

Von Willebrand-faktor és laboratóriumi diagnosztikai szerepe

Szekeres-Csiki Katalin¹, Udvardy Miklós László¹, Varga-Fekete Tímea², Hársfalvi Jolán¹

¹Debreceni Egyetem, Orvos és Egészségtudományi Centrum, Klinikai Kutató Központ,

²Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, II. Belgyógyászati Klinika

Factorul von Willebrand și diagnosticul de laborator

Scopul nostru este descrierea diferitelor abnormalități a activității factorului von Willebrand și diagnosticul de laborator al bolii von Willebrand bazat pe literatura actuală. Activitatea proteinei depinde în mare măsură de structura multimerică. Am separat multimerii prin electroforeză SDS-agaroză gel, urmată de Western immunoblotting și densitometrie, aplicând analiza cantitativă a distribuției multimerilor. Am reușit să stabilim o metodologie adecvată pentru detectarea diferențelor cantitative între multimerii cu masă moleculară mică, medie și mare. Recomandăm această metodă pentru descrierea mai exactă a abnormalităților factorului von Willebrand.

Cuvinte cheie: factorul von Willebrand, diagnostic de laborator, electroforeză, immunoblotting, densitometrie.

Von Willebrand factor and its laboratory diagnostic role

Based on present literature a short summary on different abnormalities of von Willebrand factor (VWF) activity and the laboratory diagnosis of the von Willebrand disease is given in this work. The activity of this protein is highly dependent on its multimer structure. We applied quantitative densitometric analysis after separation of VWF multimers by SDS-agarose gel electrophoresis and Western immunoblot to quantify the multimeric pattern. We found that the combination of these methods is appropriate to detect quantitative differences between small, medium and large multimers. We recommend our methodology for an efficient characterization of von Willebrand multimer distribution.

Keywords: von Willebrand factor, laboratory diagnosis, electrophoresis, immunoblotting, densitometry.

Orvostudományi Értesítő, 2008, 81 (1): 45-48

www.orvtudert.ro

A Von Willebrand-faktor (VWF) egy nagy molekulatömegű glikoprotein, az endothel sejtekben és a megakaryocytákban termelődik és ezt követően az endothel sejtek Weibel-Palade testecskéiben és vérlemezke α -granulumaiban raktározódik. A plazmában 500 kDa-tól (dimer) több mint 20000 kDa-ig (40-mer) terjedő multimerik formájában található, koncentrációja megközelítőleg 10 $\mu\text{g/ml}$ [12].

A VWF szerepe kettős: nélkülözhetetlen a thrombocytá adhézióhoz nagy nyíróerővel jellemezhető áramlási viszonyok között, másrészt védi a VIII-as faktort a lebomlástól. Érsérülések alkalmával a subendotheliális kollagénhez kötődik. A VWF minden alegysége rendelkezik kollagén és thrombocytá GPIb kötő hellyel. Multimer struktúrája lehetővé teszi, hogy a kollagénhez kötött VWF stabil adhézióhoz szükséges mértékig lelassítsa a gyorsan áramló vérlemezkéket: a nagy multimerik képesek ismétlődő alegységeik révén elegendően magas GPIb thrombocytá kötőhely sűrűséget biztosítani ehhez. A VWF mennyiségének csökkenése vagy a nagy multimerik hiánya a nagy nyíróerejű áramlással jellemezhető helyeken jellegzetes vérzéses tüneteket okoz. A bőr- és nyálkahártyavérzések a legjellemzőbbek: epistaxis, fogínyvérzés, fogextrakciót követő tartós vérzés, elhúzódó menstruációs vérzés [7, 15].

A VWF mennyiségi, szerkezeti vagy funkcionális hibái a von Willebrand-betegséget okozzák (VWB), amely három fő csoportra osztható.

Az 1-es és 3-as típusú VWB háttérében a VWF mennyiségi rendellenesége áll. Az 1-es típusú VWB-ben a VWF mennyisége enyhén csökkent, öröklődése autoszomális domináns (AD). A 3-as típusú VWB-ben a VWF nem vagy alig detektálható, autoszomális recesszív (AR) öröklődésű.

A 2-es típusú VWB háttérében a nagy multimerik hiánya áll. A 2A altípusban a bioszintézis zavart, míg a 2B altípusban fokozott a VWF affinitása a thrombocytá GPIb recep-

torhoz. A 2M altípusban csökkent a VWF funkciója, de nem társul a nagy multimerik hiányával, míg a 2N altípusban a VWF VIII-as faktor kötőképessége csökkent. A 2-es típusú VWB-ek AD öröklődésűek mutatnak, kivétel a 2N típus, amely AR öröklődésű.

A VWB diagnosztikájának két fontos komponense van: a vérzések típusa a személyes és a családi anamnézisben, valamint a VWF (kvantitatív vagy kvalitatív) defektusát alátámasztó laboratóriumi tesztek [1, 8].

A VWB laboratóriumi diagnosztizálására alkalmas módszerekről áttekintő összefoglalót az 1. táblázat nyújt [4], amelyet a szerző hozzájárulásával közlünk.

A vérzési idő az alkaron standardizált eszközzel ejtett sebész-es vágás helyén a VW B-ben rendszerint megnyúlt, de a VWB enyhe formáiban, mint például enyhe 1-es típusú VWB-ben (vagy a normál thrombocytá VWF-al rendelkezők esetében normális lehet) [8]. Alternatíva a PFA-100 (Dade Behring) készülékkel a záródási idő meghatározása. Ezen módszer esetén antikoagulált vér áramlik át kollagénnel és ADP-vel vagy epinephrinnel impregnált membrán 150 μm nagyságú nyílásán, a képződő thrombocytá dugó elzárja a nyílást [13, 14]. A vérzési idő és a PFA-100 záródási idő $50 \times 10^9/\text{L}$ thrombocytá szám alatt, a thrombocytá számmal fordítottan arányosan – funkcionális eltérés nélkül is – megnyúlik. A rutin alvadási idők közül az APTI megnyúlt lehet 3-as és 2N típusban a csökkent FVIII miatt. A thrombocytá szám rendszerint normális, csökkent 2B VWB-ben [8]. Pozitív szűrőtesztek után végzi a laboratórium a specifikus tesztek.

A FVIII:C (VIII-as faktor koaguláns aktivitás) alacsony VWF szint vagy VWF FVIII kötési defektusa (2N típusú VWB esetén) esetén csökken. A VWF:Ag (antigén) mérés a VWF protein mennyiségét jellemzi, nem szolgáltat információt a molekula működőképességéről [4]. ELISA és immunturbidimetriás VWF:Ag szint meghatározás terjedt el [6]. VWF:RCo (risztocetin kofaktor aktivitás): a



1. táblázat. A von Willebrand-betegség laboratóriumi diagnosztizálására használt vizsgálatok

Laboratóriumi vizsgálatok	von Willebrand-betegség típusok					
	1	2A	2B	2N	2M	3
szűrőtesztek						
PI	N	N	N	N	N	N
aPTI	↑ (N)	↑ (N)	N (↑)	↑ (N)	N (↑)	↑
thrombocytaszám	N	N	↓ (N)	N	N	N
PFA-100 záródási idő	↑ (N)	↑/hiányzik	↑/hiányzik	N	↑/hiányzik	↑/hiányzik
diagnosztikai tesztek						
FVIII:C	↓ (N)	↓ (N)	↓ (N)	arányosan ↓	N (↓)	↓ (< 20%)
VWF:Ag	↓ (< 50%)	↓ (N)	↓ (N)	N (↓)	N (↓)	↓↓↓ (< 5%)
VWF:RCo	↓ (N)	↓ (< 30%)	↓ (N)	N (↓)	↓ (N)	↓↓↓ (< 5%)
VWF:CB	↓ (N)	↓↓↓ (< 15%)	↓ (< 40%)	N (↓)	↓ (N)	↓↓↓ (< 5%)
VWF:Ag/VWF:RCo	N (< 1.5)	↑ (> 1.5)	↑ (> 1.5)	N (< 1.5)	↑/N	változó: nem ajánlott
VWF:Ag/VWF:CB	N (< 1.5)	↑ (> 1.5)	↑ (> 1.5)	N (< 1.5)	↑/N	változó: nem ajánlott
VWF:CB/VWF:Ag arány	N (> 0.7)	↓ (< 0.7)	↓ (< 0.7)	N (> 0.7)	↓ (N)	változó: nem ajánlott
VWF:CB/VWF:Ag arány	N (> 0.7)	↓ (< 0.7)	↓ (< 0.7)	N (> 0.7)	↓ (N)	változó: nem ajánlott
konfirmáló/altipizáló tesztek						
VWF:FVIII kötő aktivitás						
VWF:Ag/FVIII arány	N (< 1.7)	N (< 1.7)	N (< 1.7)	↑ (> 1.7)	N (< 1.7)	változó: ne használj
FVIII/VWF:Ag arány	N (> 0.6)	N (> 0.6)	N (> 0.6)	↓ (< 0.6)	N (> 0.6)	változó: ne használj
RIPA: risztocetin						
alacsony koncentráció (0,5 mg/mL)	hiányzik	hiányzik	van	hiányzik	hiányzik	hiányzik
1,0 mg/mL	↓ (N)	↓	N	N	↓ (N)	hiányzik
1,5 mg/mL	↓ (N)	↓ (N)	N	N	↓ (N)	hiányzik
VWF multimer szerkezet elemzés	normál mintázat, ↓ VWF	hiányoznak a nagy és közepes multimerek	hiányoznak a nagy multimerek	N	N, de lehetséges abnormális sávok jelenléte	hiányzik

„↓”és „↑” csökkent- illetve emelkedett- „N” norml szintekt jelent

risztocetin a VWF és a GPIb molekulához kötődve közvetíti azok kölcsönhatását, így standard thrombocytaszuszpenzióhoz és a beteg plazmájához hozzáadva agglutinációt idéz elő. A VWF:RCo aktivitás a 2N kivételével csökken minden 2-es típusú VWB-ben. A VWF:CBA (kollagén kötő kapacitás): A vizsgálat során, a beteg plazmájában található VWF-t kollagénnel fedett mikrotiter lemezhez kötjük, majd peroxidázzal jelzett poliklonális antitesttel detektáljuk. A VWF:CBA módszer összehasonlítva a VWF:RCo módszerrel érzékenyebb a nagy molekulatömegű multimerek jelenlétére [5]. A VWF szerkezeti épsége a VWF funkcionális tesztjeinek (VWF:RCo vagy VWF:CBA) és mennyiségének (VWF:Ag) arányával jellemezhető. Ez az arány normál humán plazmában megközelítőleg 1 [2]. A VWF:Ag és a VWF:RCo arányos csökkenése – a RCo/ Ag arány nagyobb, mint 0,7 – 1-es típusú VWB-re utal. A hányados 0,7 alá csökkenése 2 típusú VWB jelenlétét valószínűsíti [6, 9]. A VWF:FVIII (FVIII kötő kapacitás) tesztnek a 2N típus és A típusú haemophilia elkülönítésében van jelentősége. Antigén szinthez viszonyított aránytalan csökkenése 2N típusú VWB-re diagnosztikus. A risztocetin indukálta

thrombocytaszuszpenzióhoz (RIPA) a beteg thrombocytaszuszpenziós plazmáját és risztocetint használunk két különböző koncentrációban. Egészséges plazmában csak a magasabb koncentrációjú risztocetin vált ki agglutinációt. Alacsonyabb risztocetin koncentrációnál csak a 2B illetve a thrombocytaszuszpenziós VWB esetén észlelhetünk agglutinációt a GPIb receptor és VWF nagyobb affinitása miatt [10].

A VWF SDS-gélelektroforézis során a multimereket agaróz gélen molekulatömegük szerint választjuk szét és immunokémiai módszerrel detektáljuk [3, 4, 9]. Kísérletes munkánk a multimer szerkezet kvantitatív analizálhatóságára irányult.

Módszer

Vizsgálatainkhoz egészséges egyének citráttal antikoagulált véréből nyert plazmát, thrombocytaszuszpenziót és VWF kontroll plazmát (Sac-1, Helena BioSciences, UK) használtunk.

A gélelektroforézist Z.M. Ruggeri és T.M. Zimmermann

[11] által leírt módszer alapján módosítva végeztünk. Röviden: tömörítő gél nélküli, 12,5cm×10cm×1,5mm 0,65%-os SDS agaróz gél (Sea Kem HGT Agarose, Rockland, ME, USA) készítettünk szeparáló gél pufferrel, gélenként 15 helyre vittük 0,05 U/ml antigén szintre hígított és denaturált mintát vittünk fel. A VWF-t 0,05 M-os Tris, pH 8,35 puffertel szeparáltuk, félszáraz elektro-blottal (Trans-Blot SD, Bio-Rad Laboratories Hercules, California, USA) PVDF membánra vittük (Millipore, Bedford, MA, USA) a gyártó leírása szerint, peroxidázzal jelzett, human VWF ellenes (DakoCytomation, Glostrup, Dánia) antitesttel és diaminobenzidinnel (Sigma, St Louis, MO, USA) detektáltuk (1.a. ábra)

A multimer eloszlást GS-800 Chemidoc denzitométerrel és Quantity One 4.3 szoftverrel értékeltük (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). Egy denzitás-görbét (1.b. ábra) a VWF sávok szerint három régióra osztottuk: (1-4) kis-, (5-8) közepes- és (>8) nagy molekulatömegű multimeret tartalmazókra. A VWF multimer jellemzésére az adott régióba eső görbe alatti területet használtuk a háttér levonása után. Az eredményt régióként százalékosan fejeztük ki az egész görbe alatti területre vonatkoztatva. A minta VWF:Ag szintjének ismeretében a régióban található

VWF:Ag mennyiséget is kiszámoltuk. A nagy multimeret tartalmazó régió hosszával jellemeztük a multimerizáció fokát, mivel ez a régió változó számú és egymástól nem teljesen szeparálódott sávokat is tartalmaz.

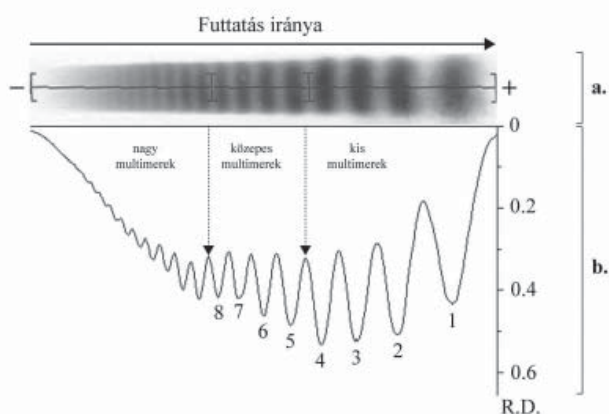
Az adatok statisztikai elemzése Microsoft Excel és SPSS.15 statisztikai szoftverekkel történt.

Eredmények

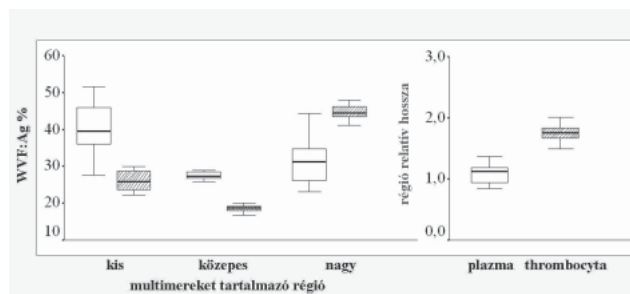
A régiókénti eredmények összefüggése a VWF:Ag mennyiséggel 2-12 ng között lineáris. A hiba (1SD) sorozaton belül 5% a kis-, 8% a közepes-, 9% a nagy multimer esetén (n=10); sorozatok között 19% a kis- és a közepes-, 29% a nagy multimer esetén (n=20).

A VWF:Ag relatív mennyisége egészséges egyének esetén $40 \pm 6,7\%$ a kis-, $27 \pm 1,6\%$ a közepes-, míg $32 \pm 6,5\%$ a nagy multimer régiójában (n=18, 2.a. ábra). Thrombocytalízátum esetén $25 \pm 3,0\%$, $19 \pm 1,6\%$ és $47 \pm 6,2\%$ (n=20).

A multimerizáció fokának meghatározására, a nagy multimer és a kis multimer régiók hányadosát használtuk, amely egészséges egyének esetén: $1,09 \pm 0,17$ (n=18), thrombocytalízátumban: $1,72 \pm 0,2$ (n=20, 2.b. ábra).



1. ábra. a. VWF molekula normál multimer szerkezetű SDS-agaróz elektroforetikus képe b. denzitás-görbe



2. ábra. Régiókénti VWF megoszlás és a multimerizáció foka. a. VWF:Ag relatív mennyisége a kis, közepes, nagy multimeret tartalmazó régiókban egészséges egyének plazmájából (n = 18) és thrombocytákban (n=20). b. nagy multimeret tartalmazó régió hosszúsága a kis multimeret tartalmazó régióra vonatkoztatva egészséges egyének plazmája és thrombocytalízátum esetén

Következtetés

A VWB diagnózis kimondása döntően a laboratóriumi eredményeken alapul [1, 8]. Az 1. táblázat összefoglalja a napjainkban használt laboratóriumi vizsgálatokat és azok jellemző eltéréseit az egyes altípusokban [4]. Ezen vizsgálatok többsége jól standardizált reagensekkel és módszerekkel végezhető, megfelelően felszerelt regionális laboratóriumokban.

A VWF multimer analízise nehezen kivitelezhető elektroforetikus módszerrel, amelyet a kvantitatív elemzés hiánya jellemez. Munkánkkal ezt a hiányosságot próbáltuk pótolni.

Eredményeink alapján a VWF elektroforézist követő denzitometriás értékelés és a görbe régiókra osztott analízise mennyiségileg elemezhetővé teszi a multimer megoszlást. A módszer hibája egy gélen futtatott mintákra alacsony, azonban gélek között, ezért ügyelni kell arra, hogy a beteg minták megfelelő kontrollal együtt legyenek egy gélen.

A thrombocytákban található VWF nincs kivéve a plazmában található degradációs enzim(ek) hatásának, így nagyobb multimeret is tartalmaz. Eredményeink jól mutatják a plazma és a thrombocyt multimer arányai közötti eltérést, különösen a nagy multimer régióban. A különbség a multimerizáció fokában is jól kvantálható.

Kísérletes munkánkkal igazoltuk, hogy a VWF multimerizációjának mértéke kvantitatíve analizálható, és lehetővé válik a thrombocyt adhézió szempontjából nélkülözhetetlen nagy multimer mennyiségének számszerű kifejezése.

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük Bézi Andrea technikus segítségét. Az anyagi fedezetet a K 62317 OTKA pályázat biztosította.

Irodalom

1. Adcock DM, Bethel M, Valcour A. – *Diagnosing von Willebrand disease: a large reference laboratory's perspective.* Semin Thromb Hemost 2006;32(5):472-479.
2. Budde U., Metzner H.J., Muller H.G. – *Comparative analysis and classification of von Willebrand factor/factor VIII concentrates: impact on treatment of patients with von Willebrand disease.* Semin Thromb Hemost 2006;32(6):626-635.
3. Budde U., Pieconka A., Will K. et al. – *Laboratory testing for von Willebrand disease: contribution of multimer analysis to diagnosis and classification.* Semin Thromb Hemost 2006;32(5):514-521.
4. Favaloro E.J. – *Laboratory identification of von Willebrand disease: technical and scientific perspectives.* Semin Thromb Hemost 2006;32(5):456-471.
5. Favaloro E.J. – *Laboratory monitoring of therapy in von Willebrand disease: efficacy of the PFA-100 and von Willebrand factor:collagen-binding activity as coupled strategies.* Semin Thromb Hemost 2006;32(6):566-576.
6. Favaloro E.J., Smith J., Petinos P. et al. – *Laboratory Testing for von Willebrand's Disease: An Assessment of Current Diagnostic Practice and Efficacy by Means of a Multi-laboratory Survey.* Thromb Haemost 1999;82(4):1276-1282.
7. Federici A.B. – *Diagnosis of inherited von Willebrand disease: a clinical perspective.* Semin Thromb Hemost 2006;32(6):555-565.
8. Franchini M. – *Advances in the diagnosis and management of von Willebrand disease.* Hematology 2006;11(4):219-225.
9. John Bowen D., Bowley S.J. – *Improved visualisation of high-molecular-weight von Willebrand factor multimers.* Thromb Haemost 2007;97(6):1051-1052.
10. Kasper C. – *Von Willebrand Disease: an introductory discussion for young physicians.* Los Angeles, Orthopaedic Hospital 2005.
11. Ruggeri Z.M., Zimmerman T.S. – *Variant von Willebrand's disease: characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets.* J Clin Invest 1980;65(6):1318-1325.
12. Sadler J.E., Budde U., Eikenboom J.C. et al. – *Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor.* J Thromb Haemost 2006;4(10):2103-2114.
13. Schlamadinger A., Kerenyi A., Muszbek L. et al. – *High-shear force-induced platelet aggregation in the screening and diagnosis of von Willebrand disease.* Orv Hetil 2000;141(41):2245-2250.
14. Schlamadinger A., Kerenyi A., Muszbek L. et al. – *Comparison of the O'Brien filter test and the PFA-100 platelet analyzer in the laboratory diagnosis of von Willebrand's disease.* Thromb Haemost 2000;84(1):88-92.
15. Tosetto A., Castaman G., Rodeghiero F. – *Assessing bleeding in von Willebrand disease with bleeding score.* Blood Rev 2007;21(2):89-97.