

Diagnostika a diferenciálna diagnostika von Willebrandovej choroby

MUDr. Zuzana Mazancová, prof. MUDr. Ján Staško, PhD., prof. MUDr. Peter Kubisz, Csc., Ing. Ingrid Škorňová, PhD.
Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfuziológie, Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine a Univerzitná nemocnica v Martine

Von Willebrandova choroba je najčastejšie vrodené krvácavé ochorenie. Je spôsobené kvalitatívnym (typ 2) alebo kvantitatívnym (typ 1 a 3) defektom von Willebrandovho faktora. Typ 2 sa delí na podtypy 2A, 2B, 2M a 2N. Na správny manažment ochorenia je nevyhnutné určiť, o aký typ ochorenia ide. Na presnú diagnostiku sa využíva celý panel vyšetrení, ktoré môžeme rozdeliť na skríningové, špecifické a diskriminačné.

Kľúčové slová: von Willebrandova choroba, von Willebrandov faktor, diagnostické testy

Diagnosis and differential diagnosis of von Willebrand disease

Von Willebrand disease is the most common bleeding disorder. It is caused by qualitative (type 2) and quantitative (types 1 and 3) defect of von Willebrand factor. Type 2 is divided into subtypes 2A, 2B, 2M and 2N. It is essential for optimal management of the disease to identify the type of von Willebrand disease. For the exact diagnosis a wide scale of the tests is inevitable. There are screening, specific and discriminating tests.

Key words: von Willebrand disease, von Willebrand factor, diagnostic tests

Vask. med., 2016, 8(2): 63–67

Úvod

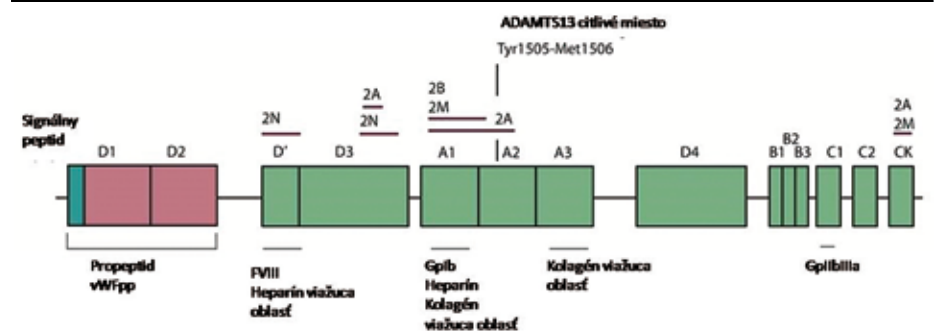
Von Willebrandova choroba (vWD) je najčastejšie vrodené krvácavé ochorenie. Jeho prevalencia v populácii je 1 %. Jeho podstatou je vrodený defekt koncentrácie, štruktúry alebo funkcie von Willebrandovho faktora (vWF). Von Willebrandov faktor je plazmatický glykoproteín nevyhnutný na priebeh primárnej hemostázy a koagulačnej kaskády.

Úloha vWF v hemostáze

vWF je veľký multimerický glykoproteín, ktorý plní dôležitú úlohu v primárnej hemostáze. Zabezpečuje adhéziu krvných doštičiek k exponovanému subendotelu prostredníctvom GPIb a agregáciu trombocytov väzbou na aktivovaný GPIIb/IIIa. Ďalšia funkcia vWF súvisí s koagulačným faktorom VIII. vWF stabilizuje FVIII, bráni jeho inaktivácii aktivovaným proteínom C alebo aktivovaným faktorom X (FXa), predlžuje jeho biologický polčas a zabezpečuje lokalizáciu FVIII v mieste poruchy cievnej steny (1).

vWF je syntetizovaný bunkami cievneho endotelu a megakaryocytmi kostnej drene. Vo vaskulárnom endotelu je uvoľňovaný sčasti kontinuálne. Sčasti je skladovaný vo Weibel-Paladeho telieskach, z ktorých je uvoľnený po stimulácii alebo poškodení endotelálnych buniek. vWF syntetizovaný v megakaryocytoch je skladovaný v alfa granulách krvných doštičiek, z ktorých sa uvoľní len po ich aktivácii.

Obrázok 1. Štruktúra vWF. Obrázok schematicky znázorňuje štruktúru monoméru vWF. Sú tu vyznačené miesta, ktorých poškodenie má za následok konkrétny typ vWD, a zároveň sú vyznačené aj väzobné miesta pre rôzne ligandy.



Plazmatický vWF má biologický polčas 9–15 hodín. Je prítomný vo forme multimérov, ktoré sú objektom fyziologickej degradácie metaloproteinázou ADAMTS13 (2).

Syntéza vWF

Gén kódujúci vWF je lokalizovaný na špičke krátkeho ramienka 12. chromozómu. vWF je syntetizovaný ako prekurzorový proteín pre pro-vWF, ktorý obsahuje signálny peptid s dĺžkou 22 aminokyselín a propeptid dĺžky 741 aminokyselín. Prekurzorový vWF podstúpi glykozyláciu, multimerizáciu a odštiepenie signálneho peptidu a propeptidu. Propeptid môže byť následne rozštiepený alebo uvoľnený do krvného riečiska. Voľný propeptid je identifikovaný v krvi ako antigén II von Willebrandovho faktora. Monomér vWF obsahuje 4 typy domén (A–D), ktoré sú zoradené v presnom poradí (obrázok 1).

Disulfidové mostíky potrebné na dimerizáciu a polymerizáciu vWF sa nachádzajú na C-terminálnom konci D3 domény. Multiméry vWF delíme na multiméry s nízkou, strednou a vysokou molekulovou hmotnosťou. Stupeň multimerizácie vWF je podstatný pre jeho úlohu pri adhezii a agregácii trombocytov. Väzobné miesto pre FVIII je lokalizované na N-koncovej časti medzi aminokyselinami 1 a 272. Väzobné miesto pre GPIb, heparín a sulfidy boli identifikované na doméne A1. vWF viaže kolagén cez 2 väzobné miesta. Doména A3 obsahuje väzbové miesto pre kolagén typu I a III. A1 doména viaže nefibrilárny kolagén typu VI (3).

Rozdelenie vWD

V súčasnosti je platná aktualizovaná klasifikácia vWD z roku 2006, ktorá má základ v klasifikácii vWD navrhutej subkomisiou pre

vWD Medzinárodnej spoločnosti pre trombózu a hemostázu (International Society on Thrombosis and Hemostasis). Podľa tejto klasifikácie sa rozlišujú 3 základné kategórie: parciálny kvantitatívny defekt (typ 1), kvalitatívny defekt (typ 2) a úplný deficit (typ 3). Typ 2 vWD sa ďalej delí na 4 podtypy (2A, 2B, 2M, 2N) na základe odlišného fenotypu (4).

Typ 1 predstavuje čiastočný kvantitatívny deficit vWF. Tvorí asi 75 % všetkých prípadov vWD. Koncentrácia vWF v plazme je nízka, hladina antigénu vWF sa pohybuje v rozmedzí 5 – 50 %. Laboratórne hodnoty preukazujú pokles koncentrácie proteínu (vWF:Ag) a aktivity vWF (vWF:RCo). FVIII je znížený sekundárne z dôvodu redukcie vWF. Pretrvávajúci vWF má zachovanú funkčnú aktivitu zodpovedajúcu hladine jeho antigénu v plazme. Môžu byť prítomné odchýlky v štruktúre vWF a mierne zníženie HMW multimérov. Dedičnosť je autozomálne dominantná. Príčinou na molekulárnej úrovni sú najčastejšie (75 %) missense mutácie spôsobené zámennou 1 aminokyseliny v reťazci (5).

Typ 1C („C“ je skratka od *clearens*, teda odbúravanie) je charakterizovaný zvýšeným odbúraním produkovaného vWF. vWF a propeptid (vWF:pp) sú u zdravého jedinca syntetizované v pomere 1 : 1. Zmena pomeru v prospech propeptidu naznačuje skrátene prežívanie vWF v cirkulácii. Má to aj terapeutický význam. Pacienti trpiaci vWD typu 1C odpovedajú na podanie dezmopresínu. Efekt liečby pomínie v priemere do 3 hodín (6).

Typ 2A je najbežnejší kvalitatívny defekt vWD, ktorý zahŕňa 10 – 15 % pacientov s vWD. V plazme chýbajú HMW multiméry vWF. Je znížená funkčná aktivita vWF a adhézia trombocytov závislá od vWF. Koncentrácia vWF:Ag a FVIII môže byť normálna alebo len hranične redukovaná. Funkcia vWF je výrazne abnormálna, čo dokazuje výrazne znížený vWF:RCo. Dedičnosť je autozomálne dominantná. Príčinou ochorenia sú väčšinou missense mutácie (5).

Typ 2B vWD sa vyznačuje zvýšenou afinitou plazmatického vWF k väzbe na GPIIb alfa krvných doštičiek. Defekt spôsobuje spontánnu väzbu HMW multimérov na krvné doštičky, nasledovanú znížením množstva HMW multimérov a poklesom počtu krvných doštičiek. Zvyšné multiméry nie sú dostatočne hemostaticky aktívne a pacient trpí krvácanými epizódami disproporcionálne k hodnote vWF. Antigen vWF a FVIII zostávajú v norme alebo sú len mierne znížené. Funkčná aktivita vWF v plazme je znížená. Trombocytopenia môže byť intermitentná a je často exacerbovaná stresovými faktormi, ako sú

Tabuľka 1. Klasifikácia von Willebrandovej choroby (5)

Typ	Podtyp	Popis	Dedičnosť
Typ 1		parciálny kvantitatívny defekt vWF	AD
Typ 2	2A	znížená adhézia trombocytov spojená s chýbaním HMW prípadne aj IMW multimérov	AD
	2B	zvýšená afinita vWF k doštičkovému GPIIb	AD
	2M	znížená adhézia trombocytov nie je spôsobená chýbaním HMW multimérov	AD
	2N	znížená afinita vWF k FVIII	AR
Typ 3		úplný nedostatok vWF	AR

AD – autozomálne dominantná; AR – autozomálne recesívna; HMW – s vysokou molekulovou hmotnosťou; IMW – so strednou molekulovou hmotnosťou

infekcia alebo tehotenstvo. In vitro sa porucha väzobného miesta pre GPIIb prejavuje výrazným zvýšením agregácie trombocytov po ristocetíne. Najvýznamnejšou laboratórnou diagnostickou metódou na odlišenie od iných typov vWD je teda RIPA (5).

Typ 2M vWD je variant, pri ktorom je narušená adhézia trombocytov k molekulám vWF. Distribúcia multimérov vWF je normálna, HMW multiméry nie sú redukované. Defektná je štruktúra multimérov. Koagulačné nálezy zodpovedajú predchádzajúcim kvalitatívnym defektom. Funkčná aktivita vWF je redukovaná výraznejšie než vWF:Ag (5).

Typ 2N vWD je spojený s poruchou miesta väzuceho FVIII blízko N-terminálneho konca podjednotky vWF. Porucha spočíva v zníženej väzobnej kapacite vWF pre FVIII. Prítomná je missense mutácia, ktorá selektívne inaktívuje toto väzobné miesto. Tento fenotyp má AR dedičnosť. Funkcie spojené s krvnými doštičkami ostávajú zachované. Nie je prítomná porucha v oblasti multimérov. Hodnota FVIII je nízka (0,05 – 0,25 IU/ml). Správna diagnóza sa stanoví dôkazom toho, že pacienti s vWF majú zníženú väzobnú aktivitu k FVIII pri teste vWF:FVIIIb (väzobná kapacita vWF k FVIII) alebo tiež dôkazom mutácie vWF. Fenotyp je podobný ľahkej hemofilii, dedičnosť je autozomálne recesívna (5).

Typ 3 vWD sa vyznačuje autozomálne recesívnou dedičnosťou. Prevalencia tohto typu je 0,5 – 3 na milión obyvateľov. Homozygoti trpia závažnými krvácanými prejavmi od detstva, často s hemofilickým typom krvácania (do kĺbov a svalov). Typ 3 vWD je charakterizovaný ťažkým kvantitatívnym defektom vWF, ktorý je prítomný v plazme a trombocytoch v stopovom množstve (0 – 5 %). FVIII býva len zriedkavo znížený pod 1 % a dosahuje hladiny 1 – 10 %. Laboratórne testy vykazujú často nedetegovateľné hodnoty vWF (vWF:Ag) a rovnako zníženú až nulovú funkčnú aktivitu (vWF:RCo). Dôsledkom poruchy

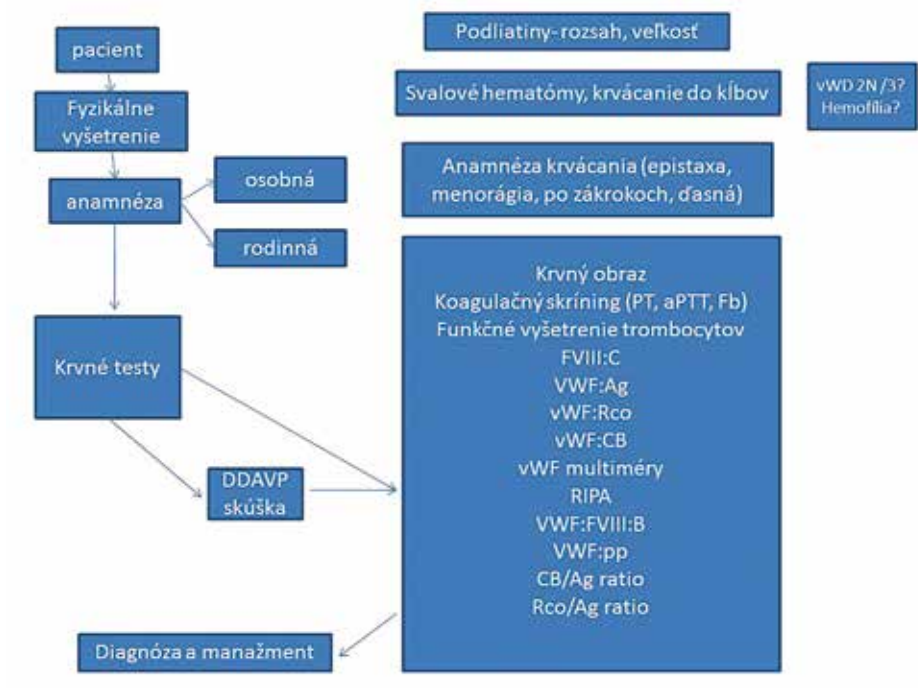
Tabuľka 2. Závažné symptómy mukokutánneho krvácania (6)

Epistaxa \geq 2 epizódy bez anamnézy traumy, ktoré neustalo krátkou kompresiou za menej ako 10 minút alebo \geq 1 epizóda vyžadujúca krvnú transfúziu
Predĺžené krvácanie z ľahkého poranenia trvajúce minimálne 15 minút alebo jeho spontánny návrat počas 7 dní po poranení
Kutánne krvácanie alebo tvorba hematómov po minimálnej alebo nepostrehnutej traume
Krvácanie z ústnej dutiny vyžadujúce lekársky zásah ako gingiválne krvácanie, krvácanie po pohyzení pier, jazyka
Spontánne gastrointestinálne krvácanie vyžadujúce lekársky zásah alebo vedúce k anémizácii nespôsobenej ulceráciou alebo portálnou hypertenziou
Silné, predĺžené alebo rekurentné krvácanie po extrakcii zubu alebo inom chirurgickom zásahu v ústnej dutine ako tonzilektómia vyžadujúce lekársky zásah
Menorágia vedúca k anémii alebo vyžadujúca lekársky zásah nespôsobená štrukturálnymi léziami uteru
Iné krvácanie kožné, slizničné alebo z iných povrchov vyžadujúce lekársky zásah (semenník, oko, ucho, respiračný systém, genitourinárny systém)

koagulácie z nedostatku FVIII je aj predĺžený aPTT. Tento typ je geneticky heterogénny, okrem missense mutácií sú často opisované nonsense a frameshift mutácie (5).

Klinická diagnostika vWD

Hodnotenie pacientov s mukokutánym krvácaním by malo začať podrobným hodnotením osobnej a rodinnej anamnézy. Medzinárodná spoločnosť pre trombózu a hemostázu (ISTH – Scientific Subcommittee (SSC) on von Willebrand factor) vytvorila štandardy na hodnotenie krvácaných prejavov. Na diagnostiku sú potrebné minimálne 2 závažné krvácané symptómy bez potreby krvnej transfúzie, 1 závažný krvácaný symptóm s potrebou krvnej transfúzie alebo 1 krvácaný symptóm vyskytujúci sa v minimálne 3 situáciách spojených so závažným krvácaním.

Obrázok 2. Postup pri diagnostike vWD (6)

vWF SSC tiež definovala kritériá pre pozitívnu rodinnú anamnézu spojenú s vWD 1. typu ako: minimálne 1 prvostupňový príbuzný alebo 2 druhostupňoví príbuzní s anamnézou závažného mukokutánneho krvácania alebo laboratórne potvrdenou vWD. V čase krvácania pacienta by pozitívna osobná anamnéza mala byť dôvodom laboratórneho testovania zameraného na vWD (6).

Laboratórna diagnostika vWD

Podozrenie na vWD vzniká na základe výsledkov skriningových testov (PT, aPTT, krvný obraz, funkčné vyšetrenie trombocytov). Špecifické testy slúžia na stanovenie diagnózy von Willebrandovej choroby (vWF:Ag, FVIII:C, vWF:CB, vWF:RCo). Diskriminačné testy sa využívajú na určenie podtypu von Willebrandovej choroby (analýza multimérov vWF, RIPA, väzba von Willebrandovho faktora na FVIII, genetická analýza) (7).

Skriningové vyšetrovacie metódy

Kompletný krvný obraz môže identifikovať trombocytopéniu alebo iné abnormality krvných buniek. PT a hodnota fibrinogénu sú pri vWD v norme, aPTT môže byť predĺžený. Pri typoch 1, 2A, 2B a 2M je aPTT normálny. Predĺžený je pri vWD typu 3 a 2N z dôvodu zníženého množstva FVIII v plazme (8).

Ďalším významným skriningovým vyšetrením je meranie **funkcie krvných doštičiek**. Na našom pracovisku využívame metódu PFA-100. Na meranie využívame kazety (cartri-

ges) s kolagénom a epinefrínom (CEPI) alebo kolagénom a ADP (CADP). Tieto látky indukujú adhéziu doštičiek, ich aktiváciu a agregáciu, ktorá vedie k rýchlej oklúzii otvoru v prístroji a prerušeniu toku krvi, čo sa označuje ako čas uzatvorenia „closure time“ (CT). Referenčné hodnoty CT sú pri CEPI komôrke 78 – 199 s. a pri CADP komôrke 55 – 137 s. Pri vWD sú obe hodnoty vyššie (predĺžené) ako referenčná hodnota. Ide o vysokosenzitívne vyšetrenie na vWD. Senzitivita na typy 2A, 2M, 2B a 3 je 100 %. Pri type 1 je senzitivita 80 %, so stúpajúcou senzitivitou pri redukcii plazmatického vWF. Ide o vyšetrenie s vysokou negatívnou prediktívnou hodnotou. Pri normálnej hodnote CT je vWD veľmi nepravdepodobná (8).

Hladina FVIII je najtypickejšie testovaná prostredníctvom vyhodnotenia koagulačnej aktivity faktora VIII (**FVIII:C**). Redukcia množstva vWF v plazme je spojená s následnou zmenou koncentrácie FVIII. Referenčné hodnoty FVIII:C v plazme sú 0,45 – 1,8 IU/ml. Hodnoty FVIII:C v plazme sú pri vWD typu 1 mierne znížené, pri vWD 2A, 2B a 2M normálne alebo mierne znížené. Pri typoch 2N a 3 sú výrazne znížené s hodnotou < 0,2 IU/ml. Meranie FVIII:C teda pomáha oddiferencovať typy 2N a 3 od ostatných typov vWD. Na odlišenie vWD typu 2N a 3 od hemofílie A sú potrebné ďalšie testy. Najčastejšou metódou merania FVIII:C je tzv. one stage assay (jednostupňová koagulačná metóda). Je najdostupnejšia a je vykonávaná automatickými analyzátorami. Jej nevýhodou je, že môže podhodnotiť koncentráciu FVIII pri

vWD a rovnako pri hemofílii. Iné metódy, tzv. two stage assay (dvojstupňová koagulačná metóda) a chromogénna metóda, sa využívajú zriedkavejšie, sú dostupné hlavne v špecializovaných centrách (1).

Vyšetrenie **vWF:Ag** meria koncentráciu proteínu vWF v plazme pomocou imunologických metód. Najčastejšie je vWF:Ag meraný metódou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) za použitia polyklonových protilátok. Často sa tiež využíva metóda LIA (automated latex immunoassays) s turbidimetrickým systémom za použitia viacerých monoklonových protilátok. Normálna hodnota vWF:Ag je 0,45 – 2,0 IU/ml. Hodnoty sú znížené pri vWD typu 1, znížené alebo normálne pri vWD typu 2A, 2B a 2M, normálne pri type 2N. vWF:Ag absentuje alebo sa vyskytuje len v stopových množstvách pri vWD typu 3 (1).

Na stanovenie funkčnej aktivity vWF slúži aktivita ristocetínového kofaktora (**vWF:RCo**). Toto vyšetrenie meria schopnosť vWF aglutinovať trombocyty v prítomnosti ristocetínu. Ristocetín je antibiotikum v minulosti používané na liečbu stafylokokových infekcií. Spôsobuje naviazanie vWF na doštičkový receptor GPIIb. Aglutinácia navodená ristocetínom môže nastať len za prítomnosti multimérov vWF. Rýchlosť ristocetínom indukovanej aglutinácie má vzťah ku koncentrácii a funkčnej aktivite plazmatického vWF. Vyšetrenie vWF:RCo využíva pacientovu plazmu chudobnú na trombocyty, pridáva sa ristocetín a doštičky fixované formalínom, ktoré len pasívne aglutinujú (nedochádza k aktívnej agregácii vitálnych trombocytov). Formalín neumožňuje dodaným trombocytom sekréciu vWF z ich α -granúl, a preto meria len aktivitu vlastného vWF. Vyšetrenie je senzitívne na konformačné zmeny vWF (vWD 2A, 2B, 2M) a prítomnosť HMW multimérov. Referenčné hodnoty vWF:RCo sú 0,35 – 3,5 IU/ml. Hodnoty sú znížené pri vWD typu 1, znížené alebo normálne pri vWD typu 2B, znížené v závislosti od vWF:Ag pri typoch 2A a 2M, normálne pri type 2N, absentujú pri vWD typu 3 (9).

Vyšetrenie **RIPA** (ristocetínom indukovaná agregácia trombocytov) meria aglutináciu doštičiek indukovanú ristocetínom za pomoci vWF. Ristocetín je exogénne antibiotikum spôsobujúce viazanie vWF na receptor GPIIb. Ristocetín je podaný priamo k pacientovej plazme bohatej na trombocyty. Vyšetrenie je podobné vyšetreniu vWF:RCo. Metóda používa na rozdiel od vWF:RCo vlastné pacientove trombocyty. Pri type vWD 1, 2A a 2M zisťujeme pomocou RIPA zníženú aglutináciu, korešpondujúcu s výsledkom vWF:RCo. Pri type 3 k aglutinácii nedochádza. Pri type 2B je

aglutinácia zvýšená rovnako ako pri pseudo-von Willebrandovej chorobe (10).

vWF:CB meria väzbovosť vWF (hlavne HMW multimerov) na kolagén. vWF:CB je meraná za použitia kolagénu typu III alebo kolagénu typu I izolovaného z ľudskej placenty. Využíva sa ELISA metóda. Normálne hodnoty vWF:CB sú 0,5–2,5 IU/ml. Táto hodnota je signifikantne znížená pri vWD typu 2A, 2B a 3 z dôvodu nízkeho až nulového množstva HMW multimerov. Pri type 1 vWF:CB varíruje podľa stupňa deficitu vWF a úmerne s ním HMW multimerov. Pri typoch 2M a 2N sú HMW multimery prítomné, vWF:CB je preto v rozmedzí fyziologických hodnôt (9, 11).

Pomer **vWF:RCO/vWF:Ag** porovnáva množstvo a funkčnú aktivitu vWF. Normálna hodnota pomeru vWF:RCO/vWF:Ag je 0,7 – 2,0. Hodnota pomeru vWF:RCO/vWF:Ag < 0,7 naznačuje prítomnosť dysfunkčného vWF (množstvo je blízke normálnej úrovni, pričom je znížená funkčná aktivita vWF). Pozorujeme to pri typoch 2A, 2B a 2M vWD (12).

Podobný význam má pomer **vWF:CB/vWF:Ag**. Normálna hodnota tohto pomeru je 0,7 – 2,0. Pri type 2A a 2M je hodnota pomeru vWF:CB/vWF:Ag obvykle < 0,7. Pri type 2B je nízky alebo normálny. Dôvodom je chýbanie alebo dysfunkcia HMW multimerov pri type 2A, 2B a 2M (12).

Medzi najnovšie typy vyšetrení patrí meranie aktivity vWF (**vWF:Ac**). Meria aktivitu vWF bez nutnosti použitia ristocetínu. Pri meraní sa používajú monoklonové protilátky pôsobiace proti funkčnej časti molekuly vWF viažucej doštičkový GPIb. Na meranie sa využíva metóda ELISA alebo LIA. Skúška je senzitívna na konformačné zmeny vWF, ktoré ovplyvňujú časť vWF molekuly viažucu GPIb krvných doštičiek. Skúška umožňuje odlišiť štrukturálne zmeny vWF (2A, 2B, 2M) (9).

Vedľajším produktom pri syntéze vWF je vWF:propeptid (**vWF:pp**). vWF:pp má koncentráciu v plazme 1 µg/ml a biologický polčas 2 – 3 hodiny. Hotový vWF má koncentráciu v plazme 10 µg/ml a biologický polčas 8 – 12 hodín. Vyšetrenie vWF:pp assay je založené na metóde ELISA. Pacienti s vWD typu 1C (tiež známou ako Vincenza) majú zvýšené odbúravanie vWF z plazmy. Pomer vWF:pp/vWF:Ag je zvýšený. Polčas života vWF:pp je normálny, ale polčas hotového vWF je znížený. Mechanizmus zvýšeného klírensu vWF je neznámy, pravdepodobne ide o zvýšené odbúravanie enzýmom ADAMTS13 (12).

Test **vWF:FVIII** slúži na odlišenie vWD typu 2N od hemofílie A. Typ 2N vWD je charakterizovaný značne zníženou väzobnou afinitou vWF

Tabuľka 3. Diagnostika typu vWD (14)

Typ	vWF: Ag	vWF: RCo	vWF: CB	FVIIIc	Multiméry	RCo/Ag	CB/Ag	FVIII/VWF
1	↓ – ↓↓	↓ – ↓↓	↓ – ↓↓	N – ↓↓	Normálne rozloženie, ↓ intenzita	N	N	N
2A	↓ – ↓↓	↓↓ – ↓↓↓	↓↓ – ↓↓↓	↓ – ↓↓	Strata HMW	↓	↓	N
2B	N – ↓↓	↓ – ↓↓↓	↓ – ↓↓↓	N – ↓↓	Strata HMW	↓	↓	N
2N	N – ↓↓	N – ↓↓	N – ↓↓	↓ – ↓↓	Normálne rozloženie	N	N	↓
2M	↓ – ↓↓	↓ – ↓↓↓	↓ – ↓↓↓	↓↓ – ↓↓↓	Bez straty HMW	↓/N	↓/N	N
3	Abs.	Abs.	Abs.	↓↓↓	Abs.	NA	NA	NA

Abs. – chýba; N – normálny; NA – nedetegovateľný; ↓ – mierne znížený; ↓↓ – znížený; ↓↓↓ – výrazne znížený

k FVIII. Pri vyšetrení vWF:FVIII je pacientov vWF viazaný protilátkou prítomnou na mikrotitračných platničkách. Všetok vlastný FVIII viazaný k vWF je odstránený vysokou koncentráciou CaCl₂. Pridáva sa exogénny rekombinantný FVIII v štandardnom množstve, ktorý sa viaže na testovaný vWF. Množstvo naviazaného FVIII sa stanoví pridaním enzýmovo značenej protilátky k FVIII, ktorá ďalej reaguje s chromogénnym substrátom. Intenzita farebného produktu je proporcionálna k množstvu FVIII naviazaného na vWF pacienta (12).

Na správnu funkciu vWF sú nevyhnutné HMW **multiméry**. Stanovujeme ich z pacientovej vzorky krvi elektroforézou na agarózovom géle. Pri vWD typu 1 sú prítomné všetky multiméry vrátane HMW, sú však prítomné v nižších koncentráciách. Typ 2A sa vyznačuje absenciou HMW a IMW multimerov. Pri type 2B chýbajú HMW, rovnako pri doštičkovom type vWD. Typy 2M a 2N majú prítomné multiméry všetkých molekulových hmotností. Typ 3 sa vyznačuje úplným chýbaním multimerov vWF. Typ 1C sa vyznačuje prítomnosťou ultra veľkých multimerov vWF. Aj napriek tomu, že analýza multimerov vWF je časovo a finančne náročná, nemá v súčasnosti rovnocennú náhradu pri diagnostike vWD (10).

Diferenciálna diagnóza vWD

Získaný von Willebrandov syndróm (AvWS)

Ide o syndróm, ktorý nie je dedičný a vzniká sekundárne z viacerých dôvodov. Je to chronický stav, keď pacienti trpia príznakmi mukokutánneho krvácania a laboratórne hodnoty korešpondujú s vWD. V mnohých prípadoch rozloženie multimerov zodpovedá typu 2A, čo naznačuje vyšší deficit HMW multimerov. Príčinou môžu byť: 1. protilátky proti vWF, vyskytujúce sa najmä pri lymfoproliferatívnych ochoreniach a monoklonálnych gamapatiách. 2. imunoabsorpcia

komplexu FVIII/vWF na malígne bunky alebo trombocyty, najmä pri myeloproliferatívnych ochoreniach. 3. zvýšená proteolýza komplexu FVIII/vWF v cirkulácii pri paraproteinémii IgM, amyloidóze, akútnej leukémii, cirhóze pečene. 4. znížená produkcia vWF, napríklad pri hypotyreóze. 5. zvýšená spotreba vWF v cirkulácii. Za vysokých šmykových rýchlostí v aterosklerotických arteriolách dochádza k ireverzibilnej interakcii medzi HMW multimermi vWF a trombocytmi a odstráneniu týchto komplexov z cirkulácie. 6. nejasný mechanizmus zníženia vWF pri liečbe valproátom (5).

Doštičkový typ vWD

Ide o trombocytopatiu, ktorá môže imitovať vWD typu 2B. Je spôsobená defektom doštičkového receptora GPIb, ktorý má zvýšenú afinitu pre vWF. Následkom toho chýbajú HMW multimery vWF v plazme. Dochádza tak k agregácii trombocytov po podaní koncentráty vWF k plazme pacienta bohatej na trombocyty aj bez prítomnosti ristocetínu. Pri type 2B bez ristocetínu k agregácii nedôjde (15).

Hemofília A

vWD typu 2N býva často chybné diagnostikovaný ako hemofília A, hlavne v prípade, pokiaľ v rodinnej anamnéze nie je jasne zaznamenaná prítomnosť dedičnosti viazanej na chromozóm X. Správne diagnóza vWD typu 2N môže byť potvrdená tým, že vWF u pacienta s vWD má zníženú väzobnú aktivitu k FVIII pri teste vWF: FVIII (pri hemofílii test v norme) alebo pomocou *dôkazu* mutácie vWF (15).

Záver

Kompletná diagnostika vWD je nevyhnutná na správnu indikáciu potrebnej liečby, a tým zlepšenie kvality života pacientov. Prognóza pacientov je dobrá, nutná je prevencia a liečba krvácajúcich komplikácií. Kompletná diagnostika von Willebrandovej choroby prebieha na

Slovensku vo viacerých špecializovaných centrách. Venuje sa jej aj Národné centrum hemostázy a trombózy v Martine, ktoré ako prvé na Slovensku vykonáva u pacientov s vWD aj analýzu multimérov vWF.

Podakovanie: Práca bola podporená projektami CEPV I (ITMS 26220120016), CEPV II (ITMS 26220120036) a CEVPET (ITMS 26220120053), spolufinancovanými zo zdrojov EÚ.

Literatúra

1. Favaloro EJ. *Laboratory testing for von Willebrand disease (VWD) – Assessment of von Willebrand factor (VWF) level and activity*. Haematology, ICPMR, Pathology West, Westmead hospital. August 2014.
2. Branchfort BR, Di Paola J. Making a diagnosis of VWD. *ASH Education Book*. 2012;2012(1):161–167.
3. Sandler E, Lillicrap D. Von Willebrand disease: Diagnosis, Classification, and Treatment. In: Marder V, Aird W, Bennett J, eds. *Hemostasis and Thrombosis*. 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
4. Castaman G. Treatment of von Willebrand disease with FVIII/VWF concentrates. *Blood Transfus*. 2011;9(2):9–13.
5. Smejkal P, Matýšková M, Penka M. Von Willebrandova choroba. *Vnitřní lékařství*. 2008;54(3):257–264.
6. Keresztes PA, Tazbir J. The PFA-100: analysis and interpretation of a platelet function measurement. *J Cardiovasc Nurs*. 2005;20(6):405–7.
7. Collier B, Gralnick H. Studies on the Mechanism of Ristocetin-Induced Platelet Agglutination. *J Clin Invest*. 2007;60(2):302–312.
8. Matýšková M. Vrožené krvácivé stavy. In: Penka M, Buliková A, eds. *Neonkologická hematologie*. Praha: Grada Publishing; 2009: 149–153.
9. Mazurier C, Meyer D. Molecular basis of von Willebrand disease. In: *Baillière Clinical Haematology*. 1996;9(2):229–41.
10. Závřelová J, Jelínková M, Matýšková M. Diagnostika von Willebrandovy choroby. In: Penka M, Tesařová E, et al. *Hematologie a transfúzní lékařství I*. Praha: Grada Publishing; 2011: 111–113.
11. Favaloro EJ, Mohammed S. Toward improved diagnosis of von Willebrand disease: Comparative evaluation of several automated von Willebrand factor antigen and activity assays. *Thrombosis Research*. 2014;134(6):1292–1300.
12. Nesrallah J, Agnew M, Geske FJ, et al. Establishment and characterization of a new and stable collagen-binding assay for the assessment of von Willebrand factor activity. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2013;35(2):170–176.
13. Schneppenheim R, Budde U, Ruggeri ZM. A molecular approach to the classification of von Willebrand disease. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2001;14(2):281–98.
14. Nichols WL. *The diagnosis, evaluation and management of von Willebrand disease*. Full Report U. S. department for human and services National health lung and blood institute. 2007
15. Curnow J, Pasalic L, Favaloro EJ. Treatment of von Willebrand Disease. *Seminar in Thrombosis & Hemostasis*. 2016;42:133–146.

MUDr. Zuzana Mazancová
Národné centrum hemostázy
a trombózy, Klinika hematológie
a transfuziológie JLF UK a UNM
Kollárova 2, 036 01 Martin
mazancova.z@gmail.com
