

Болезнь Виллебранда — наследственный геморрагический диагноз, характеризующийся увеличением времени кровотечения, дефицитом фактора VIII, снижением адгезивности тромбоцитов и чутосомным типом наследования.

Шведские авторы [Nilsson J. M. et al., 1957; Nilsson J. M., Blombäck M., Blombäck B., 1959, и др.] высказали предположение о существовании особого фактора плазмы (фактор Виллебранда) дефицит которого вызывает увеличение времени кровотечения. Они обнаруживали его во фракции 0—1 плазмы даже в тех случаях, когда ее готовили из плазмы, лишенной фактора VIII. Этот фактор отличается от фибриногена, уменьшает время кровотечения, измеряемое методом Дуке, и быстро разрушается при хранении крови.

В 1960 г. J. M. Nilsson и соавт. показали, что даже при переливании фракции 0—1, приготовленной из крови больных гемофилией и, следовательно, лишенной фактора VIII, в крови людей с болезнью Виллебранда наблюдается значительное повышение его содержания, одновременно происходит коррекция времени кровотечения и капиллярного кровотечения. Эти наблюдения подтвердили существование специфического фактора Виллебранда, который имеется в нормальной плазме и в плазме больных гемофилией. Более того, было показано, что при переливании крови или плазмы изменения концентрации фактора VIII в крови реципиентов с болезнью Виллебранда отличаются от таковых у лиц больных гемофилией А [Biggs R., Mathews J. M., 1963; Lewis J. H., 1964]. В первом случае переливание сопровождалось увеличением уровня фактора VIII выше расчетного; это повышение продолжалось 5—8 ч после трансфузии и достигает исходного уровня к концу 2-х суток (рис. 9). При гемофилии А после быстрого увеличения содержания фактора VIII его уровень столь же быстро снижался, что соответствует короткому периоду полураспада этого фактора при гемофилии (10—15 ч). Аналогичные результаты были получены и P. Corni и соавт. (1959). R. Biggs и J. M. Mathews наблюдали быстрое повышение уровня фактора VIII при переливании фибриногена, который был приготовлен из плазмы, лишенной антигемофильного глобулина, а E. J. W. Bowie (1972), H. S. Strauss и соавт. (1965) после трансфузий сыворотки, адсорбированной BaSO₄ и, следовательно, не содержащей фактора VIII. Одновременно возникло предположение о наличии в плазме специфического фактора, который обеспечивает первичный гемостаз и уменьшает время кровотечения. Однако механизм его действия был не ясен, так как основой первичного гемостаза является тромбоцитарный тромб, в образовании которого основная роль принадлежит адгезии и агрегации тромбоцитов. Был предположен различный характер дефицита фактора VIII при болезни Виллебранда и гемофилии А.

Развитие иммунологических методов исследования, возможность получения новых сведений о структуре фактора VIII, появившаяся благодаря успехам молекулярной биологии и внедрению в практику методов ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы, ионообменной хроматографии, двухмерного иммуноэлектрофореза, применение крупнопористого натрий-SDS полиакриламидного электрофореза позволили уточнить строение фактора VIII. В настоящее время фактор VIII рассматривают как макромолекулу с молекулярной массой более 10⁶ дальтон, которая обладает прокоагулянтной активностью (фактор VIII-K), активностью Виллебранда (фактор VIII-B) и антигенной активностью (фактор VIII-АГ). Установлено, что фактор VIII в плазме крови не является гомогенной единицей, а состоит из повторяющейся серии субъединиц с различной молекулярной массой (1—20×10⁶ дальтон) и связанных дисульфидными связями. Высокомолекулярную форму обнаруживают в криопреципитате. Она содержит активность Виллебранда и имеет низкую электрофоретическую подвижность. Низкомолекулярную форму находят в супернатанте, получаемом при центрифугировании криопреципитата. Эта форма обладает прокоагулянтной активностью и высокой электрофоретической подвижностью.

Морфологические и функциональные дефекты тромбоцитов при болезни Виллебранда продолжают привлекать внимание исследователей. Некоторые авторы не обнаружили морфологических изменений в тромбоцитах. Однако G. Jean (1965) с помощью электронной микроскопии обнаружил изменения в плотных гранулах с одновременным появлением капелек жира в тромбоцитах у всех обследованных им больных (10 человек).

Функциональную способность тромбоцитов изучают при помощи их адгезии и агрегации, индуцированной криопреципитатом, ристоцетином (или ристомицином) и другими веществами. Н. Braunsteiner, сравнивая число тромбоцитов из венозной и капиллярной крови, впервые обнаружил снижение адгезивности тромбоцитов при болезни Виллебранда. Дальнейшее изучение этого свойства тромбоцитов стало возможно после того, как A. J. Hellm (1960) предложил свой метод исследования. Он обнаружил снижение адгезии тромбоцитов у 5 из 15 больных. Однако автор не был абсолютно уверен в полученных результатах, так как у 5 больных наблюдалась значительная анемия с низкими показателями гематокрита. Известно, что эритроцитарные факторы имеют большое значение для адгезии тромбоцитов. В 1963 г. M. B. Zucker, применив метод A. J. Hellm, выявила значительное снижение адгезии тромбоцитов при болезни Виллебранда. Одновременно она отметила, что добавление нормальной плазмы корригирует этот дефект. Аналогичные данные получили T. S. Zalzman (1963), A. E. Oodergaard и соавт., (1964), H. S. Strauss и G. E. Bloom (1964). Способностью нормализовать адгезию тромбоцитов обладает также и плазма крови больных гемофилией А. После этих исследований метод определения адгезии тромбоцитов был предложен в качестве одного из диагностических тестов у лиц с болезнью Виллебранда.

Особенно высокой адгезивностью обладают тромбоциты больных с сахарным диабетом [Oodergaard A.E. et al., 1964], что связано с наличием в крови плазменного фактора. Доказательством последнего считают тот факт, что плазма таких больных, лишенная тромбоцитов, «исправляет» *invitro* дефект адгезии, а ее переливание лицам с болезнью Виллебранда в большей степени, чем трансфузия других сред, корректирует время кровотечения и адгезию тромбоцитов. Н. J. Weiss и соавт. (1978) выявили нарушения адгезии тромбоцитов таких больных к субэндотелиальному слою сосудистой оболочки, особенно после воздействия на нее хемо-трипсином. Обработка образцов крови препаратом фактора VIII корректировала адгезивные свойства тромбоцитов лиц с болезнью Виллебранда. Аналогичный эффект наблюдали и у одного больного после трансфузии *in vivo* препарата фактора VIII. Полученные данные свидетельствуют о нарушении процесса адгезии тромбоцитов к субэндотелию, а именно к коллагену, у лиц с болезнью Виллебранда. На основании полученных данных авторы сделали выводы о существовании плазменного фактора, необходимого для адгезии тромбоцитов. При выполнении теста Хеллема большое значение имеет скорость поступления крови в колонку с бусинками. J. R. O'Brien и J. B. Haywood (1967) показали, что при медленном заполнении колонки адгезия всегда остается в пределах нормы. Возможно, что отрицательные результаты, полученные S. Cronberg и J. M. Nilsson (1965) и K. M. Dormandy (1965), обусловлены различиями в технике выполнения теста. Агрегация тромбоцитов, особенно индуцированная ристоцетином, также значительно нарушена при болезни Виллебранда. Известно, что этот процесс происходит в присутствии фактора VIII-B и одного или более специфических рецепторов на мембране тромбоцитов.

Green и Muller (1978) изучали взаимодействие фактора VIII-B и тромбоцитов в норме с помощью введения меченого ¹²⁵I фактора VIII-B. Они показали, что в присутствии ристоцетина фактор VIII-B связывается с мембраной тромбоцитов. Выявляемые при этом изменения аналогичны тем, которые обнаруживаются при синдроме Бернара — Сулье [Баркаган З.С., 1974, 1979].

Показано, что плазменная фракция 0—I и криопреципитат одновременно с временем кровотечения и адгезией тромбоцитов корректирует и индуцированную ристоцетином агрегацию. При хроматографии криопреципитата выявлена белковая фракция, обладающая активностью фактора VIII-K. В результате иммунизации кроликов этой фракцией получена антисыворотка, которая *invitro* нарушает функцию нормальных тромбоцитов по типу тромбоцитопатии при болезни Виллебранда, т. е. она содержит антиген фактора VIII. Трансфузия криопреципитата у лиц с болезнью Виллебранда поддерживает агрегацию тромбоцитов ристоцетином в течение 24-36 ч.

Ультраструктурную локализацию фактора VIII-АГ исследовали многие авторы [Piovella E. et al., 1978; Sultan J. et al., 1978; Weiss H.J. et al., 1978]. С помощью электронной микроскопии тромбоцитов, мегакариоцитов и эндотелиальных клеток человека определяли содержание фактора VIII-АГ, при этом использовали меченные ферритиномгетероиммунные сыворотки. Включения ферритина выявлены во всех этих клетках. В тромбоцитах фактор VIII-АГ локализовался как диффузно в цитоплазме клеток, так и на их внешней мембране, последнее связано, очевидно, с его адсорбцией из плазмы, так как при отмывании тромбоцитов эта часть фактора VIII-АГ не выявлялась. Поскольку известно, что меченные ферритином антитела не проникают через интакт-ные клеточные мембраны, обнаружение меченых преципитатов внутри тромбоцитов и мегакариоцитов свидетельствует о секреции этими клетками фактора VIII-АГ. Ранее это было доказано для клеток эндотелия *in vitro*.

J. Sultan и соавт. (1976) с помощью метода, разработанного C. Laurell, показали, что фактор VIII-АГ отсутствует в плазме и лизатах тромбоцитов лиц с тяжелой формой болезни Виллебранда. Отсутствие фактора VIII-АГ было подтверждено результатами электронно-микроскопического исследования, после обработки антисыворотками к фактору VIII, соединенными с пероксидазой. После однократной и многократных трансфузий криопреципитата у всех больных наблюдалось уменьшение времени кровотечения, повышение в крови уровня фактора VIII-АГ и фактора VIII-B. Однако фактор VIII-АГ не выявлялся ни на поверхности, ни в лизатах тромбоцитов. Инкубация *in vitro* тромбоцитов больных с нормальной плазмой также не приводила к появлению фактора VIII-АГ в лизатах тромбоцитов и на их поверхности. Скорее всего это связано с дефектностью тромбоцитов, не способных при болезни Виллебранда адсорбировать фактор VIII-АГ. Одновременно предполагают, что и мегакариоциты при этом заболевании не способны в отличие от нормальных синтезировать фактор VIII-АГ. Биохимические исследования тромбоцитов при болезни Виллебранда, выполненные J. Caen и C. Causin (1962), позволили обнаружить в них повышенное содержание АТФ и различное соотношение АТФ/АДП. А. А. Исаакян (1966) отметил снижение в тромбоцитах больных уровня молочной кислоты, АТФ и АДП. Соотношение АТФ/АДП составляло 1,0—1,5, т. е. существенно не отличалось от нормы. Н. Stormorken (1967) также обнаружил повышение уровня АТФ, что сопровождалось возрастанием количества АДП и, следовательно, сохранением соотношения АТФ/АДП.

Таким образом, установлено, что фактор VIII является белковым комплексом, имеющим по крайней мере 4 вида активности: 1) коагулянтная, которая участвует во внутреннем механизме свертывания (фактор VIII-K); 2) антигенная, выявляемая специфическими кроличьими антисыворотками (фактор VIII-АГ); 3) активность, взаимодействующая с тромбоцитами при первичном гемостазе и необходимая для нормальной адгезии тромбоцитов, и времени кровотечения (фактор VIII-B); 4) активность, способствующая агрегации тромбоцитов в норме и при болезни Виллебранда в присутствии ристоцетина (фактор VIIIР-коф.).

Показано, что болезнь Виллебранда имеет несколько клинических и генетических вариантов. Согласно данным J. M. Nilsson и соавт. (1979), различаются 4 варианта болезни Виллебранда.

Вариант I — это классическая распространенная форма болезни Виллебранда. При ней наблюдаются количественная недостаточность белкового комплекса фактора VIII и снижение всех видов его активности. Ответ на введение концентратов фактора VIII является типичным для болезни Виллебранда. Для этого варианта характерен аутосомно-доминантный тип наследования с разной степенью пенетрантности. Описаны также случаи с ауто-сомно-рецессивным типом наследования. По клиническим и лабораторным признакам различают тяжелые и легкие формы заболевания. При варианте I выявляют 50% активности фактора VIII-АГ, пропорциональное снижение уровня фактора VIII-К, увеличение времени кровотечения, нарушение адгезии и агрегации тромбоцитов, снижение или отсутствие фактора, ответственного за ристоцетиновую активность плазмы (фактор VIII-Р-коф.). При тяжелой форме фактор VIII-АГ обнаруживают в плазме только с помощью иммунорадиометрического метода; он не содержится ни в тромбоцитах, ни в сосудистой стенке. У некоторых больных наблюдается изменение электрофоретической подвижности фактора VIII-АГ.

Вариант II характеризуется нормальным содержанием фактора VIII-АГ при исследовании по методу, предложенному C. Laurell и пониженным уровнем этого фактора при использовании двойного перекрестного иммуноэлектрофореза. Он содержится как в тромбоцитах, так и в сосудистой стенке. Различия в количестве фактора VIII-АГ связаны с появлением аномальных молекул и снижением его антигенной реактивности. Содержание фактора VIII-К несколько ниже нормы, время кровотечения увеличено, адгезия тромбоцитов уменьшена, агрегация ристоцетином низкая или субнормальная. Реакция на введение фактора VIII типичная для болезни Виллебранда. Очевидно, появление этого варианта связано с мутацией аутосомного гена, что приводит к синтезу молекул фактора VIII с нарушенной структурой и измененной электрофоретической подвижностью.

При варианте III содержание фактора VIII-К находится в пределах нормы, а фактора VIII-АГ снижено, время кровотечения увеличено, ретенция тромбоцитов понижена, агрегация тромбоцитов ристоцетином незначительно уменьшена. Тип наследования аутосомно-рецессивный.

Вариант IV характеризуется низкой активностью фактора VIII, увеличенным временем кровотечения, нормальным уровнем фактора VIII-АГ, уменьшенной ретенцией

тромбоцитов и нормальной агрегацией ристоцетином. Электрофоретическая подвижность фактора VIII-АГ в пределах нормы. Агрегация тромбоцитов коллагеном, адреналином, ADP также не нарушена. Тип наследования — сцепленный с полом. Возможно, что это один из вариантов гемофилии А.

«Приобретенный» синдром Виллебранда возникает у больных с иммунологическими и лимфопролиферативными заболеваниями в результате того, что IgG образует комплекс с белком фактора VIII. При этом быстро изменяются все виды активности фактора VIII.

Клиническими проявлениями при классической форме болезни Виллебранда являются кровоизлияния под кожу и в слизистые, носовые кровотечения, а у женщин — и меноррагии. У 20 больных, находившихся под нашим наблюдением, зарегистрированы следующие виды геморрагии. Чаще всего отмечались носовые и маточные кровотечения. Причем у девочек при наступлении половой зрелости, как правило, стихали носовые и появлялись маточные кровотечения. При тяжелой форме болезни Виллебранда могут возникать гемартрозы, подобные гемофилическим. Желудочно-кишечные кровотечения и гематурия наблюдались относительно редко. В наших наблюдениях они были отмечены у 2 больных.

Пример. Больная К. Л. Н., 32 лет, находится под наблюдением гематологического отделения ЦНИИГПК с 1963 г. Диагноз: болезнь Виллебранда. Считает себя больной с возраста одного года, когда стали появляться синяки на коже туловища и конечностей. С 2 лет появились частые и обильные носовые кровотечения, кровотечения из прямой кишки. Неоднократно лечилась в стационарах по месту жительства с диагнозом болезнь Верльгофа, хотя число тромбоцитов всегда было нормальным. В 1954 г. возник гемартроз правого коленного сустава. С 1962 г. начались менструации, которые сразу же приняли характер меноррагии, продолжавшихся до 30—35 дней и сопровождавшихся развитием тяжелой анемии. Диагноз болезни Виллебранда был установлен в 1963 г. на основании увеличения времени кровотечения до 40 мин, нарушения потребления протромбина, теста генерации тромбо-пластина за счет снижения фактора VIII. Больной проводилось лечение гемотрансфузиями, АКК, внутривенными инфузиями серотинина. В результате лечения удавалось добиться лишь прекращения очередного маточного кровотечения. В 1955 г. при биохимических исследованиях тромбоцитов выявлены снижение содержания адениловых кислот ADP и ATP, а при электронной микроскопии — изменение структуры фибринового сгустка. Больной было назначено лечение препаратом ATP, по 2 мл 1% раствора ежедневно в сочетании с приемом жженой магнезии по 300 мг 3 раза в сутки, а также лечение сначала метилтестостероном, а затем инфекундином по общепринятой методике. В результате лечения у больной полностью нормализовался менструальный цикл. С 1966 г. менструации были регулярными — по 5 дней через 28 дней. Геморрагический диатез сохранялся в виде единичных синяков на коже и умеренных дееневых кровотечений. Больная закончила медицинское училище и работает медицинской сестрой. В 1977 г. произведена синовэктомия в связи с

гемартрозом правого коленного сустава. Во время операции производились переливания криопреципитата по 5—7 доз в сутки. Осложнений во время операции не было.

В 1980 г. больная была повторно исследована в ЦНИИГПК. Время кровотечения 38 мин, уровень фактора VIII 19%, агрегация, индуцируемая ристоцетином, отсутствует, после переливания 8 доз криопреципитата выявлена типичная для болезни Виллебранда реакция на трансфузию (рис. 10). Таким образом, диагноз был подтвержден через 17 лет после первоначального исследования. Несмотря на сохраняющийся дефицит фактора VIII, значительное увеличение времени кровотечения и нарушение агрегации, проявления кровоточивости у больной в настоящее время выражены умеренно, маточные кровотечения в результате систематического приема пероральных контрацептивных препаратов и поддерживающего лечения препаратами АТР полностью купированы и менструации стали регулярными. Длительное лечение контрацептивными препаратами не привело к развитию побочных явлений. В частности, не наблюдалось его отрицательное влияние на функциональное состояние печени, что подтверждается нормальным уровнем аминотрансфераз, щелочной фосфатазы, а также результатами сканирования и гепатографии.

Роды при болезни Виллебранда часто (но не всегда) сопровождаются значительной кровопотерей. У большинства женщин во время беременности уровень фактора VIII повышается, что снижает риск кровотечения. Однако структура фактора VIII отличается от нормальной. В послеродовом периоде даже при отсутствии кровотечений женщины должны находиться под наблюдением врача из-за опасности поздних кровотечений в связи со снижением уровня фактора VIII после родов.

При болезни Виллебранда оперативные вмешательства, особенно в полости рта, сопровождаются обильными кровотечениями. В то же время брюшно-полостные операции иногда можно производить без специальной подготовки. С возрастом кровоточивость снижается, иногда нормализуется и время кровотечения.

Диагноз тяжелых случаев болезни Виллебранда обычно не представляет затруднений. Он основывается на типичном анамнезе, характере кровоточивости и данных лабораторных исследований (увеличение времени кровотечения, изменение парциального тромбогластинного времени, снижение уровня фактора VIII, а также адгезии и агрегации тромбоцитов, активированной ристоцетином). Диагноз болезни средней тяжести требует более тщательного исследования тромбоцитов. В сомнительных случаях для подтверждения диагноза необходимо изучать изменение

времени кровотечения, активности факторов VIII-K, VIII-АГ, VIII-B в ответ на трансфузию свежей плазмы, криопреципитата или концентрата фактора VIII.

В настоящее время для лечения и профилактики кровотечений, при подготовке и проведении хирургических вмешательств используют фракцию 0—1 плазмы, криопреципитат и свежую плазму. При переливании этих трансфузионных сред нормализуется время кровотечения, повышается активность факторов VIII-K и VIII-АГ, более длительное время сохраняется активность фактора VIII-K и наблюдается ее вторичный пик через 5—30 ч после трансфузии. Фактор VIII-АГ после переливания любой среды быстро исчезает из крови. Кофактор, поддерживающий агрегацию тромбоцитов ристоцетином (VIII-P-коф.), удается определить через 24—36 ч после трансфузий. Время кровотечения нормализуют все среды, кроме высокоочищенных концентратов фактора VIII, но этот эффект наиболее кратковременный.

При лечении кровотечений из носа, полости рта и возникающих после экстракции зубов показаны ингибиторы фибринолиза. При обильных длительных маточных кровотечениях хороший эффект получен при применении оральных контрацептивных средств.

Дальнейший прогресс знаний о болезни Виллебранда может быть достигнут путем изучения белкового комплекса фактора VIII, а также структуры его нормальных и патологических субъединиц. Последнее возможно только в том случае, если удастся изолировать их из нормальной плазмы и плазмы лиц с болезнью Виллебранда. Генетические аспекты заболевания также должны быть уточнены. Развитие генетики, особенно геной инженерии, создает предпосылки для исправления генетического дефекта при данной патологии.