

Analýza multimérov von Willebrandovho faktora pri von Willebrandovej chorobe

Ing. Ingrid Škorňová, doc. MUDr. Ján Staško, mim. prof., MUDr. Pavol Hollý, PhD.,
doc. MUDr. Miroslava Dobrotová, PhD., prof. MUDr. Peter Kubisz, DrSc.

Klinika hematológie a transfuziológie, Univerzita Komenského v Bratislave,
Jesseniova lekárska fakulta v Martine a Univerzitná nemocnica v Martine

Von Willebrandova choroba (vWCH) je najčastejšie vrodené krvácavé ochorenie, spôsobené genetickou anomáliou, ktorá vedie ku kvantitatívnym a kvalitatívnym zmenám von Willebrandovho faktora (vWF). vWF je multimerický glykoproteín syntetizovaný v megakaryocytoch a endotelových bunkách. vWF sprostredkováva adhéziu trombocytov na subendotel a je nosičom FVIII, čím ho chráni pred proteolýzou. V diagnostike vWCH má zásadný význam analýza multimérov vWF. V článku uvádzame stručný prehľad klasifikácie a diagnostiky vWCH, opis metódy analýzy multimérov vWF a naše skúsenosti s ich stanovením.

Kľúčové slová: von Willebrandova choroba, von Willebrandov faktor, multiméry von Willebrandovho faktora.

The analysis of vWF multimers in von Willebrand disease

Von Willebrand disease (vWD) is the most common inherited bleeding disorder caused by quantitative or qualitative abnormalities of von Willebrand factor (vWF). vWF is a glycoprotein synthesized in megakaryocytes and endothelial cells. vWF is a mediator of platelet adhesion to subendothelium, the FVIII carrier, which protects it from proteolysis. The analysis of vWF multimers is of fundamental importance in diagnostics of vWD. In the article a brief report of the vWD classification and diagnostics as well as description of the analysis of vWF multimers and our experiences with their detection are presented.

Key words: von Willebrand disease, von Willebrand factor, multimers of von Willebrand factor.

Vask. med., 2014, 6(1): 32–34

Úvod

Von Willebrandov faktor (vWF), multimerický adhezívny glykoproteín, syntetizovaný v megakaryocytoch (~ 20 %) a endotelových bunkách (~ 80 %), je prítomný v plazme, Weibelových-Paladeho telieskach endotelových buniek a v a granulách trombocytov (1).

Z endotelových buniek je uvoľňovaný kontinuálne a aj po stimulácii alebo poškodení endotelových buniek. Z trombocytov je uvoľňovaný len po ich aktivácii. Po sekrécii do cievného riečiska podlieha proteolýze (metaloproteázou ADAMTS-13) (2, 3).

vWF sprostredkováva interakciu medzi doštičkami a subendotelom v miestach cievného poškodenia, sprostredkováva interakciu medzi doštičkami navzájom a tvorí komplex s FVIII, čím ho chráni pred proteolytickým štiepením aktivovaným PC.

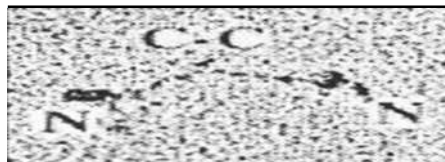
Štruktúra multimérov

Multiméry vWF majú tripletovú štruktúru, ktorá je podmienená degradačnými produktmi multimérov vznikajúcich pôsobením ADAMTS-13 za vzniku jedného intermediálneho a dvoch satelitných prúžkov s C a N-terminálnymi fragmentami (7, 8).

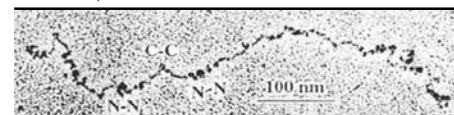
Klasifikácia vWCH

V súčasnosti je platná aktualizovaná klasifikácia vWCH z roku 2006, ktorá má základ v klasifikácii vWCH navrhutej Subkomisiou

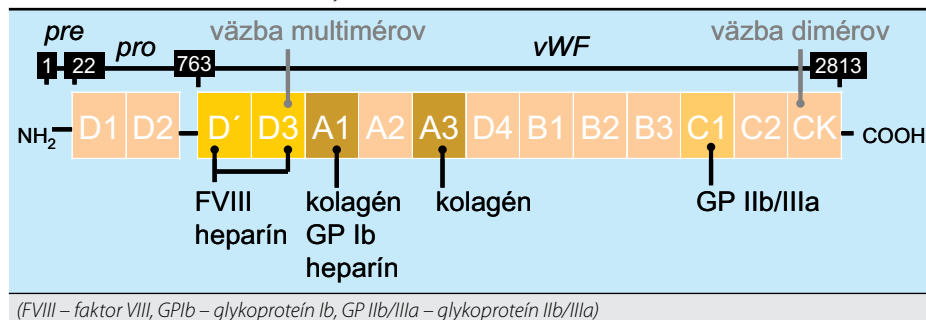
Obrázok 1. Vo Weibelových-Paladeho telieskach dochádza ku glykozylácii a molekuly vWF (von Willebrandov faktor) so svojimi C-koncami dimerizujú (4, zobrazené elektrónovým mikroskopom)



Obrázok 2. N-koncové domény bohaté na cysteín umožňujú asociáciu dimérov do väčších jednotiek, tzv. multimérov. Multiméry obsahujú variabilný počet podjednotiek (viac ako 40 monomérov vWF), (4, zobrazené elektrónovým mikroskopom)



Obrázok 3. Štruktúra vWF a vzťah jeho domén k funkciám vWF (5, 6)



pre vWF Komisie pre vedu a štandardizáciu Medzinárodnej spoločnosti pre trombozu a hemostázu (Subcommittee on von Willebrand factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis) (9).

Podľa tejto klasifikácie sa rozlišujú 3 základné typy s podtypmi (10):

- **typ 1 – parciálny kvantitatívny defekt vWF**, dedičnosť AD;
- **typ 2 – kvalitatívny defekt vWF**, dedičnosť prevažne AD;

- 2A – znížená adhézia trombocytov spojená s chýbaním HMW (high molecular weight multimers), eventuálne aj IMW (intermediate molecular weight multimers) multimérov;
- 2B – zvýšená afinita vWF k doštičkovému GPIb;
- 2M – znížená adhézia trombocytov nie je spôsobená chýbaním HMW multimérov
- 2N – znížená afinita vWF k FVIII, dedičnosť AR;
- **typ 3 – úplný nedostatok vWF**, dedičnosť AR (AD – autozómálne dominantná, AR – autozómálne recesívna)

Laboratórna diagnostika vWCH

V laboratórnej diagnostike vWCH rozlišujeme testy:

- **skríningové** → slúžia na určenie pacientov s možnou vWCH: čas krvácania, APTT (aktivovaný parciálny tromboplastínový čas), kompletný krvný obraz vrátane počtu a veľkosti trombocytov, vyšetrenie primárnej hemostázy – funkcie trombocytov pomocou špecializovaných analyzátorov (napríklad PFA-100). Ani jeden z testov nie je tak senzitívny, aby zachytil všetky typy vWCH. Cieľom týchto testov nie je jednoznačne potvrdiť vWCH, ale vymedziť populáciu s vysokou pravdepodobnosťou jej výskytu.
- **špecifické** → slúžia na stanovenie diagnózy vWCH: vWF: Ag (stanovenie plazmatickej hladiny von Willebrandovho faktora), FVIII:C (stanovenie plazmatickej aktivity faktora VIII), vWF:CB (aktivita väzby vWF na kolagén), vWF:RCo (aktivita ristocetínového kofaktora vWF).
- **doplňujúce testy** → slúžia na určenie podtypu vWCH: analýza multimérov, RIPA (ristocetínom indukovaná agregácia trombocytov), väzba vWF na FVIII, genetická analýza. Podľa molekulovej hmotnosti a veľkosti molekuly delíme multiméry na:
 - **multiméry s nízkou molekulovou hmotnosťou** (low molecular weight multimers; **LMW** multiméry),
 - **multiméry so strednou molekulovou hmotnosťou** (intermediate molecular weight multimers; **IMW** multiméry),
 - **multiméry s vysokou molekulovou hmotnosťou** (high molecular weight multimers; **HMW** multiméry),
 - **multiméry s extrémnou veľkosťou** (ultra large multimers; **UL** multiméry).

Analýza multimérov vWF

Princípom vyšetrenia je separácia jednotlivých multimérov pomocou gélovej elektroforézy na agarózovom alebo polyakrylamidovom géli s následnou vizualizáciou buď priamo v géli, alebo na imobilizačnej membráne po prenesení vWF pomocou western blottingu.

Pri vizualizácii sa na označenie vWF používajú enzýmom značené protilátky proti ľudskému vWF, prípadne kombinácia primárnej značenej protilátky proti ľudskému vWF a sekundárnej značenej protilátky proti primárnej protilátke.

Detekcia sa uskutočňuje podľa typu značenia protilátok: využíva sa vizuálna, denzitometria, luminografia, autorádiografia.

Metóda

Na našom pracovisku používame metodiku analýzy multimérov vWF vychádzajúcu z prác Enayata (J. Clin pathol. 1983) a Ruggeriho (Ann NY Acad Sci. 1981) (12, 13).

Príprava vzorky

Vzorky sme odobrali od pacientov KHaT v Martine do 3,2 % (0,109 M) citrónanu sodného v pomere 1 : 10. Centrifugáciou pri 3 000 g 20 minút sme separovanú plazmu priamo analyzovali, respektíve uskladnili pri – 80 °C. Plazmu zdravého darcu sme použili ako kontrolnú vzorku. Vzorky sme riedili vzorkovým pufrum 1 : 2, 1 : 10 (až 1 : 100) v závislosti od koncentrácie vWF.

Príprava agarózového gélu

Separáciu multimérov sme uskutočnili na štartovacom géli s koncentráciou agarózy 0,8 % a separačnom géli s koncentráciou agarózy 1,5 %.

Pre zabezpečenie rovnakej hrúbky gélu sme rozpustenú agarózu 1,5 % ochladili na 60 °C a vyliali na Gelbond film (Sigma) uložený medzi sklenenými platňami (130 x 110 mm) s hrúbkou 15 mm medzi nimi. Gél sme nechali najprv 30 minút pri izbovej teplote (20 °C – 25 °C) a potom hodinu pri 4 °C. Oddelili sme sklenené platne od seba a z vrchnej časti gélu sme odstránili pásik o šírke 2,5 – 3 cm. Priložili a upevnili sme sklenené platne ku gélu a na miesto odstráneného pásika sme vyliali na 60 °C ochladený štartovací gél 0,8 %. Gél sme nechali 30 minút inkubovať pri izbovej teplote a hodinu pri 4 °C. Po odstránení sklenených platní sme v časti štartovacieho gélu vyrezali jamky pre aplikáciu vzoriek.

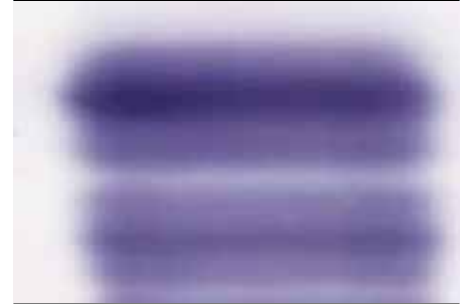
Elektroforéza

Elektroforetická zostava pozostávala z Multiphor II Electrophoresis System, EPS 3501XL Power Supply, Multitemp III-Termostatic Circulator, Švédsko.

Na chladiacu platňu, ktorú sme chladili na 15 °C sme položili gél na gel-bond filme tak, aby sa vzorky pohybovali v smere katóda-anóda. Do elektroforetickej vane sme do bočných častí po oboch stranách naliali liter elektroforetického pufru (pH = 8,35). Pripravenými asi 10 x 12 cm dlhými kúsokmi filtračného papiera – Whatman sme prekryli obidva konce gélu. Druhé konce filtračného papiera sme nechali ponorené do elektroforetického roztoku.

Do zriedenej plazmy sme pridali brómfenolovú modrú (1 %, Sigma) pre viditeľné putovanie vzorky. Takto pripravenú plazmu v objeme 20 µl sme dávkovali do vyrezaných jamiek gélu. Zapli sme elektroforézu na 30 mA (230 V) cca 30 – 60 minút. Po vycestovaní vzorky z jamky sme zaliali jamky a redukovali prúd na 5 mA. Elektroforézu

Obrázok 4. Tripletová štruktúra vWF (vlastné údaje)



Obrázok 5. Elektroforetická zostava (vlastné údaje)



sme ukončili cca po 20 – 24 hodinách, keď sme mali farebný prúžok asi 1 cm pod okrajom gélu preloženého filtračným papierom. Gél sme opatrne vybrali z elektroforetickej chladiacej platne a premývali destilovanou vodou hodinu až dve na rotačnej miešačke a niekoľkokrát vymenili vodu.

Enzymoimunoanalýza a vizualizácia

Gél sme vysušili medzi filtračným papierom, prípadne fénom so stredným stupňom.

Gél sme potom vložili do nádoby s TBS (Tris pufer, pH = 7,4) s 5 % odtučneným sušeným mliekom a inkubovali minimálne 90 minút na miešačke s malou rýchlosťou.

Niekoľkokrát sme gél premyli destilovanou vodou.

Gél sme vložili do zriedenej primárnej protilátky (rabbit anti-human vWF, DAKO), ktorú sme pripravili riedením 1 : 2 000, 12,5 µl primárnej protilátky a 25 ml TBS. Nechali sme ho inkubovať v protilátke cez noc a dbali sme, aby pod géлом neboli bubliny.

Na druhý deň ráno sme vybrali gél z roztoku primárnej protilátky a opatrne niekoľkokrát premyli v destilovanej vode.

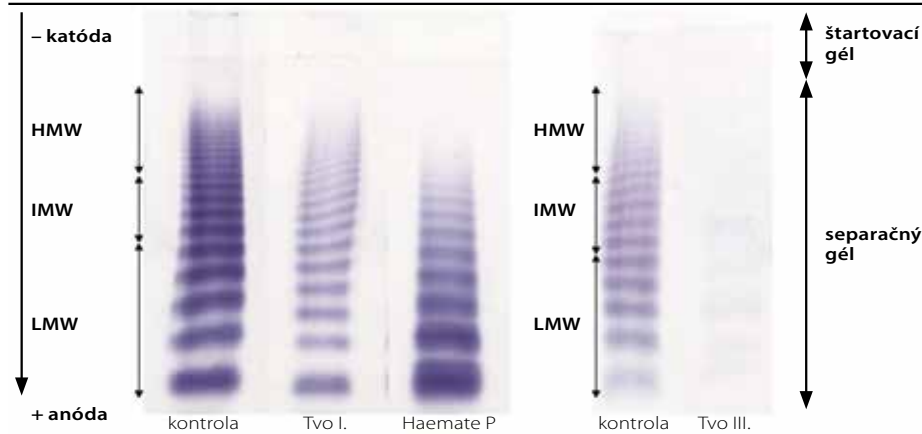
V priebehu 6 – 8 hodín sme ho premývali v 100 – 150 ml TBS + 0,05 % Tween, ktorý sme menili osemkrát.

Vložili sme gél do zriedenej sekundárnej protilátky (swine anti-rabbit/AP, DAKO), ktorú sme pripravili riedením 1 : 2 000, 12,5 µl primárnej protilátky a 25 ml TBS. Nechali sme ho inkubovať v protilátke cez noc a dbali sme, aby pod géлом neboli bubliny.

Na druhý deň ráno sme gél vybrali z roztoku sekundárnej protilátky a opatrne niekoľkokrát premyli v destilovanej vode.

V priebehu 6 – 8 hodín sme ho premývali v 100 – 150 ml TBS + 0,05 % Tween, ktorý sme menili osemkrát.

Obrázok 6. Analýza multimérov vWF u zdravého darcu (kontrola), u pacienta s vWCH (typu I. a typu III.), Haemate P (koagulačný faktor VIII ľudský s von Willebrandovým faktorom) (vlastné výsledky)



Prípravili sme 20 ml roztoku z kitu „25 x Alkaline Phosphatase colour“ (Alkaline phosphatase conjugate kit-Biorad). 800 µl 25 x AP pufru sme pridali do 20 ml destilovanej vody a do tohto roztoku sme postupne pridali 200 µl roztoku A a 200 µl roztoku B a premiešali sme.

Gél sme vložili do pripraveného roztoku, jemne sme miešali do vytvorenia relevantného zobrazenia multimérov, čo trvalo až do 45 minút.

Po ukončení reakcie sme z roztoku vybrali gél a premývali sme ho 30 – 60 minút v destilovanej vode s dvoma výmenami.

Výsledky analýzy

Výsledky analýzy znázorňuje obrázok 6.

Diskusia

Pre správnu funkciu vWF sú nevyhnutné HMW multiméry. Identifikovanie multimérov pri ich analýze je arbitrárne. Najčastejšie sa používa klasifikácia, podľa ktorej sa prvých 5 najrýchlejšie migrujúcich multimérov na anódovom konci gélu považuje za LMW multiméry, ďalších 5 za IMW multiméry a všetky ostatné za HMW multiméry (11).

Pri *in vitro* analýze pomocou gélovej imunoelktroforézy je možné vizualizovať zo vzorky plazmy jednotlivé multiméry vo forme jasne oddelených prúžkov. V závislosti od použitej metodiky a vzorky je možné vizualizovať 10 – 20 multimérov.

Štruktúra multimérov vWF v plazme je komplexným výsledkom metabolizmu vWF a jeho jednotlivých procesov – syntézy, posttranslačných úprav, sekrecie, proteolýzy, konzumpcie a klirensu. Zmena jedného, prípadne viacerých procesov vedie k charakteristickým zmenám multimérov vWF. Aj napriek tomu, že analýza multimérov vWF je časovo a finančne náročná a nemá v súčasnosti rovnocennú náhradu, je dôležitým vyšetrením v diagnostike vWCH.

Naše doterajšie výsledky analýzy multimérov vWF metódou podľa Enayat et al. a Ruggeri et al. (12, 13) dokázali, že uvedenou metódou je možné potvrdiť prítomnosť multimérov vWF vo vzorkách kon-

centrátov koagulačného faktora VIII s vWF (Haemate P, Fanhdi), vo vzorkách koncentrátu vWF (Willfact), vo vzorkách kontrolných jedincov (darcov krvi) a vo vzorkách pacientov s vWCH. Na výsledok analýzy vo výraznej miere vplýva aj preanalytická fáza, nutné je minimalizovať aktiváciu trombocytov minimálnym traumatickým odberom, použiť 3,2 % citrónan sodný ako antikoagulačné činidlo a správne manipulovať so vzorkou. HMW multiméry sú menej odolné voči teplotným výkyvom a dĺžke skladovania, čo môže viesť k falošne pozitívnemu výsledku. Z tohto dôvodu sme vzorky po centrifugácii rozdelili po 200 µl do mikroskúmaviek a zamrazili, prípadne ihneď vykonali analýzu. Z dôvodu správneho určenia typu, prípadne podtypu vWCH sme každú vzorku pacienta vyšetrovali dvakrát v rôznom časovom úseku. Porovnali sme aj analýzy vzoriek toho istého pacienta s vWCH pred a po podaní lieku s obsahom vWF. Na základe našich výsledkov, pri dodržaní všetkých uvedených podmienok analýzy vrátane pH roztokov, dĺžky elektroforézy, dĺžky inkubácie s protilátkami, opakovaným premývaním gélov, je možné predpokladať, že túto metódu bude možné použiť u pacientov s vWCH pri monitorovaní liečebnej odpovede a pri určení typu vWCH a aj pri rozlíšení kvalitatívnych podtypov vWCH.

Správne rozlíšenie jednotlivých podtypov pri type 2 vWCH má veľký význam pre lekára pri indikácii správneho liečebného postupu. Dezmozepresín (1-deamino 8-D-arginin vasopresin – desmopressin – DDAVP), ktorý je liekom voľby pre pacientov s typom 1 vWCH, je možné úspešne (hoci s krátkodobým účinkom pre degradáciu multimérov s HMW v cirkulácii) použiť pre liečbu podtypu 2A vWCH. Naopak, DDAVP je kontraindikovaný pre liečbu podtypu 2B vWCH z dôvodu rizika navodenia trombocytopenie a trombotických komplikácií. DDAVP taktiež nie je účinný v liečbe podtypu 2M a je len zriedkavo účinný pri podtype 2N vWCH (14, 15).

Záver

Analýza multimérov vWF sa môže uplatniť u pacientov na určenie typu vWCH, určenie pato-

mechanizmu, respektíve zmeny niektorého procesu v metabolizme vWF, zhodnotenie prítomnosti multimérov vWF s HMW v koncentrátoch koagulačného faktora VIII s vWF a v koncentrácii vWF a tiež pri monitorovaní liečebnej odpovede. Z klinického hľadiska určenie typu a podtypu vWCH súvisí so správnou indikáciou liečby. Naším cieľom je zavedenie metodiky analýzy multimérov vWF do štandardnej diagnostiky u pacientov s vWCH, a to predovšetkým za účelom upresnenia podtypov vWCH typu 2, čo umožní skvalitniť liečebný manažment týchto pacientov.

Podakovanie

Táto práca bola podporená projektmi CEVYPET (ITMS 26220120053) Centrum excelentnosti pre personalizovanú terapiu, APVV 0222-11, Vega 1/0016/12 a Centra excelentnosti pre perinatologický výskum (CEPVII, ITMS 26220120036), ktorý je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ.

Literatúra

- Weibel ER, Palade GE. *J. Cell. Biol.* 1964;23:101.
- Murray EW. Von Willebrand disease: Pathogenesis, classification and management. *Transf Med Rev.* 1996;10:93–110.
- Lyons JE, Ginsburg D. Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. *Trends Cardiovasc Med.* 1994;4:34–39.
- Gary B, Smejkal P. Rapid high-resolution electrophoresis of multimeric von Willebrand Factor using a thermopiloted gel apparatus. *Electrophoresis.* 2003;24:582–587.
- Biner B. Von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Haema.* 2005;8:405–418.
- Baronciani L, Mannucci PM. The molecular basis of von Willebrand disease. In: Provan D, Gribben J, eds. *Molecular Hematology*. 2nd ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.; 2005:324:199–209.
- Plaimauer B, Zimmermann K, Völkel D, et al. Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood.* 2002;100:3626–3632.
- Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al. von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome. *N Engl J Med.* 1998;339:1578–1584.
- Sadler JE. A revised classification of von Willebrand disease. *Thromb Haemost.* 1994;71:520–525.
- Sadler JE, Budde U, Eikenboom J, et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: report of the Subcommittee on von Willebrand factor. *J Thromb Haemost.* 2006;4:2103–2114.
- Haberichter SL, Montgomery RM. Structure and function of von Willebrand factor. In: Colman RW, et al. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2006:1827.
- Enayat MS, Hill FG. Analysis of the complexity of the multimeric structure of FVIII related antigen/von Willebrand protein using a modified electrophoretic technique. *J. Clin Pathol.* 1983;36:915–9.
- Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Classification of variant vWD subtypes by analysis of functional characteristics and multimeric composition of FVIII/von Willebrand factor. *Ann NY Acad Sci.* 1981;370:205–9.
- Mannucci PM. How I treat patients with von Willebrand disease? *Blood.* 2001;97:1915–1919.
- Lillicrap D. von Willebrand disease: Advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy. *Blood.* 2013;122:3735–3740.

Ing. Ingrid Škorňová

Klinika hematológie a transfuziologie JLF UK
Univerzitná nemocnica Martin
Kollárova 2, 036 01 Martin
skornova@jmed.uniba.sk