

# A Von Willebrand-faktor kollagén kötő kapacitása atheroscleroticus perifériás érbetegségben

Varga-Fekete Tímea<sup>1</sup>, Kósa Katalin<sup>1</sup>, Puskás Attila<sup>1</sup>, Nagy Előd<sup>2</sup>, Brassai Zoltán<sup>1</sup>, Szekeres-Csiki Katalin<sup>3</sup>, Hársfalvi Jolán<sup>3</sup>

Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, <sup>1</sup>2. sz. Belgyógyászati Klinika, <sup>2</sup>Gyógyszerészeti Biokémia Tanszék, <sup>3</sup>Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Klinikai Kutató Központ

## Capacitatea factorului von Willebrand de legare a colagenului în arteriopatia periferică

Riscul complicațiilor trombotice în bolile cardiovasculare ar putea fi mai bine identificat prin evaluarea capacității factorului von Willebrand (VWF) de legare a colagenului (VWF:CBA), decât prin determinarea cantitativă a antigenemiei VWF (VWF:Ag). Ne-am propus analiza relației dintre cantitatea VWF și capacitatea VWF de legare a colagenului (VWF:CBA) la pacienții cu ateroscleroză obliterantă a membrului inferior. Am evaluat 103 de pacienți cu arteriopatie obliterantă și 47 de subiecți sănătoși. Am observat o creștere semnificativă a nivelului VWF:Ag și de asemenea a VWF:CBA în stadiile II, III și IV Fontaine, față de grupul control. În stadiile III-IV față de stadiul II creșterea activității VWF era mai accentuată, decât creșterea cantității VWF:Ag. Rezultatele sugerează o activitate protrombotică mai pronunțată la pacienții cu ischemie critică, apreciată prin măsurarea capacității VWF de legare a colagenului.

*Cuvinte cheie:* factorul von Willebrand, capacitatea de legare a colagenului, arteriopatie obliterantă periferică.

## Von Willebrand factor collagen binding activity in peripheral artery disease

The risk of thrombotic complications in cardiovascular disease may be better identified by the von Willebrand factor (VWF) multimer pattern, or the collagen binding activity (VWF:CBA), a functional assay for VWF, than by measuring the VWF antigen (VWF:Ag) level. This study aimed to investigate the relationship between the VWF:Ag levels and the VWF:CBA in different stages of peripheral artery disease. 103 patients with peripheral artery disease and 47 healthy controls were examined. We observed significantly higher VWF:Ag level and VWF:CBA in stages II and III-IV Fontaine of peripheral artery disease, compared with the control group. Between stages III-IV and stages II Fontaine we found a more pronounced difference for the VWF:CBA, than for the VWF:Ag level, suggesting a higher prothrombotic activity in some patients with critical leg ischemia.

*Keywords:* von Willebrand factor, VWF collagen binding activity, peripheral artery disease

Orvostudományi Értesítő, 2009, 82 (3): 168-171

www.orvtudert.ro

Az atherosclerosis folyamatában kulcsszerepet töltenek be az endothel sejtek, melyek különböző anyagok szekréciója által résztvesznek az érfal tónus, a haemostasis, a gyulladás, a neovascularisatio szabályozásában. A von Willebrand-faktor (VWF), melyet szintén az endothel sejtek termelnek, egy nagy molekulatömegű glycoprotein, mely ezen sejtek Weibel-Palade testecskéiben és a trombocyták  $\alpha$ -granulumaiban raktározódik. A plazmában 500 kDa-tól 20000 kDa-ig terjedő molekulatömegű multimerok formájában találjuk meg. Jelenléte nélkülözhetetlen a normális haemostasishoz: az érfal sérülése alkalmával a subendothelialis kollagénhez kötődik és a GPIIb thrombocyt-receptorok által kiköti a vérlemezkéket. A VWF minden alegysége tartalmaz kollagén, illetve GPIIb thrombocyt kötő helyeket. Nagy nyíróerővel jellemezhető áramlási viszonyok között megnő a nagy multimerok száma, ezek ismétlődő alegységeik révén képesek elegendő GPIIb thrombocyt kötőhely sűrűséget biztosítani ahhoz, hogy a stabil adhézióhoz szükséges mértékben lelassítsák a gyorsan áramló vérlemezkéket [8].

A gyakorlatban a VWF antigénszint mérése terjedt el, mint az endothel diszfunkció markere, az ischaemiás szívbetegség, és más atheroscleroticus érbetegségek rizikótényezője [1, 5]. Ez a vizsgálat csak a molekula mennyiségét jellemzi, nem szolgáltat információt annak működőképességéről. A VWF kollagén kötő kapacitása a VWF

funkcionális tesztje, mely a molekula működőképességéről tájékoztat. Ez a meghatározás a von Willebrand-betegség vizsgálatában nyújt nagy segítséget [3, 6, 7]. Ugyanakkor e teszt alapján értékelhető a nagy multimerok mennyisége, hiszen minél több a nagy multimerok aránya, a molekula aktivitása annál magasabb [2]. A thromboticus szövődmények kockázata atheroscleroticus érbetegségekben jobban felbecsülhető a multimer szerkezet analízisével, illetve az aktivitás, a VWF kollagén kötő kapacitásának a mérésével [4, 8].

Tanulmányunk célja megvizsgálni a VWF antigénszint és a VWF kollagén kötő kapacitásának viszonyát az atheroscleroticus perifériás érbetegség különböző stádiumaiban.

## Anyag és módszer

Vizsgáltunk 103 alsó végtagi perifériás obliteratív verőérbetegségben szenvedő egyént, a marosvásárhelyi 2. sz. Belgyógyászati Klinika beteganyagából, illetve 47 egészséges kontrollt. Az atheroscleroticus perifériás verőérbetegség diagnózisát az anamnézis (a claudicatio intermittens vagy nyugalmi fájdalom jelenléte), a fizikális vizsgálat, valamint a Doppler-index (kar-boka index, ankle-brachial index – ABI) számítása alapján állítottuk fel. A betegeket a Fontaine-stádiumok szerint csoportosítottuk: I. stádium – panaszmentes; II. stádium – claudicatio intermittens – járás-kor jelentkező fájdalom; III. stádium – nyugalmi fájdalom jelenléte; IV. stádium – trófikus elváltozások jelenléte.

Dr. Varga-Fekete Tímea

540486 Marosvásárhely - Târgu Mureș  
str. Banat 3/1

E-mail: timea.vargafekete@yahoo.com

Felmértük a hagyományos rizikófaktorok jelenlétét, mint a hipertónia, cukoranyagcsere zavar (csökkent glükóztolerancia, illetve diabetes mellitus), hiperlipoproteinaemiák, gyulladásos markerek (fibrinogén, C-reaktív protein).

Mint az endothel diszfunkció markere, meghatároztuk a VWF antigén (VWF:Ag) szintet, ELISA módszerrel, a detektáláshoz peroxidázzal jelzett VWF elleni poliklonális antitestet használva (DakoCytomation). A VWF kollagén kötő kapacitásának (VWF:CBA) meghatározása során mikrotiter lemezekhez kötöttünk III típusú humán kollagént és a beteg plazmából a megkötött VWF-t ugyanazzal a peroxidázzal jelzett poliklonális antitesttel detektáltuk.

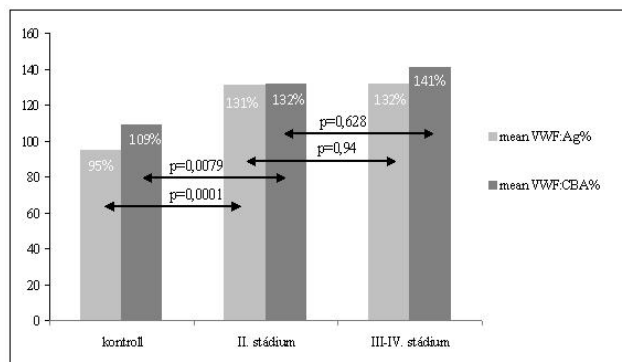
Az adatok statisztikai feldolgozását a GraphPad 4.0 for Windows program segítségével végeztük, parametrikus és non-parametrikus tesztekkel használva (a csoportok közötti összehasonlításra páratlan t-tesztet, illetve Mann-Whitney U-tesztet, korreláció számításra Spearman-korrelációt). Szignifikánsnak a  $p < 0,05$  értéket tekintettük.

## Eredmények

83 férfi és 20 nőbetegét vizsgáltunk, valamint 47 egészséges kontrollt (23 férfi, 24 nő), normális Doppler-indexel. A 103 beteg közül 59 járáskor jelentkező fájdalomról panaszkodott, Fontaine II. stádiumba sorolva őket. 44 beteg nyugalmi fájdalmat jelzett, illetve trófikus zavarok jelentek meg a végtagon, őket a III. és IV. Fontaine-stádiumba soroltuk. A III.-IV. stádiumokat összevonva krónikus kritikus végtag ischaemia csoportként tárgyaljuk. Az egyes betegcsoportok jellemzői az **1. táblázatban** vannak feltüntetve.

A kontroll csoporthoz viszonyítva, mind a VWF:Ag szint esetén, mind a VWF:CBA esetén, jelentős emelkedést láttunk mindkét betegcsoportnál. A kritikus végtag ischaemia stádiumában a Fontaine II. stádiumhoz viszonyítva hasonló VWF:Ag szintet találtunk, viszont emelkedettebb VWF:CBA értékeket, ha ez statisztikailag nem is volt szignifikáns (**1. ábra**).

A VWF:Ag szintje és kollagén kötő kapacitása között (VWF:CBA) szoros pozitív korrelációt találtunk egyaránt a beteg ( $r=0,7863$ ,  $p < 0,0001$ ) és a kontroll ( $r=0,8297$ ,  $p < 0,0001$ ) populációban. A VWF szerkezeti épsége a funkcionális aktivitás és a mennyiség arányával jellemezhető, ez



**1. ábra.** VWF:Ag szint és VWF:CBA értékei a vizsgált csoportoknál

**1. táblázat.** Az atheroscleroticus perifériás érbetegek jellemzői

Paraméterek	II. stádium	III-IV. stádium	P
átlagéletkor	64,76	68,9	
nők	6 (10,16%)	14 (31,8%)	
férfiak	53 (89,83%)	30 (68,18%)	
diabetes mellitus	15 (25,42%)	22 (50%)	
HTA	47 (79,66%)	40 (90,90%)	
ABI			
mean	0,5505	0,3182	<0,0001
SD	0,199	0,2265	
összkoleszterin (mg%)			
mean	188,2398	189,4944	0,89
SD	44,5636	48,9710	
HDL koleszterin (mg%)			
mean	46,9021	48,7183	0,47
SD	12,1281	10,6725	
triglicerid (mg%)			
mean	126,9779	122,4340	0,67
SD	49,3917	61,6342	
fibrinogén (mg%)			
mean	441,02	462,48	0,52
SD	156,67	162,36	
hsCRP (mg/l)			
mean	9,8985	8,0784	0,814
SD	21,0713	9,2572	
VWF:Ag%			
mean	130,81	131,61	0,94
SD	54,33	57,63	
VWF:CBA%			
mean	132,00	141,48	0,628
SD	52,99	60,13	

az arány normál értéke 1 körül mozog. Emelkedett VWF aktivitás esetén (több nagy multimer van jelen) az arány 1-nél nagyobb, ezt találtuk a III.-IV. Fontaine-stádiumba sorolt betegknél, viszont váratlan módon a kontroll csoportnál is (**2. táblázat**).

Vizsgáltuk az összefüggést a VWF:Ag szint és a VWF:CBA, valamint a többi funkcionális és laboratóriumi paraméter között. Mind a VWF mennyiség, mind az aktivitás esetén pozitív korrelációt észleltünk az életkorral (**2. ábra**).

A Doppler-index szignifikánsan alacsonyabb volt a III-IV. stádiumba sorolt betegeknek, mint a II. stádiumban, viszont sem a VWF:Ag szinttel, sem a VWF:CBA értékeivel nem mutatott összefüggést. Nem találtunk lényeges különbséget a hsCRP (human serum C-reactiv protein) szintjében a II. illetve III-IV. stádiumban levő betegek között, amint azt elvártuk, viszont betegeink körében pozitív korrelációt ész-

**2. táblázat.** VWF:Ag, VWF:CBA értékek és VWF:CBA/VWF:Ag arány a különböző csoportoknál.

	<i>kontroll</i>		<i>II. stádium</i>		<i>III-IV. stádium</i>
VWF:Ag% mean	95	- p=0,0001 -	131	- p=0,94 -	132
VWF:CBA% mean	109	- p=0,0079 -	132	- p=0,628 -	141
VWF:CBA/VWF:Ag mean	1,12411	- p=0,002 -	1,04367	- p=0,058 -	1,11281

leltünk a VWF:Ag szint és a hsCRP szintje között (3. ábra). A VWF:Ag szint, illetve a VWF:CBA értékek és a többi vizsgált laboratóriumi paraméter között, mint az összkoleszterin, HDL koleszterin, triglicerid, fibrinogén, nem találtunk szignifikáns korrelációt (3. táblázat).

Sem a VWF:Ag mennyiség, sem a VWF:CBA nem különbözött lényegesen a hipertóniás, illetve cukoranyagcsere zavarban szenvedő betegek körében, azokhoz viszonyítva, akiknél nem figyeltük meg e rizikófaktorokat.

## Megbeszélés

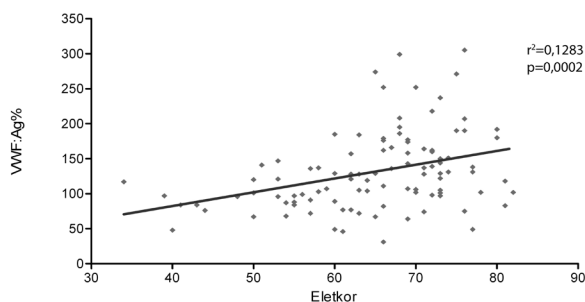
Irodalmi adatok azt jelzik, hogy a VWF szint az endothel diszfunkció markere, emelkedett értékei fokozott rizikót jelentenek cardiovascularis, thromboticus szövődmények bekövetkeztére a magas kockázatú populációban (atheroscleroticus érbetegek, illetve az atherosclerosis rizikófaktorainak jelenléte) [9]. A kritikus végtag ischaemia kialakulása általában egy atheromás plakk által beszűkített ér lumen teljes elzáródásához kötött, amit a plakk repedése következtében sérült endothelen keletkező vérrög okoz. A thrombus képződés folyamatában a vérlemezkék adhézióját

a subendothelialis térhez a VWF közvetíti, a thrombocyta kötő GPIIb/IIIa, GPIIb/IIIa receptorain keresztül. Bizonyított, hogy nagy nyíróerejű áramlási viszonyok között, megnő a nagy VWF multimerok száma, ezek több GPIIb/IIIa, illetve kollagén kötő receptorral rendelkeznek, így biztosítják a stabil thrombocyta adhéziót [4]. Míg a VWF:Ag szint az endothel diszfunkciót jelzi, újabb tanulmányok azt sugallják, hogy a thromboticus szövődmények kockázatát sokkal inkább előrejelzi a fokozott VWF aktivitás mérése, a nagy multimerok számának megnövekedése [8].

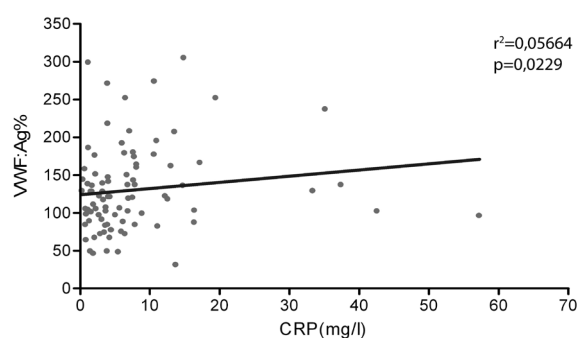
Eredményeink által sikerült megerősíteni előzetes tanulmányok következtetéseit, hogy az atheroscleroticus perifériás érbetegek körében a VWF szintje magasabb, mint az egészséges kontroll populációban, jelezve az endothel sejtek működési zavarát. Hasonlóan, emelkedettebb VWF:CBA észleltünk ezeknél a betegeknél. Amint azt többen már leírták, a VWF szint és az életkor között mi is szoros korrelációt észleltünk. Nem sikerült összefüggést kimutatni a VWF:Ag szint és az alacsony ABI között. Enyhe pozitív korrelációt észleltünk a CRP és a VWF:Ag szint között, viszont nem tudtuk alátámasztani előzetes tanulmányok következtetéseit, hogy a kritikus végtag ischaemia stádiumaiban a gyulladási markerek emelkedettebbek. A betegség előrehaladottabb stádiumaiban a VWF:Ag szint nem bizonyult magasabbnak. A VWF:CBA értékei viszont emelkedettebbek voltak a III-IV. stádiumban levő betegeknél, a II. Fontaine-stádiumhoz viszonyítva, bár statisztikailag nem jelentősen. Összehasonlítva a VWF:Ag szint változását a VWF:CBA változásával a perifériás obliteratív arteriopathia különböző stádiumaiban, azt tapasztaltuk, hogy a kritikus végtag ischaemia stádiumában, a II. stádiumhoz viszonyítva, a molekula aktivitása jobban emelkedett, mint a mennyisége, a VWF:CBA/VWF:Ag arány magasabb volt, bár ez a különbség nem volt szignifikáns. Érdekesnek találtuk, hogy a kontroll populációban is magasabb volt a VWF:CBA/VWF:Ag arány.

**3. táblázat.** A VWF:Ag szint és a többi vizsgált paraméter közötti korreláció

	<i>Spearman r</i>	<i>p value</i>
VWF:Ag * összkoleszterin	-0,0949	0,345
VWF:Ag * HDL-koleszterin	0,036	0,738
VWF:Ag * triglicerid	-0,1848	0,08
VWF:Ag * fibrinogén	0,1548	0,2007
VWF:Ag * hsCRP	0,2379	0,022
VWF:Ag * ABI	0,0394	0,708



**2. ábra.** A VWF:Ag szint és az életkor közötti korreláció



**3. ábra.** A VWF:Ag szint és a hsCRP szint közötti korreláció

## Következtetés

Annak ellenére, hogy statisztikailag nem is tudtuk alátámasztani, eredményeink arra engednek következtetni, hogy a kritikus végtag ischaemiában szenvedő betegeknél fokozott a prothromboticus aktivitás, nem egyszerűen a VWF mennyisége, hanem a nagy multimerek aránya nő meg. Így a VWF:CBA meghatározása, mint funkcionális teszt, talán alkalmasabb e betegeknél a cardiovascularis szövődmények rizikójának felmérésére. Ezek az eredmények megerősítést kérnek, amit a VWF multimer szerkezetének kvantitatív analízisével, gélelektroforetikus módszer segítségével lehet megvalósítani.

### Köszönetnyilvánítás

Köszönjük a Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Klinikai Kutató Központ munkaközösségének a kutatómunkához nyújtott támogatást

## Irodalom

1. Danesh J., Wheeler J.G., Hirschfield G.M. et al. – *C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease*, N Engl J Med, 2004, 350:1387–1397.
2. Favalaro E.J. – *An Update on the von Willebrand Factor Collagen Binding Assay: 21 Years of Age and Beyond Adolescence but Not Yet a Mature Adult*, Semin Thromb Hemost, 2007, 33:727-744.
3. Favalaro E.J. – *Von Willebrand factor collagen-binding (activity) assay in the diagnosis of von Willebrand disease: a 15-year journey*, Semin Thromb Hemost, 2002, 28:191-202.
4. Moake J.L., Turner N.A., Stathopoulos N.A. et al. – *Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation*, J Clin Invest, 1986, 78:1456–1461.
5. Morange P.E., Simon C., Alessi M.C. et al. – *Endothelial cell markers and the risk of coronary heart disease: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME) study*, Circulation, 2004, 109:1343–1348.
6. Popov J., Zhukov O., Ruden S. et al. – *Performance and clinical utility of a commercial von Willebrand factor collagen binding assay for laboratory diagnosis of von Willebrand disease*, Clin Chem, 2006, 52:1965-1967.
7. Veyradier A., Trossaert M., Lefrancois A. et al. – *Von Willebrand factor collagen binding assay with a commercial kit using type III collagen in von Willebrand disease type*, J Thromb Haemost, 2007, 5:868-870.
8. Vischer U.M. – *von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease*, J Thromb Haemost, 2006, 4:1186–1193.
9. Whincup P.H., Danesh J., Walker M. et al. – *von Willebrand factor and coronary heart disease*, Prospective study and meta-analysis, Eur Heart J, 2002, 23:1764–1770.