

Diagnostyka laboratoryjna choroby von Willebranda

Laboratory diagnosis of von Willebrand disease

Edyta Odnoczko

Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

Streszczenie

Choroba von Willebranda (vWD) jest najczęstszą wrodzoną skazą krwotoczną. W pracy przedstawiono algorytm postępowania diagnostycznego w vWD.

Ponadto omówiono poszczególne testy laboratoryjne stosowane w rozpoznawaniu i klasyfikowaniu typów i podtypów vWD.

Słowa kluczowe: choroba von Willebranda, testy laboratoryjne, czynnik von Willebranda

J. Transf. Med. 2012; 5: 103–107

Summary

Von Willebrand disease (vWD) is the most common inherited bleeding disorder. The paper presents the diagnostic algorithm of vWD. It also discusses the various laboratory assays used in the diagnosis and classification of types and subtypes of vWD.

Key words: von Willebrand disease, laboratory assays, von Willebrand factor

J. Transf. Med. 2012; 5: 103–107

Choroba von Willebranda (vWD, *von Willebrand disease*) jest najczęstszą wrodzoną skazą krwotoczną, występującą z częstością około 0,1% w ogólnej populacji. Podłożem choroby jest niedobór lub upośledzenie funkcji glikoproteiny osocza zwanej czynnikiem von Willebranda (vWF, *von Willebrand factor*). Białko to występuje w osoczu w postaci wielkocząsteczkowych struktur, tak zwanych multimerów, których masa cząsteczkowa zawiera się w przedziale od 500 (1 dimer) do nawet 20 000 kDa (40 dimerów). Synteza vWF odbywa się głównie w megakariocytach i komórkach śródbłonna. Część puli powstałego vWF jest uwalniana do osocza, gdzie krąży w kompleksie z czynnikiem VIII (FVIII, *factor VIII*), zaś część jest magazynowana w ciałkach Weibel-Palade'a komórek śródbłonna i w ziarnistościach α płytek. Do uwalniania rezerw tkankowych vWF dochodzi na przykład pod wpływem trombiny i desmopre-

syny (DDAVP, *deamino-D-arginine-vasopressin*). Zадaniem vWF w procesie hemostazy pierwotnej jest udział w adhezji płytek krwi poprzez wiązanie ich glikoproteiny (GP) Ib do uszkodzonego śródbłonna. Rola vWF w hemostazie wtórnej polega na wiązaniu FVIII (1–2 cząsteczki FVIII na 50 dimerów vWF), który w kompleksie z vWF jest chroniony przed przedwczesną proteolityczną degradacją w krwiobiegu przez aktywne białko C.

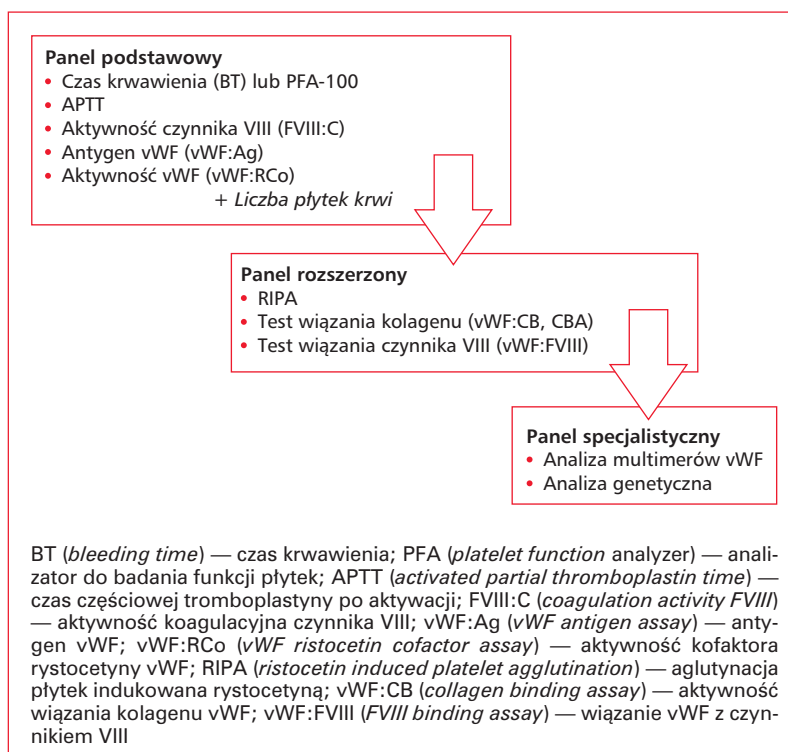
Gen kodujący vWF (*VWF*) jest zmapowany na krótkim ramieniu chromosomu 12, stanowi 178 kb genomowego DNA i zawiera 52 eksony oraz 51 otaczających je sekwencji intronowych [1]. Choroba von Willebranda jest dziedziczona autosomalnie dominująco lub recesywnie (typ 2N, typ 3). W wyniku mutacji w genie *VWF* dochodzi do nieprawidłowej syntezy białka lub jest syntetyzowane białko nieprawidłowe.

Podczas syntezy cząsteczki vWF w pierwszym etapie powstaje prekursor vWF (pre-pro-vWF) o masie cząsteczkowej około 300 kDa zawierający 2813 reszt aminokwasowych [2]. W skład cząsteczki pre-pro-vWF wchodzi: 1) peptyd sygnałny (22 aminokwasy), ułatwiający transport vWF do siateczki wewnątrzplazmatycznej; 2) propeptyd (741 aminokwasów), którego główną rolą jest sterowanie procesem multimeryzacji oraz 3) monomer — jednostka podstawowa vWF (2050 aminokwasów). W obrębie cząsteczki vWF wyróżnia się 4 rodzaje domen: A, B, C i D, które pełnią wiele funkcji w hemostazie. Fragment cząsteczki vWF w N-końcowej części zawierający domeny D1, D2, D' i D3, to odcinek odpowiedzialny za powstawanie multimerów vWF. Domena D' oraz część domeny D3 jest miejscem tworzenia kompleksu z FVIII. Domena A3 oraz fragmenty domen A1 i A2 to rejony wiążące kolagen. Ponadto głównym zadaniem domen A1 i A2 jest łączenie cząsteczki vWF z receptorem GPIb płytek krwi. Zaś w domenie C2 znajduje się miejsce oddziaływań z płytkowym receptorem GPIIb/IIIa. W C-końcowej części cząsteczki vWF występuje rejon odpowiedzialny za dimeryzację jednostek podstawowych, do której dochodzi wskutek tworzenia na tym odcinku wiązań dwusiarczkowych. Podczas

potranslacyjnej modyfikacji zsyntetyzowanego białka od cząsteczek pre-pro-vWF jest odszczepiany peptyd sygnałny. Powstałe cząsteczki pro-vWF ulegają dimeryzacji w retikulum endoplazmatycznym, skąd są transportowane do aparatu Golgiego, gdzie tworzą struktury o coraz większej masie cząsteczkowej — multimery vWF. W hemostazie najważniejszą rolę odgrywają multimery o wysokiej masie cząsteczkowej (HMWM, *high molecular weight multimers*), ponieważ adhezja płytek następuje głównie z ich udziałem. W transporcie FVIII biorą udział zarówno małe, jak i duże multimery.

W diagnostyce laboratoryjnej vWD wykorzystuje się testy laboratoryjne z 3 paneli: podstawowego (przesiewowego), rozszerzonego oraz specjalistycznego. O ile panel podstawowy obejmuje testy diagnostyczne dostępne w większości laboratoriów o profilu koagulologicznym, o tyle panel rozszerzony, a zwłaszcza panel specjalistyczny, obejmują testy dostępne wyłącznie w specjalistycznych laboratoriach hemostazy (ryc. 1).

W badaniach przesiewowych vWD w pierwszej kolejności wykonuje się następujące testy laboratoryjne: czas krwawienia (BT, *bleeding time*) lub czas okluzji (CT, *closure time*) w analizatorze do badania funkcji płytek (PFA-100, *platelet function*



Rycina 1. Algorytm postępowania diagnostycznego w chorobie von Willebranda (vWD)

Figure 1. Diagnostic algorithm in von Willebrand disease (vWD)

analyzer), czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT, *activated partial thromboplastin time*) oznaczenie aktywności FVIII, oznaczenie zawartości antygenu i aktywności vWF, ponadto niezbędne jest określenie liczby krwinek płytkowych [3]. Zarówno BT jak i CT w PFA-100, to testy oceniające sprawność hemostazy pierwotnej. Jedną z powszechnie stosowanych metod pomiaru BT jest metoda Ivy, która polega na nacięciu skóry przedramienia na wystandaryzowaną głębokość (np. 2,5 mm) przy stałym ciśnieniu krwi (mankiet sfigmomanometru uciska ramię pod ciśnieniem 40 mm Hg). Wypływające z nacięcia krople krwi są zbierane za pomocą bibuły filtracyjnej i dokonuje się pomiaru czasu od momentu zranienia do ustania krwawienia. Przyczynami przedłużenia BT są: małopłytkowość, vWD oraz zaburzenia funkcji płytek, zarówno wrodzone, na przykład w przebiegu trombastenii Glanzmana, jak i nabyte, na przykład w następstwie stosowania leków, takich jak kwas acetylosalicylowy lub niesteroidowe leki przeciwzapalne. W ostatniej dekadzie, w wielu laboratoriach pomiar BT został zastąpiony znacznie czulszym testem diagnostycznym — CT w PFA-100 (Siemens, Niemcy). Test ten jest określany mianem globalnego testu pierwotnej hemostazy [4]. W urządzeniu PFA-100 jest imitowany proces hemostazy pierwotnej przebiegający w warunkach *in vivo*. Po uszkodzeniu naczynia krwionośnego dochodzi do odsłonięcia włókien kolagenu, w wyniku czego aktywowane są płytki krwi, które przy udziale vWF przylegają do odsłoniętej warstwy podśródbłonkowej (adhezja). W kolejnej fazie między płytkami krwi tworzą się mostki fibrynogenowe (agregacja) i powstaje pierwotny czop hemostatyczny. Bardzo podobny proces zachodzi w teście PFA-100, gdzie krew pełna pod wpływem podciśnienia jest aspirowana przez kapilarę imitującą naczynie krwionośne o wysokim module ścinania. Płytki krwi napotykać na swej drodze membranę, w której znajduje się szczelina powleczona kolagenem i epinefryną lub kolagenem i adenylozynydofosforanem (ADP). Kontakt płytek krwi z tymi agonistami sprawia, że dochodzi do ich aktywacji i wiązania za pośrednictwem vWF do kolagenu na błonie, w wyniku czego powstaje czop płytkowy, który zamyka światło szczeliny (okluzja). Czas potrzebny do zamknięcia otworu w membranie to czas okluzji (CT, *closure time*), który stanowi wynik testu. Już łagodna postać vWD może wydłużyć CT w teście PFA-100 z epinefryną, podczas gdy ciężkie defekty vWF powodują wydłużenie CT zarówno z epinefryną, jak i z ADP. Dlatego na podstawie prawidłowego CT w PFA-100 w teście z epinefryną można wykluczyć ciężką postać vWD, ciężką małopłytkowość oraz ciężkie dysfunkcje płytek.

Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT) jest rutynowo wykonywanym przesiewowym testem hemostazy. W badaniu tym po dodaniu do osocza badanego odczynnika zawierającego aktywator i fosfolipidy, aktywowany jest wewnątrzpochodny tor krzepnięcia. Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji to test oceniający sprawność hemostazy wtórnej. Wynik tego czasu krzepnięcia zależy w różnym stopniu od aktywności czynników krzepnięcia toru wewnątrzpochodnego, w tym czynników kontaktu (XII, XI, wielkocząsteczkowego kininogenu i prekalikreiny), czynnika IX i czynnika VIII, natomiast nie zależy od zawartości i aktywności vWF, w związku z tym prawidłowy wynik APTT nie wyklucza defektu vWF. Najczęściej stosowaną metodą do oznaczania aktywności FVIII w osoczu (FVIII:C, *coagulation activity FVIII*) jest metoda koagulacyjna jednostopniowa, która jest oparta na pomiarze APTT mieszaniny osocza badanego i osocza substratowego pozbawionego FVIII. Uzyskany czas krzepnięcia jest odnoszony do krzywej kalibracyjnej i odwrotnie proporcjonalny do aktywności FVIII w badanej próbce osocza. Zawartość antygenu vWF (vWF:Ag; *vWF antigen assay*) w osoczu można określić metodą immunoelektroforetyczną bądź immunofluorescencyjną (ELFA, *enzyme linked immunofluorescent assay*). W metodzie immunoelektroforetycznej zwanej rakietską według Laurella, w wyniku przeprowadzenia rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym zawierającym monospecyficzne przeciwciała skierowane przeciwko vWF, powstają kompleksy immunologiczne mające postać pików („rakietek”), których wysokość jest wprost proporcjonalna do zawartości antygenu w badanej próbce osocza. W metodzie ELFA antygen vWF zawarty w osoczu tworzy immunologiczne kompleksy z przeciwciałami skierowanymi przeciwko vWF, a powstałe kompleksy są wykrywane z użyciem przeciwciał wyznakowanych fluorescencyjnie. Intensywność emitowanego światła jest równoważna zawartości antygenu badanego białka w próbce osocza. Oznaczenie aktywności kofaktora ristocetyny vWF (vWF:RCo, *vWF ristocetin cofactor assay*) pozwala na zróżnicowanie defektu ilościowego od jakościowego vWF. Ten istotny diagnostycznie test ocenia zdolność wiązania vWF do GPIIb płytek krwi [5]. Badanie polega na dodaniu do badanego osocza odczynnika zawierającego stabilizowane płytki krwi oraz ristocetynę. Ristocetyna jest antybiotykiem uzyskiwanym z *Nocardia lurida*, który indukuje wiązanie vWF do płytek przez receptor GPIIb, co w efekcie powoduje ich aglutynację. W wyniku tych interakcji zmienia się przepuszczalność światła badanej mieszaniny, co jest rejestrowane

wane i odnoszone do krzywej kalibracyjnej przez analizator. Aktywność kofaktora ristocetyny vWF odzwierciedla zdolność vWF do aglutynacji stabilizowanych płytek krwi. Wynik testu jest wyrażony jako j./dl lub procent normy. Ponadto ważnym kryterium diagnostycznym w klasyfikacji vWD jest współczynnik vWF:RCo/vWF:Ag, który umożliwia odróżnienie typu 1 od typu 2 vWD. Wartość współczynnika mniejsza niż 0,6–0,7 wskazuje na defekt jakościowy vWF (typ 2 vWD), zaś współczynnik vWF:RCo/vWF:Ag większy niż 0,6–0,7 świadczy raczej o defekcie ilościowym (typ 1 vWD).

Testy laboratoryjne panelu rozszerzonego i specjalistycznego umożliwiają odpowiednie sklasyfikowanie podtypów vWD bądź, w przypadku analizy genetycznej, zidentyfikowanie mutacji sprawczej w genie *VWF*. Badaniem ukierunkowanym na wykrycie typu 2B vWD lub typu płytkowego vWD (PT-vWD; *platelet type vWD*; pseudo-vWD) jest test aglutynacji płytek indukowanych ristocetyną (RIPA, *ristocetin induced platelet agglutination*) [6]. Badanie to jest przeprowadzane w osoczu bogatopłytkowym i umożliwia ocenę zdolności płytek do aglutynacji pod wpływem niskiego stężenia ristocetyny (np. 0,5 mg/ml). U zdrowej osoby dodanie ristocetyny w niskim stężeniu nie powoduje aglutynacji płytek krwi, podczas gdy u chorych z typem 2B vWD lub z typem PT-vWD obserwuje się ich wzmożoną aglutynację. Różnica polega na tym, że w typie 2B vWD defekt występuje w domenie A1 cząsteczki vWF, natomiast w postaci płytkowej vWD defekt jest zlokalizowany w płytkowym receptorze GPIb. Ponieważ przyczyną wzmożonej aglutynacji płytek u tych chorych jest zwiększone powinowactwo vWF lub GPIb płytek, niezbędne jest zróżnicowanie pseudo-vWD z zaburzeniem vWF. W praktyce laboratoryjnej umożliwia to na przykład wykonanie testu z krioprecypitatem, bogatym w prawidłowy vWF. Jeżeli dodanie do badanego osocza bogatopłytkowego krioprecypitatu nie powoduje nadmiernej aglutynacji płytek — rzekoma postać vWD może zostać wykluczona. Test zdolności wiązania kolagenu (vWF:CB; *collagen binding assay*) ma charakter uzupełniający w diagnostyce vWD, jego rola w procesie diagnostycznym vWD nie jest dokładnie określona [7]. Najczęściej wykorzystywaną metodą oznaczania vWF:CB jest metoda immunoenzymatyczna, jednak czułość tego testu zależy w dużym stopniu od pochodzenia i typu zastosowanego kolagenu. Zdolność wiązania kolagenu przez domenę A3 vWF zależy od wielkości multimerów obecnych w osoczu, przy czym najłatwiej wiążą się multimery o dużej masie cząsteczkowej. Test vWF:CB wykazuje dużą czułość w wykrywaniu ty-

pów 1, 3, 2A i 2B vWD. Zdolność wiązania FVIII przez vWF (vWF:FVIII; *FVIII binding assay*) jest testem stosowanym przede wszystkim w diagnostyce typu 2N vWD w celu zróżnicowania typu 2N vWD z łagodną lub umiarkowaną hemofilią A. W typie 2N upośledzone jest wiązanie FVIII (defekt domeny D' lub D3 vWF), co powoduje, że FVIII nie jest chroniony przed proteolizą i jego okres biologicznego półtrwania jest znacznie skrócony. Zatem w typie 2N vWD, tak jak w hemofilii A, występuje jedynie zmniejszona aktywność FVIII. Wiązanie FVIII przez vWF oznacza się metodą immunoenzymatyczną z zastosowaniem egzogennego FVIII.

Analiza multimerów vWF jest badaniem wysokospecjalistycznym, które dostarcza informacji o zawartości oraz proporcji poszczególnych frakcji multimerów. Badanie to polega na elektroforetycznym rozdzieleniu frakcji multimerów vWF w zależności od ich masy cząsteczkowej w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym w obecności czynnika denaturującego [8]. Uzyskane frakcje białkowe są następnie wykrywane techniką Western Blotting, a ich detekcja odbywa się na przykład z użyciem chemiluminescencji. U zdrowej osoby są obecne wszystkie frakcje multimerów, wśród których frakcja wysokocząsteczkowych multimerów (HMWM, *high molecular weight multimers*) wędruje najwolniej, frakcja średnicząsteczkowych multimerów (IMWM, *intermediate molecular weight multimers*) nieco szybciej, a najszybciej migruje frakcja niskocząsteczkowych multimerów (LMWM, *low molecular weight multimers*). W typie 1 vWD występują wszystkie frakcje multimerów, jednak w zmniejszonym stężeniu. W typie 3 vWD stwierdza się zwykle całkowity brak multimerów. Niedobór wielkocząsteczkowych i średnicząsteczkowych multimerów jest charakterystyczny dla typu 2A vWD, u którego podłoża leży albo zaburzona sekrecja HMWM z komórek śródbłonna, albo ich wzmożona proteoliza przez trzynastego przedstawiciela rodziny metaloproteinaz (*ADAMTS13, disintegrin and metalloprotease with thrombospondin 1 repeats, 13*). Zarówno w typie 2B vWD, jak i w rzekomej postaci vWD obserwuje się zmniejszoną zawartość HMWM, co wynika z ich zwiększonej zdolności do wiązania receptora GPIb płytek krwi. W typach 2M i 2N vWD stwierdza się prawidłowy rozkład multimerów vWF.

Wyniki wybranych parametrów laboratoryjnych w poszczególnych typach i podtypach vWD zebrano w tabeli 1.

Analiza genetyczna vWD sprawia trudności, gdyż gen *VWF* jest duży i polimorficzny [9, 10]. Badania genetyczne w vWD utrudnia także obecność częściowego pseudogenu na chromosomie 22p.11–13,

Tabela 1. Parametry laboratoryjne w chorobie von Willebranda (vWD)

Table 1. Laboratory parameters in von Willebrand disease (vWD)

	Typ 1	Typ 3	Typ 2A	Typ 2B	Typ 2N	Typ 2M	PT-vWD
PLT	N	N	N	N lub ↓	N	N	↓
PFA 100	↑ lub N	↑↑↑	↑	↑	N	↑	↑
VWF:Ag	↓	Brak	↓	↓	N lub ↓	↓ lub N	↓
VWF:RCo	↓	Brak	↓↓↓	↓↓	N lub ↓	↓↓↓	↓
FVIII	↓ lub N	↓↓↓	N lub ↓	N lub ↓	↓↓	N	N
Agregacja z rystocetyną 1,25 mg/ml	N	brak	↓	N lub ↓	N	↓	N
RIPA	brak	brak	brak	↑↑↑	brak	brak	↑↑↑
Multimery	N	Brak	Brak	Zmniejszony udział HMWM	N	N	Zmniejszony udział HMWM

N — w granicach normy; PLT (platelet count) — liczba płytek krwi; HMWM (high molecular weight multimers) — wysokocząsteczkowe multimery; IMWM (intermediate molecular weight multimers) — średnicząsteczkowe multimery; LMWM (low molecular weight multimers) — niskocząsteczkowe multimery; PT-vWD (platelet type vWD) — typ płytkowy vWD; RIPA (ristocetin induced platelet agglutination) — aglutynacja płytek indukowana rystocetyną; pozostałe skróty rozwinięto pod ryciną 1

wysoce homologicznego z sekwencją eksonów 23–34 *VWF*. W diagnostyce molekularnej vWD wykorzystuje się różne techniki analizy genetycznej, jednak metoda sekwencjonowania DNA jest uznana za „złoty standard” [11]. Do tej pory wykryto ponad 300 różnych mutacji w genie *VWF*. Mutacje powodujące typ 2 vWD są zlokalizowane najczęściej w eksonach 18–24 (typ 2N) oraz w eksonie 28 (typ 2A, 2B, 2M), podczas gdy mutacje odpowiedzialne za typ 1 i 3 mogą występować w obrębie całego genu. W przeciwieństwie do typu 2 i 3 vWD, podłoże molekularne najczęściej występującego typu 1 jest słabo poznane. Typ 1 vWD charakteryzuje się dużą heterogennością, zarówno kliniczną, jak i genetyczną, co odzwierciedla fakt, że tylko w około 70% przypadków typu 1 vWD wykrywane są mutacje sprawcze w genie *VWF* [12].

Odpowiednie sklasyfikowanie vWD pozwala optymalnie leczyć tę szkodliwą chorobę [13]. Dlatego przedstawione w obecnej pracy zasady diagnostyki laboratoryjnej vWD stanowią niezbędną wiedzę w pracy diagnostów laboratoryjnych oraz lekarzy hematologów zajmujących się leczeniem pacjentów z wrodzonymi schizami krwotocznymi.

Piśmiennictwo

- Goodeve A.C. The genetic basis of von Willebrand disease. *Blood Reviews* 2010; 24: 123–134.
- Ruggeri Z.M. Structure and function of von Willebrand factor. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 82: 576–584.
- Federici A.B., Castaman G., Mannucci P.M. Aice: Guidelines for the diagnosis and management of von Willebrand disease in Italy. *Haemophilia* 2002; 8: 607–621.
- Favaloro E.J. Clinical utility of the PFA-100. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2008; 34: 709–733.
- Federici A.B., Canciani M.T. Clinical and laboratory versus molecular markers for a correct classification of von Willebrand disease. *Haematologica — the Hematology Journal* 2009; 94: 610–615.
- Ruggeri Z.M., Pareti F.I., Mannucci P.M., Ciavarella N., Zimmerman T.S. Heightened interaction between platelets and factor VI–II/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand disease. *New England Journal of Medicine* 1980; 302: 1047–1051.
- Castaman G., Montgomery R.R., Meschengieser S.S., Haberichter S.L., Woods A.I., Lazzari M.A. Von Willebrand's disease diagnosis and laboratory issues. *Haemophilia* 2010; 16: 67–73.
- Zimmerman T.S., Dent J.A., Ruggeri Z.M., Nannini L.H. Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIa von Willebrand disease and IIb von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (type IIc, type IIe, type IIe). *Journal of Clinical Investigation* 1986; 77: 947–951.
- James P., Lillicrap D. The role of molecular genetics in diagnosing von Willebrand disease. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2008; 34: 502–508.
- Favaloro E.J. Genetic testing for von Willebrand disease: The case against. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2010; 8: 6–12.
- Corrales I., Ramirez L., Altisent C., Parra R., Vidal F. Rapid molecular diagnosis of von Willebrand disease by direct sequencing. Detection of 12 novel putative mutations in *VWF* gene. *Thrombosis and Haemostasis* 2009; 101: 570–576.
- Keeney S., Cumming A.M. The molecular biology of von Willebrand disease. *Clinical and Laboratory Haematology* 2001; 23: 209–230.
- Windyga J. Czynniki von Willebranda — funkcje biologiczne i zastosowanie w lecznictwie. *Ordynator Leków* 2007; 11–12: 16–21.