ФВ. Так как приобретенный синдром Виллебранда является следствием основного заболевания, важно точно его диагностировать. Лечение приобретенного синдрома Виллебранда зависит от основного заболевания. Поэтому в первую очередь необходимо корректировать первичную патологию. Например, при синдроме Хейда транскатетерная трансплантация аортального клапана снижает проявление симптомов желудочно-кишечного кровотечения [55].

Фактор фон Виллебранда и ишемическая болезнь сердца

В ряде исследований была оценена связь между уровнем ФВ в плазме крови и тромбозомболическими осложнениями сердечно-сосудистых заболеваний [56–58]. В отличие от слабой корреляции с сердечно-сосудистыми заболеваниями в общей популяции, у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) уровень ФВ в плазме крови является значимым прогностическим фактором неблагоприятных сердечно-сосудистых событий [59]. Уровень ФВ в плазме крови обычно повышается при развитии острого коронарного синдрома. Степень высвобождения ФВ в плазму крови является независимым предиктором неблагоприятного клинического исхода у таких пациентов.

Уровень ФВ в плазме крови может влиять на развитие ИБС [57]. C.D. Seaman et al. показали, что ИБС у пациентов с БВ наблюдается

реже. В регистровом исследовании, включавшем 7556 случаев, связанных с БВ, и 19 918 970 случаев, не связанных с ней, ИБС реже встречалась у пациентов с БВ (15,0%), чем у пациентов без нее (26,0%). С учетом основных факторов риска ИБС вероятность ее развития у пациентов с БВ осталась ниже, чем у пациентов без БВ [56]. Уровень ФВ в плазме крови также различается у здоровых людей и пациентов с ИБС. У 110 пациентов (средний возраст 58 ± 20 лет) с ИБС уровень ФВ в плазме составил $141,78 \pm 20,53$ МЕ/дл, тогда как в контрольной группе здоровых добровольцев уровень ФВ в плазме составил $111,95 \pm 17,15$ МЕ/дл [57].

Патофизиологические данные свидетельствуют о том, что ФВ является не только маркером, но и эффектором в патогенезе инфаркта миокарда (ИМ) [60]. ФВ синтезируется и высвобождается эндотелиальными клетками сосудов в ответ на различные стимулы, связанные с острой ишемией, включая гипоксию, воспалительные цитокины, тромбин и адреналин. ФВ играет важную роль в образовании артериальных тромбов.

ТРОМБОТИЧЕСКАЯ ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКАЯ ПУРПУРА

ТТП – это редкая жизнеугрожающая тромботическая микроангиопатия, в основе которой лежит тяжелый дефицит ADAMTS-13. При ТТП наблюдается усиление агрегации тромбоцитов с образованием тромбоцитарных (гиалиновых) тромбов, состоящих из тромбоцитов и ФВ, в мелких сосудах большинства органов. В первую очередь происходит поражение головного мозга, почек и легких. Повышенное потребление тромбоцитов приводит к развитию тромбоцитопении, а сужение просвета сосудов вызывает микроангиопатическую гемолитическую анемию (механическое разрушение эритроцитов), что приводит к ишемии важнейших органов.

Распространенность ТТП составляет примерно 10 случаев на 1 млн чел., а заболеваемость – примерно 1–2 новых случая на 1 млн чел. [61]. Выделяют два вида ТТП – наследственную и приобретенную. Наследственная ТТП встречается редко (5% от всех случаев) и вызывается рецессивными мутациями гена ADAMTS-13, приводящими к дефициту фермента. Приобретенная ТТП (95% от всех случаев) может иметь множество причин, однако наиболее распространенной является наличие аутоантител против ADAMTS-13 [61].

Первый случай ТТП был описан Мошковицем в 1924 г. у шестнадцатилетней девочки, у которой внезапно появились слабость, боль, бледность, жар и петехии [61]. В последние десятилетия был сделан ряд фундаментальных открытий, которые привели к прорыву в понимании механизма развития ТТП. В 1982 г. J.L. Moake et al. в плазме крови у пациентов с ТТП обнаружили СВМФВ, соответствующие по размеру тем, что хранятся в α -гранулах тромбоцитов и тельцах ВП эндотелиальных клеток [62]. Гипотеза J.L. Moake et al. объясняла наличие СВМФВ в плазме крови отсутствием протеазы, расщепляющей их. В 2001 г. эта протеаза была выделена, очищена и идентифицирована как ADAMTS-13 [63].

Основанием для постановки диагноза ТТП является снижение активности ADAMTS-13 < 10%. В диагностике также прибегают к оценке уровня аутоантител анти-ADAMTS-13 в плазме крови и анализу гена, кодирующего ADAMTS-13 [61].

ТТП характеризуется агрессивным течением и требует начала терапии уже в первые часы возникновения. При отсутствии адекватного оперативно назначенного лечения показатель летальности может достигать 100%. Терапия первой линии включает ежедневный плазмаферез с переливанием свежемороженой плазмы крови здоровых

добровольцев и иммуносупрессию кортикостероидами. Часто к терапии первой линии добавляют цитотоксическую терапию гуманизированными моноклональными антителами против CD20 (ритуксимаб), блокирующих выработку аутоантител против ADAMTS-13. Недавно появился препарат моноклональных антител против A1 домена ФВ (каплацизумаб), применяемый в дополнение к заместительной терапии. Он блокирует взаимодействие между СВМФВ и тромбоцитами [64]. В последние годы исследуется возможность применения рекомбинантного ADAMTS-13 для лечения врожденной формы ТТП [65]. Другим препаратом, воздействующим на ФВ, является анфибатид. Его механизм действия аналогичен механизму действия каплацизумаба [66].

Роль фактора фон Виллебранда в развитии тромботических осложнений при COVID-19

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) способствует развитию спектра поврежденных различных органов и систем. У некоторых пациентов наблюдается тяжелое течение заболевания с избыточным воспалительным ответом, которое может быть связано с коагулопатией и повреждением эндотелия [67]. У пациентов с тяжелым течением COVID-19 может повышаться высвобождение СВМФВ вследствие прямого повреждения эндотелия коронавирусом SARS-CoV-2. Это приводит к повышению потребления протеазы ADAMTS-13 и ее истощению. В результате большое количество СВМФВ может способствовать образованию микротромбов [68]. Количественный дисбаланс между ФВ и ADAMTS-13 увеличивает состояние гиперкоагуляции у пациентов с COVID-19. Таким образом, коагулопатия при COVID-19 развивается из-за нарушения соотношения ФВ/ADAMTS-13 [69–71].

Патогенез тромботических осложнений при COVID-19 может иметь сходство с патогенезом ТТП, в основе которой также лежит нарушение соотношения ФВ/ADAMTS-13.

Нарушения гемостаза при COVID-19 ассоциированы с повышенным риском летального исхода. Анализ секционных данных пациентов, погибших от COVID-19, указывает на наличие множественных геморрагических повреждений в альвеолах, помимо диффузного повреждения самих альвеол. Также отмечаются признаки тромботической микроангиопатии в легких [72]. Есть несколько потенциальных механизмов, которые могут объяснить связь между COVID-19 и коагулопатией на молекулярном и клеточном уровнях [73]. Тем не менее необходимы дополнительные исследования, чтобы полученные данные способствовали поиску новых терапевтических подходов.

Регулирующие органы здравоохранения разных стран и Всемирная организация здравоохранения рекомендуют использовать антикоагулянты (нефракционированный и низкомолекулярный гепарин) для профилактики тромботических и тромбоэмболических осложнений. Несмотря на то что ряд исследований указывает на эффективность применения антикоагулянтов в снижении внутрибольничной смертности, различия в методологии исследований, популяциях и терапевтических подходах могут влиять на достоверность результатов [74].

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИИ ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА

Существующие лабораторные методы были разработаны в первую очередь для диагностики и классификации БВ. Диагностика БВ начинается с определения уровня ФВ в плазме крови (антиген ФВ – ФВ:Аг). Уровень ФВ:Аг в плазме крови обычно анализируют

с помощью иммуноферментного анализа. Также в клиническую практику был внедрен автоматизированный метод на основе турбидиметрической оценки латексных микросфер, покрытых антителами к ФВ [25]. Однако для постановки правильного диагноза и классификации решающее значение имеет анализ функциональной активности ФВ.

1. **Анализ ристоцетин-кофакторной активности ФВ (ФВ:RCo).** ФВ:RCo основан на анализе спонтанной агрегации тромбоцитов при активации ФВ антибиотиком ристоцетином. На сегодняшний день ФВ:RCo является полностью автоматизированным тестом. На протяжении десятилетий анализ ФВ:RCo был золотым стандартом для измерения активности ФВ, что позволило накопить большой опыт его использования. Более того, большинство данных, касающихся связи уровня ФВ в плазме крови с применяемыми в лечении БВ десмопрессинном или концентратами ФВ, были получены с помощью ФВ:RCo [75]. Однако у анализа ФВ:RCo много недостатков, что осложняет стандартизацию получаемых результатов. Тесты имеют низкую чувствительность, что не позволяет оценить активность ФВ при концентрации < 10 МЕ/дл. Кроме того, поскольку соотношение ФВ:RCo/ФВ:Аг имеет важное значение для диагностики БВ, такая низкая чувствительность может привести к потенциальным ошибкам. Еще один важный недостаток заключается в том, что ФВ:RCo определяет два параметра: 1) связывание ристоцетина с ФВ и 2) связывание активированного ристоцетином ФВ с тестируемыми тромбоцитами, т. е. активация ФВ происходит нефизиологическим агентом – ристоцетином.

2. **Анализ связывания ФВ с GPIIb, иницируемого ристоцетином (ФВ:GPIIbR).** В 2000 г. K. Vanhoorelbeke et al. разработали тест на основе иммуноферментного

анализа (ИФА), в котором с помощью моноклональных антител на дно планшета были сорбированы только рецепторы тромбоцитов – рекомбинантный GPIb [76]. Впоследствии этот же принцип был использован для разработки автоматических тестов с латексными или магнитными частицами. Было показано, что эта методика имеет лучшую точность и воспроизводимость результатов, по сравнению с традиционным тестом ФВ:RCo. Автоматическое выполнение теста ФВ:GPIbR позволяет точно и с высокой чувствительностью определять активность ФВ [75].

3. Анализ связывания ФВ с мутантным GPIb с усилением функции (ФВ:GPIbM). Использование в оценке активности ФВ рекомбинантных мутантных фрагментов GPIb тромбоцитов позволяет спонтанно связываться ФВ и мутантному GPIb без ристоцетина. Опубликованные данные подтверждают, что результаты, полученные с помощью ФВ:GPIbM, соответствуют результатам оценки ФВ:RCo [77]. ФВ:GPIbM является более точным и чувствительным, чем ФВ:RCo. Кроме того, измерение ФВ:GPIbM с помощью ИФА позволит различать БВ типа 2А и 2В [75].

4. Анализ функционального состояния ФВ на основе связывания моноклональных антител (ФВ:Ab). В анализе ФВ:Ab используется наноантитело ламы, которое распознает активную конформацию ФВ (домен А1), что позволяет обнаруживать конституционально активный ФВ при БВ типа 2В и ТТП. Однако тест не позволяет оценить активность ФВ. Было показано, что результаты, полученные с использованием этого теста, соответствуют результатам, полученным с помощью ФВ:RCo [25].

5. Анализ мультимеров ФВ. Учитывая влияние размера мультимеров ФВ на его функцию, мультимерный анализ имеет важное значение как в диагностике ТТП

и определенных типов БВ, так и в выявлении дефицита ВМФВ при синдроме Хейда [78]. Однако существенные требования к опыту персонала и отсутствие стандартизации ограничивают возможности применения этого теста.

6. Анализ коллаген-связывающей функции ФВ. Способность ФВ специфически связываться с коллагеном – еще один важный показатель, который можно оценить в лабораторных условиях. Анализ способности ФВ связываться с коллагенами разных типов проводят с помощью ИФА [25]. Было показано, что коллаген-связывающая функция у ВМФВ эффективнее, чем у мультимеров меньшего размера. Поэтому этот тест также может быть использован для определения мультимерного состава пула ФВ [25].

Таким образом, для диагностики БВ и ее типов необходим широкий набор тестов. Чтобы упростить тестирование (например, при скрининге нарушений свертываемости крови или в условиях неотложной помощи) необходимо иметь тест, который может быстро исключить БВ или какой-либо дефект тромбоцитов. В качестве такого теста было предложено устройство Platelet Function Analyzer 100 (PFA-100), в котором анализируются образцы цельной крови. Для выполнения анализа необходимо всего 5 мин [79]. В тесте PFA-100 образец цельной крови движется через узкое отверстие в мембране, покрытое коллагеном и активаторами тромбоцитов, такими как АДФ или адреналин. Система измеряет время от начала движения образца крови через мембрану до полного закрытия отверстия (время закрытия). Скорости сдвига в отверстии достигают $5000-6000\text{ с}^{-1}$, что достаточно для активации ФВ. Однако PFA-100 предназначен для оценки первичного гемостаза и не позволяет исследовать исключительно гемостатическую функцию ФВ. Таким образом, в настоящее

время нет широкодоступного теста, который измерял бы гемостатическую функцию ФВ в зависимости от скорости сдвига.

МИКРОФЛЮИДНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕМОСТАЗА

Микрофлюидные устройства выполняют измерения в микрообъемах жидкостей. Хотя микрофлюидные устройства могут быть изготовлены из металла, стекла или пластмасс, в настоящее время в биологических исследованиях в большинстве случаев используют полимер полидиметилсилоксан (ПДМС). Этот силиконовый каучук является простым в использовании, недорогим, биосовместимым и прозрачным, что делает камеры из ПДМС экономичными одно-разовыми устройствами для исследования тромбообразования.

Технологию создания проточных камер из ПДМС с помощью фотолитографии предложили в 1998 г. D.C. Duffy et al. [80]. Несмотря на то что технологии создания проточных камер из ПДМС были разработаны еще в 1990-е гг., для исследования адгезионной функции тромбоцитов в составе микрофлюидных устройств они начали применяться примерно через 15 лет – в 2008 г. Стоит отметить, что сам термин «микрофлюидика» вошел в широкое использование вместе с появлением первых работ по изучению адгезии клеток в проточных камерах на основе ПДМС в 2004 г. [26]. K.V. Neeves et al. в 2008 г. предложил 13-канальное микрофлюидное устройство на основе ПДМС для анализа адгезии тромбоцитов к коллагену I типа, адсорбированному на стеклянную подложку перпендикулярно потоку, при скоростях сдвига, соответствующих артериям и венам, в объеме крови 100 мкл у мышей [81].

Микрофлюидные технологии использовались в исследованиях взаимодействия

тромбоцитов с ФВ [82]. Использование микрофлюидных технологий также внесло значительный вклад в изучение биологии ФВ. В работе Y. Zheng et al. было показано, что при стимулировании высвобождения СВМФВ из эндотелиальных клеток молекулы ФВ образуют тяжи [83]. Это позволило предположить, что скорость потока влияет на конформацию ФВ. Эксперименты с помощью микрофлюидных технологий сыграли важную роль в исследовании функции ADAMTS-13, который расщепляет ФВ и модулирует его протромботическую активность [84].

Способы детектирования адгезировавших тромбоцитов в микрофлюидных устройствах, как правило, аналогичны методам, используемым в плоскопараллельных камерах [85]. Наиболее распространенными методами являются фазово-контрастная, флуоресцентная и сканирующая электронная микроскопия. Также объединяют несколько методов микроскопии для повышения чувствительности анализа адгезировавших тромбоцитов, а именно комбинируют исследование с помощью флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения, высокоскоростной эпифлуоресцентной и дифференциально-интерференционной контрастной микроскопии [86]. Тем не менее остается необходимость разработки надежной автоматизированной процедуры анализа изображений для количественной оценки адгезии тромбоцитов в реальном времени.

На сегодняшний день опубликовано множество обзоров по теме создания и применения микрофлюидных технологий в фундаментальных и прикладных исследованиях, ограничениях и перспективах их использования в клинических условиях [87–91]. Тем не менее проблема быстрого и доступного детектирования адгезии клеток крови, в том числе тромбоцитов, до сих пор не решена.

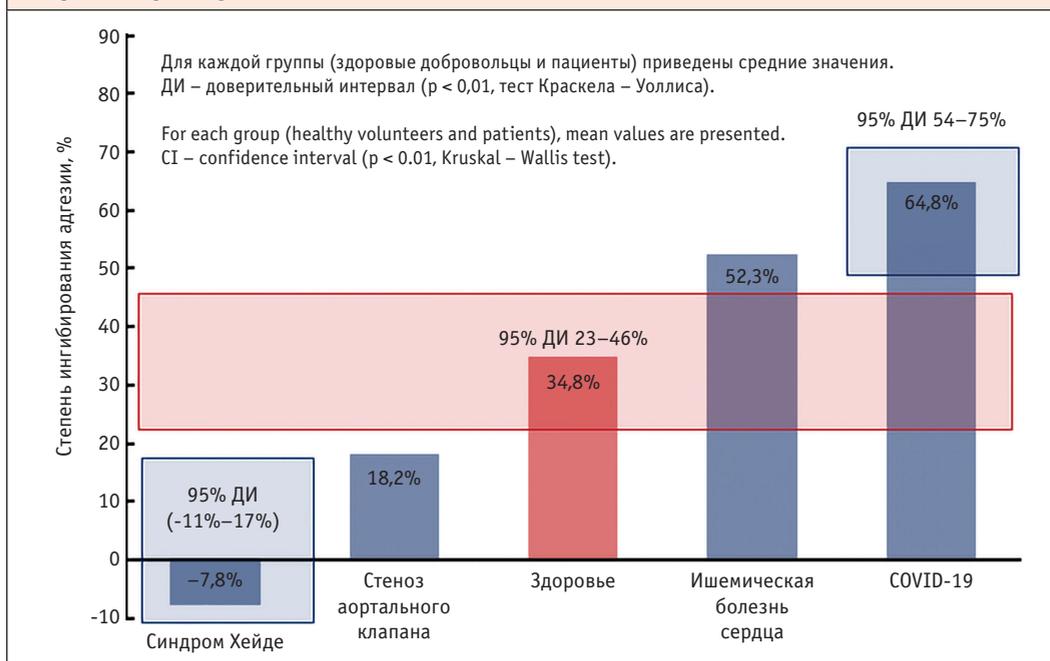
Кроме того, несмотря на достаточное количество современных работ, описывающих методики измерения адгезии клеток крови, в частности тромбоцитов, не происходит внедрения этих тестов в клиническую практику из-за трудоемкости, дороговизны оборудования и программного обеспечения, а также длительности выполнения измерений [92].

В нашей лаборатории была создана и апробирована методика исследования нарушений клеточного гемостаза на основе микрофлюидной технологии, имитирующей ток крови в сосудах. В разработанной методике реализован простой метод детекции адгезировавших клеток к оптической подложке, который позволяет быстро оценивать интенсивность адгезии клеток крови

к белковому покрытию. Подробное описание метода и самой микрофлюидной системы дано в публикациях [93–95]. С помощью разработанного устройства был исследован вклад взаимодействия ФВ и GPIIb тромбоцитов в адгезию клеток крови к фибриногену в потоке в цельной крови у пациентов с синдромом Хейда, тяжелым стенозом аортального клапана, ИБС, а также COVID-19. На *рис. 6* продемонстрированы суммарные данные вклада взаимодействий ФВ и тромбоцитов в адгезию клеток крови к фибриногену в условиях потока.

Снижение и отсутствие выраженного вклада ФВ в адгезию клеток крови к фибриногену при высоких скоростях сдвига у пациентов с тяжелым стенозом аортального клапана

РИСУНОК 6. Степень ингибирования адгезии клеток крови к фибриногену при блокировании GPIIb рецепторов тромбоцитов в цельной крови здоровых добровольцев и пациентов с синдромом Хейда, тяжелым стенозом аортального клапана, ранней ишемической болезнью сердца и COVID-19
FIGURE 6. Degree of inhibition of GPIIb-mediated platelet adhesion to a fibrinogen-coated surface in whole blood of healthy volunteers and patients with Heyde syndrome, severe aortic valve stenosis, early coronary artery disease and COVID-19



и синдромом Хейда может свидетельствовать о снижении количества гемостатически активных ВМФВ (приобретенный синдром Виллебранда) в отсутствие снижения уровня ФВ в плазме крови. У пациентов с ИБС блокирование взаимодействия ФВ и GPIb рецепторов тромбоцитов также приводило к значимому ингибированию адгезии клеток крови (на 50,5%).

Следует отметить, что препаратов, воздействующих на ФВ и одобренных для применения в терапии сердечно-сосудистых заболеваний, в настоящее время нет. Единственный препарат, блокирующий взаимодействие ФВ и рецепторы GPIb тромбоцитов и одобренный для клинического применения, – каплацизумаб [96]. Он представляет собой гуманизированное двухвалентное наноантитело, которое специфически блокирует сайты связывания GPIb в домене A1 ФВ. Исследования безопасности и эффективности каплацизумаба у пациентов с ИБС немногочисленны.

Результаты, полученные в исследовании адгезии клеток крови к фибриногену в условиях потока в цельной крови пациентов с COVID-19, указывают на вклад ФВ в тромбовоспалительный каскад патогенеза тяжелой формы COVID-19. Вклад ФВ в адгезию клеток крови к фибриногену у пациентов с COVID-19 значительно превышает аналогичный вклад у здоровых добровольцев. У пациентов с COVID-19 также наблюдалось

повышение уровня ФВ в плазме крови, по сравнению со здоровыми добровольцами. У большей части пациентов в исследовании был зафиксирован летальный исход от осложнений новой коронавирусной инфекции. Повышение уровня ФВ в плазме крови у пациентов с COVID-19 было отмечено и другими исследователями [71]. Таким образом, ФВ может играть важную роль в активации тромбовоспалительного каскада при COVID-19.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патологическая активация ФВ играет ключевую роль в развитии артериального тромбоза, а дефицит или дисфункция ФВ могут приводить к кровотечениям. Исследование функции ФВ может иметь значение не только при БВ и ТТП, при которых изучение обусловленного патологией ФВ нарушений гемостаза обязательно, но и при сердечно-сосудистых заболеваниях, в развитии которых ФВ также может иметь значение. Однако большинство применяемых диагностических тестов не учитывают роли гидродинамических сил в активации ФВ. Для исследования функции ФВ с учетом воздействия гидродинамических сил могут использоваться микрофлюидные системы, однако в настоящее время они не применяются в клинической практике.

Поступила / Received 15.11.2022
Поступила после рецензирования / Revised 29.11.2022
Принята в печать / Accepted 30.11.2022

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Lenting P.J., Christophe O.D., Denis C.V. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood*. 2015;125(13):2019–2028. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-528406>.
2. Von Willebrand E.A. Hereditary pseudothrombophilia. *Haemophilia*. 1999;5(3):223–231. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.1999.00302.x>.
3. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:395–424. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.395>.
4. Davie E.W., Ratnoff O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*. 1964;145(3638):1310–1312. <https://doi.org/10.1126/science.145.3638.1310>.

5. Macfarlane R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*. 1964;202:498–499. <https://doi.org/10.1038/202498a0>.
6. McMichael M. New models of hemostasis. *Top Companion Anim Med*. 2012;27(2):40–45. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2012.07.005>.
7. Reininger A.J. Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemophilia*. 2008;14(Suppl. 5):11–26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01848.x>.
8. Zimmerman T.S., Ratnoff O.D., Powell A.E. Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor 8 deficiency) and von Willebrand's disease, with observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proaccelerin (factor V) and on an acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor. *J Clin Invest*. 1971;50(1):244–254. <https://doi.org/10.1172/JCI106480>.
9. Kiouptsi K., Reinhardt C. Physiological Roles of the von Willebrand Factor-Factor VIII Interaction. *Subcell Biochem*. 2020;94:437–464. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_18.
10. Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev*. 2003;17(Suppl. 1):S1–5. [https://doi.org/10.1016/s0268-960x\(03\)90000-2](https://doi.org/10.1016/s0268-960x(03)90000-2).
11. O'Donnell J.S., O'Sullivan J.M., Preston R.J.S. Advances in understanding the molecular mechanisms that maintain normal haemostasis. *Br J Haematol*. 2019;186(1):24–36. <https://doi.org/10.1111/bjh.15872>.
12. Ferreira C.N., Sousa M de O., Dusse L.M.S., Carvalho M das G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(5):416–421. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010000500016>.
13. Счастливец И.В., Лобастов К.В., Цаплин С.Н., Мкртычев Д.С. Современный взгляд на систему гемостаза: клеточная теория. *Медицинский совет*. 2019;(16):72–77. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-16-72-77>.
14. Schastlivtsev I.V., Lobastov K.V., Tsaplin S.N., Mkrtychev D.S. Modern view on hemostasis system: cell theory. *Meditsinskiy Sovet*. 2019;(16):72–77. (In Russ.) <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-16-72-77>.
15. Smith S.A. The cell-based model of coagulation. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2009;19(1):3–10. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2009.00389.x>.
16. Ginsburg D., Handin R.I., Bonthron D.T., Donlon T.A., Bruns G.A., Latt S.A., Orkin S.H. Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science*. 1985;228(4706):1401–1406. <https://doi.org/10.1126/science.3874428>.
17. Patracchini P., Calzolari E., Aiello V., Palazzi P., Banin P., Marchetti G., Bernardi F. Sublocalization of von Willebrand factor pseudogene to 22q11.22-q11.23 by in situ hybridization in a 46,X,t(X;22)(pter;q11.21) translocation. *Hum Genet*. 1989;83(3):264–266. <https://doi.org/10.1126/10.1007/BF00285168>.
18. Zhou Y.F., Eng E.T., Zhu J., Lu C., Walz T., Springer T.A. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood*. 2012;120(2):449–458. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-405134>.
19. Pannekoek H., Voorberg J. Molecular cloning, expression and assembly of multimeric von Willebrand factor. *Baillieres Clin Haematol*. 1989;2(4):879–896. [https://doi.org/10.1016/s0950-3536\(89\)80050-2](https://doi.org/10.1016/s0950-3536(89)80050-2).
20. James P., Rydz N. Chapter 138 – Structure, Biology, and Genetics of von Willebrand Factor. In: Hoffman R., Benz E.J. Jr, Silberstein L.E., Heslop H.E., Weitz J.I., Anastasi J. *Hematology*. Elsevier; 2018, pp. 2051–2063. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35762-3.00138-4>.
21. Springer T.A. Biology and physics of von Willebrand factor concatamers. *J Thromb Haemost*. 2011;9(Suppl. 1):130–143. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04320.x>.
22. Berriman J.A., Li S., Hewlett L.J., Wasilewski S., Kiskin F.N., Carter T. et al. Structural organization of Weibel-Palade bodies revealed by cryo-EM of vitrified endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(41):17407–17412. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902977106>.
23. Van de Ven W.J., Voorberg J., Fontijn R., Pannekoek H., van den Ouweland A.M., van Duijnhoven H.L. et al. Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol Biol Rep*. 1990;14(4):265–275. <https://doi.org/10.1007/BF00429896>.
24. Matsui T., Titani K., Mizuochi T. Structures of the asparagine-linked oligosaccharide chains of human von Willebrand factor. Occurrence of blood group A, B, and H(O) structures. *J Biol Chem*. 1992;267(13):8723–8731. Available at: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)50338-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)50338-6/pdf).
25. Bowen D.J. An influence of ABO blood group on the rate of proteolysis of von Willebrand factor by ADAMTS13. *J Thromb Haemost*. 2003;1(1):33–40. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00007.x>.
26. Ng C.J., Di Paola J. von Willebrand Disease: Diagnostic Strategies and Treatment Options. *Pediatr Clin North Am*. 2018;65(3):527–541. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2018.02.004>.

26. Jonnalagadda D., Izu L.T., Whiteheart S.W. Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner. *Blood*. 2012;120(26):5209–5216. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-445080>.
27. Blair P., Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. 2009;23(4):177–189. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2009.04.001>.
28. Kim D.A., Ashworth K.J., Di Paola J., Ku D.N. Platelet α -granules are required for occlusive high-shear-rate thrombosis. *Blood Adv*. 2020;4(14):3258–3267. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002117>.
29. Schneider S.W., Nuschele S., Wixforth A., Gorzelanny C., Alexander-Katz A., Netz R.R., Schneider M.F. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(19):7899–903. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608422104>.
30. Lancellotti S., Sacco M., Basso M., De Cristofaro R. Mechanochemistry of von Willebrand factor. *Biomol Concepts*. 2019;10(1):194–208. <https://doi.org/10.1515/bmc-2019-0022>.
31. Zhang Q., Zhou Y.F., Zhang C.Z., Zhang X., Lu C., Springer T.A. Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(23):9226–9231. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903679106>.
32. Bryckaert M., Rosa J.P., Denis C.V., Lenting P.J. Of von Willebrand factor and platelets. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(2):307–326. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1743-8>.
33. South K., Lane D.A. ADAMTS-13 and von Willebrand factor: a dynamic duo. *J Thromb Haemost*. 2018;16(1):6–18. <https://doi.org/10.1111/jth.13898>.
34. South K., Luken B.M., Crawley J.T., Phillips R., Thomas M., Collins R.F. et al. Conformational activation of ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(52):18578–18583. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411979112>.
35. Saha M., McDaniel J.K., Zheng X.L. Thrombotic thrombocytopenic purpura: pathogenesis, diagnosis and potential novel therapeutics. *J Thromb Haemost*. 2017;15(10):1889–1900. <https://doi.org/10.1111/jth.13764>.
36. Fogarty H., Doherty D., O'Donnell J.S. New developments in von Willebrand disease. *Br J Haematol*. 2020;191(3):329–339. <https://doi.org/10.1111/bjh.16681>.
37. Casonato A., Galletta E., Cella G., Barbon G., Daidone V. Acquired von Willebrand Syndrome Hiding Inherited von Willebrand Disease Can Explain Severe Bleeding in Patients With Aortic Stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(9):2187–2194. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314656>.
38. Zhang C., Kelkar A., Neelamegham S. von Willebrand factor self-association is regulated by the shear-dependent unfolding of the A2 domain. *Blood Adv*. 2019;3(7):957–968. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018030122>.
39. Rauch A., Wohner N., Christophe O.D., Denis C.V., Susen S., Lenting P.J. On the versatility of von Willebrand factor. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013;5(1):e2013046. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2013.046>.
40. Nicolai L., Massberg S. Platelets as key players in inflammation and infection. *Curr Opin Hematol*. 2020;27(1):34–40. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000551>.
41. D'alessandro E., Becker C., Bergmeier W., Bode C., Bourne J.H., Brown H. et al. Thrombo-Inflammation in Cardiovascular Disease: An Expert Consensus Document from the Third Maastricht Consensus Conference on Thrombosis. *Thromb Haemost*. 2020;120(4):538–564. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1708035>.
42. Chen J., Chung D.W. Inflammation, von Willebrand factor, and ADAMTS13. *Blood*. 2018;132(2):141–147. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-02-769000>.
43. Nieswandt B., Kleinschnitz C., Stoll G. Ischaemic stroke: a thrombo-inflammatory disease? *J Physiol*. 2011;589(17):4115–4123. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.212886>.
44. Zhang X., Halvorsen K., Zhang C.Z., Wong W.P., Springer T.A. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science*. 2009;324(5932):1330–1334. <https://doi.org/10.1126/science.1170905>.
45. Sadler J.E., Budde U., Eikenboom J.C., Favaloro E.J., Hill F.G., Holmberg L. et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee of von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost*. 2006;4(10):2103–2114. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02146.x>.
46. James P.D., Connell N.T., Ameer B., Di Paola J., Eikenboom J., Giraud N. et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood Adv*. 2021;5(1):280–300. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003265>.
47. Van Galen K.P., Mauer-Bunschoten E.P., Leebeek F.W. Hemophilic arthropathy in patients with von Willebrand disease. *Blood Rev*. 2012;26(6):261–266. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.09.002>.
48. Calmette L., Clauser S. La maladie de Willebrand. *Rev Med Interne*. 2018;39(12):918–924. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2018.08.005>.

49. Leebeek F.W., Eikenboom J.C. Von Willebrand's Disease. *N Engl J Med.* 2016;375(21):2067–2080. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1601561>.
50. Simone J.V., Cornet J.A., Abildgaard C.F. Acquired von Willebrand's syndrome in systemic lupus erythematosus. *Blood.* 1968;31(6):806–812. <https://doi.org/10.1182/blood.V31.6.806.806>.
51. Leebeek F.W.G. New Developments in Diagnosis and Management of Acquired Hemophilia and Acquired von Willebrand Syndrome. *Hemasphere.* 2021;5(6):e586. <https://doi.org/10.1097/H59.0000000000000586>.
52. Ibrahim H., Rondina M.T., Kleiman N.S. Von Willebrand factor and the aortic valve: Concepts that are important in the transcatheter aortic valve replacement era. *Thromb Res.* 2018;170:20–27. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.07.028>.
53. Warkentin T.E., Moore J.C., Morgan D.G. Aortic stenosis and bleeding gastrointestinal angiodysplasia: is acquired von Willebrand's disease the link? *Lancet.* 1992;340(8810):35–37. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92434-h](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92434-h).
54. Randi A.M., Smith K.E., Castaman G. von Willebrand factor regulation of blood vessel formation. *Blood.* 2018;132(2):132–140. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-01-769018>.
55. Theis S.R., Turner S.D. *Heyde Syndrome.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551625/>.
56. Seaman C.D., Yabes J., Comer D.M., Ragni M.V. Does deficiency of von Willebrand factor protect against cardiovascular disease? Analysis of a national discharge register. *J Thromb Haemost.* 2015;13(11):1999–2003. <https://doi.org/10.1111/jth.13142>.
57. Xu A.G., Xu R.M., Lu C.Q., Yao M.Y., Zhao W., Fu X. et al. Correlation of von Willebrand factor gene polymorphism and coronary heart disease. *Mol Med Rep.* 2012;6(5):1107–1110. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.1037>.
58. Thompson S.G., Kienast J., Pyke S.D., Haverkate F., van de Loo J.C. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med.* 1995;332(10):635–641. <https://doi.org/10.1056/NEJM199503093321003>.
59. Spiel A.O., Gilbert J.C., Jilma B. von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes. *Circulation.* 2008;117(11):1449–1459. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.722827>.
60. Morange P.E., Simon C., Alessi M.C., Luc G., Arveiler D., Ferrieres J. et al. Endothelial cell markers and the risk of coronary heart disease: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME) study. *Circulation.* 2004;109(11):1343–1348. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000120705.55512.EC>.
61. Joly B.S., Coppo P., Veyradier A. An update on pathogenesis and diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Expert Rev Hematol.* 2019;12(6):383–395. <https://doi.org/10.1080/17474086.2019.1611423>.
62. Moake J.L., Rudy C.K., Troll J.H., Weinstein M.J., Colannino N.M., Azocar J. et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1982;307(23):1432–1435. <https://doi.org/10.1056/NEJM198212023072306>.
63. Fujikawa K., Suzuki H., McMullen B., Chung D. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood.* 2001;98(6):1662–1666. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.6.1662>.
64. Hollifield A.L., Arnall J.R., Moore D.C. Caplacizumab: an anti-von Willebrand factor antibody for the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Health Syst Pharm.* 2020;77(15):1201–1207. <https://doi.org/10.1093/ajhp/zxaa151>.
65. Scully M., Knöbl P., Kentouche K., Rice L., Windyga J., Schneppenheim R. et al. Recombinant ADAMTS-13: first-in-human pharmacokinetics and safety in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2017;130(19):2055–2063. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-788026>.
66. Bhogal P., Jensen M., Hart D., Makalanda L., Collins G.B., Spooner O., Jaffer O. Von Willebrand factor. *Clin Med (Lond).* 2020;20(6):e279. <https://doi.org/10.7861/clinmed.let.20.6.3>.
67. Wool G.D., Miller J.L. The Impact of COVID-19 Disease on Platelets and Coagulation. *Pathobiology.* 2021;88(1):15–27. <https://doi.org/10.1159/000512007>.
68. Mancini I., Baronciani L., Artoni A., Colpani P., Biganzoli M., Cozzi G. et al. The ADAMTS13-von Willebrand factor axis in COVID-19 patients. *J Thromb Haemost.* 2021;19(2):513–521. <https://doi.org/10.1111/jth.15191>.
69. Лянгузов А.В., Сергунина О.Ю., Игнатъев С.В., Ковтунова М.Е., Калинина С.Л., Семакин А.С. Роль фактора фон Виллебранда в развитии системного воспаления, коагулопатии и органических дисфункций. *Тромбоз, гемостаз и реология.* 2021;(3):4–11. <https://doi.org/10.25555/THR.2021.3.0979>.
- Lyanguzov A.V., Sergunina O.Yu., Ignatiev S.V., Kovtunova M.E., Kalinina S.L., Semakin A.S. The role of von Willebrand factor in the development of systemic inflammation, coagulopathy and organ dysfunctions. *Tromboz, Gemostaz I Reologiya.* 2021;(3):4–11. (In Russ.) <https://doi.org/10.25555/THR.2021.3.0979>.

70. Favalaro E.J., Henry B.M., Lippi G. Increased VWF and Decreased ADAMTS-13 in COVID-19: Creating a Milieu for (Micro)Thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2021;47(4):400–418. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1727282>.
71. Ladikou E.E., Sivaloganathan H., Milne K.M., Arter W.E., Ramasamy R., Saad R. et al. Von Willebrand factor (vWF): marker of endothelial damage and thrombotic risk in COVID-19? *Clin Med (Lond)*. 2020;20(5):e178–e182. <https://doi.org/10.7861/clinmed.2020-0346>.
72. Зайратьянц О.В. (ред.). *Патологическая анатомия COVID-19: атлас*. М.: ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ»; 2020. 140 с. Режим доступа: <https://niiroz.ru/upload/medialibrary/2c5/2c5e36822be6633e1cbd2e72058720ae.pdf>. Zayratyants O.V. (ed.). *The pathological anatomy of COVID-19: an atlas*. Moscow: Research Institute of Health Organization and Medical Management; 2020. 140 p. (In Russ.) Available at: <https://niiroz.ru/upload/medialibrary/2c5/2c5e36822be6633e1cbd2e72058720ae.pdf>.
73. Ali M.A.M., Spinler S.A. COVID-19 and thrombosis: From bench to bedside. *Trends Cardiovasc Med.* 2021;31(3):143–160. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2020.12.004>.
74. Parisi R., Costanzo S., Di Castelnuovo A., de Gaetano G., Donati M.B., Iacoviello L. Different Anticoagulant Regimens, Mortality, and Bleeding in Hospitalized Patients with COVID-19: A Systematic Review and an Updated Meta-Analysis. *Semin Thromb Hemost.* 2021;47(4):372–391. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1726034>.
75. Bodó I., Eikenboom J., Montgomery R., Patzke J., Schneppenheim R., Di Paola J. Platelet-dependent von Willebrand factor activity. Nomenclature and methodology: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2015;13(7):1345–1350. <https://doi.org/10.1111/jth.12964>.
76. Vanhoorelbeke K., Cauwenberghs N., Vauterin S., Schlamadinger A., Mazurier C., Deckmyn H. A reliable and reproducible ELISA method to measure ristocetin cofactor activity of von Willebrand factor. *Thromb Haemost.* 2000;83(1):107–113. <http://doi.org/10.1055/s-0037-1613765>.
77. Lawrie A.S., Stufano F., Canciani M.T., Mackie I.J., Machin S.J., Peyvandi F. A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity. *Haemophilia.* 2013;19(2):338–342. <http://doi.org/10.1111/hae.12064>.
78. Kasai M., Osako M., Inaba Y., Yamabe K., Aoki M. Acquired von Willebrand syndrome secondary to mitral and aortic regurgitation. *J Card Surg.* 2020;35(9):2396–2398. <http://doi.org/10.1111/jocs.14796>.
79. Favalaro E.J. The Platelet Function Analyser (PFA)-100 and von Willebrand disease: a story well over 16 years in the making. *Haemophilia.* 2015;21(5):642–645. <http://doi.org/10.1111/hae.12710>.
80. Duffy D.C., McDonald J.C., Schueller O.J., Whitesides G.M. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem.* 1998;70(23):4974–4984. <http://doi.org/10.1021/ac980656z>.
81. Neeves K.B., Maloney S.F., Fong K.P., Schmaier A.A., Kahn M.L., Brass L.F., Diamond S.L. Microfluidic focal thrombosis model for measuring murine platelet deposition and stability: PAR4 signaling enhances shear-resistance of platelet aggregates. *J Thromb Haemost.* 2008;6(12):2193–2201. <http://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03188.x>.
82. Tischer A., Madde P., Blancas-Mejia L.M., Auton M. A molten globule intermediate of the von Willebrand factor A1 domain firmly tethers platelets under shear flow. *Proteins.* 2014;82(5):867–878. <http://doi.org/10.1002/prot.24464>.
83. Zheng Y., Chen J., Craven M., Choi N.W., Totorica S., Diaz-Santana A. et al. In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(24):9342–9347. <http://doi.org/10.1073/pnas.1201240109>.
84. Bao J., Xiao J., Mao Y., Zheng X.L. Carboxyl terminus of ADAMTS13 directly inhibits platelet aggregation and ultra large von Willebrand factor string formation under flow in a free-thiol-dependent manner. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(2):397–407. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.302547>.
85. Van Kruchten R., Cosemans J.M., Heemskerck J.W. Measurement of whole blood thrombus formation using parallel-plate flow chambers – a practical guide. *Platelets.* 2012;23(3):229–242. <http://doi.org/10.3109/09537104.2011.630848>.
86. Nesbitt W.S., Tovar-Lopez F.J., Westein E., Harper I.S., Jackson S.P. A multimode-TIRFM and microfluidic technique to examine platelet adhesion dynamics. *Methods Mol Biol.* 2013;1046:39–58. http://doi.org/10.1007/978-1-62703-538-5_3.
87. Branchford B.R., Ng C.J., Neeves K.B., Di Paola J. Microfluidic technology as an emerging clinical tool to evaluate thrombosis and hemostasis. *Thromb Res.* 2015;136(1):13–19. <http://doi.org/10.1016/j.thromres.2015.05.012>.
88. Neeves K.B., Onasoga A.A., Wufsus A.R. The use of microfluidics in hemostasis: clinical diagnostics and biomimetic models of vascular injury. *Curr Opin Hematol.* 2013;20(5):417–423. <http://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3283642186>.
89. Colace T.V., Tormoen G.W., McCarty O.J., Diamond S.L. Microfluidics and coagulation biology. *Annu Rev Biomed Eng.* 2013;15:283–303. <http://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071812-152406>.

90. Hastings S.M., Griffin M.T., Ku D.N. Hemodynamic studies of platelet thrombosis using microfluidics. *Platelets*. 2017;28(5):427–433. <http://doi.org/10.1080/09537104.2017.1316483>.
91. Brouns S.L.N., van Geffen J.P., Heemskerk J.W.M. High-throughput measurement of human platelet aggregation under flow: application in hemostasis and beyond. *Platelets*. 2018;29(7):662–669. <http://doi.org/10.1080/09537104.2018.1447660>.
92. Schoeman R.M., Lehmann M., Neeves K.B. Flow chamber and microfluidic approaches for measuring thrombus formation in genetic bleeding disorders. *Platelets*. 2017;28(5):463–471. <http://doi.org/10.1080/09537104.2017.1306042>.
93. Автаева Ю.Н., Мельников И.С., Габбасов З.А. Регистрация в реальном времени адгезии тромбоцитов на иммобилизованном на оптической подложке фибриногеновом покрытии в условиях потока. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2018;(1):48–52. Режим доступа: <http://iramn.ru/journals/ktbm/2018/3/1038/>.
Avtaeva Yu.N., Melnikov I.S., Gabbasov Z.A. Real-Time Recording of Platelet Adhesion to Fibrinogen-Coated Surface under Flow Conditions. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018;165(1):157–160. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4119-5>.
94. Автаева Ю.Н., Мельников И.С., Охота С.Д., Зозуля Н.И., Габбасов З.А. Кинетика адгезии тромбоцитов к покрытой белком поверхности в образцах цельной крови в условиях высоких скоростей потока. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020;169(2):188–192. Режим доступа: <http://iramn.ru/journals/bbm/2020/2/4778/>.
Avtaeva Yu.N., Melnikov I.S., Okhota S.D., Zozulya N.I., Gabbasov Z.A. Kinetics of Platelet Adhesion to Protein-Coated Surface in Whole Blood Samples at High Flow Rates. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020;169(2):229–232. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04856-z>.
95. Gabbasov Z.A., Avtaeva Y.N., Melnikov I.S., Okhota S.D., Caprnda M., Mozos I. et al. Kinetics of platelet adhesion to a fibrinogen-coated surface in whole blood under flow conditions. *J Clin Lab Anal*. 2021;35(9):e23939. <https://doi.org/10.1002/jcla.23939>.
96. Scully M., Cataland S.R., Peyvandi F., Coppo P., Knöbl P., Kremer Hovinga J.A. et al. Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med*. 2019;380(4):335–346. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1806311>.

Информация об авторах:

Автаева Юлия Николаевна, к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории клеточного гемостаза, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова; 121552, Россия, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а; <https://orcid.org/0000-0002-3701-9747>; julia_94fs@mail.ru

Мельников Иван Сергеевич, научный сотрудник лаборатории клеточного гемостаза, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова; 121552, Россия, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а; младший научный сотрудник лаборатории газообмена, биомеханики и барофизиологии, Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук; 123007, Россия, Москва, Хорошевское шоссе, д. 76а; <https://orcid.org/0000-0001-5241-3091>; ivsgm@mail.ru

Васильев Сергей Александрович, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник, Национальный медицинский исследовательский центр гематологии; 126167, Россия, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 44; <https://orcid.org/0000-0002-5695-3615>; vasiliev.s@blood.ru

Габбасов Zufar Ахнафович, д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории клеточного гемостаза, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова; 121552, Россия, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а; <https://orcid.org/0000-0003-3878-2573>; zufargabbasov@yandex.ru

Information about the authors:

Yuliya N. Avtaeva, Cand. Sci. (Med.), Junior Researcher, Laboratory of Cellular Hemostasis, National Medical Research Center for Cardiology named after academician E.I. Chazov; 15a, 3rd Cherepkovskaya St., Moscow, 121552, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-3701-9747>; julia_94fs@mail.ru

Ivan S. Melnikov, Researcher, Laboratory of Cellular Hemostasis, National Medical Research Center for Cardiology named after academician E.I. Chazov; 15a, 3rd Cherepkovskaya St., Moscow, 121552, Russia; Junior Researcher, Laboratory of Gas Exchange, Biomechanics and Barophysiology, State Scientific Center of the Russian Federation – The Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences; 76a, Khoroshevskoye Shosse, Moscow, 123007, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-5241-3091>; ivsgm@mail.ru

Sergey A. Vasiliev, Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading Researcher, National Medical Research Center for Hematology; 44, Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow, 126167, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-5695-3615>; vasiliev.s@blood.ru

Zufar A. Gabbasov, Dr. Sci. (Biol.), Chief Researcher, Laboratory of Cellular Hemostasis, National Medical Research Center for Cardiology named after academician E.I. Chazov; 15a, 3rd Cherepkovskaya St., Moscow, 121552, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3878-2573>; zufargabbasov@yandex.ru