

# **von Willebrandova choroba**

*P. Smejkal*

*Oddělení klinické hematologie, FN Brno*

# Von Willebrandův faktor

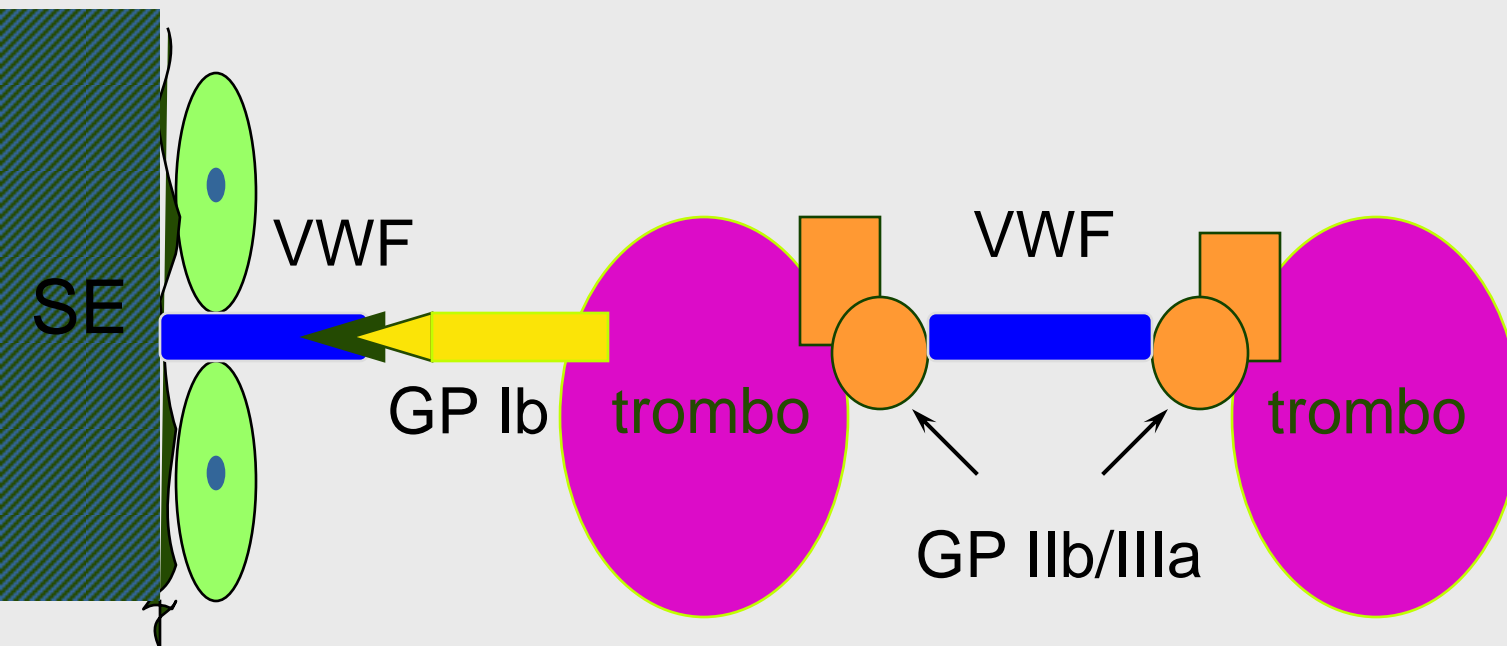
- syntetizován v:
  - **endotelu**
  - **megakaryocytech**
- vytváří dimery a ty pak **multimery**
- funkce: - **v primární hemostáze**  
- **koagulaci**

# Von Willebrandův faktor

## - funkce v primární hemostáze

(multimery o vysoké molekulové hmotnosti)

- adheze trombocytů k subendotelovým strukturám prostřednictvím GP Ib
- agregace vazbou na aktivovaný GP IIb/IIIa

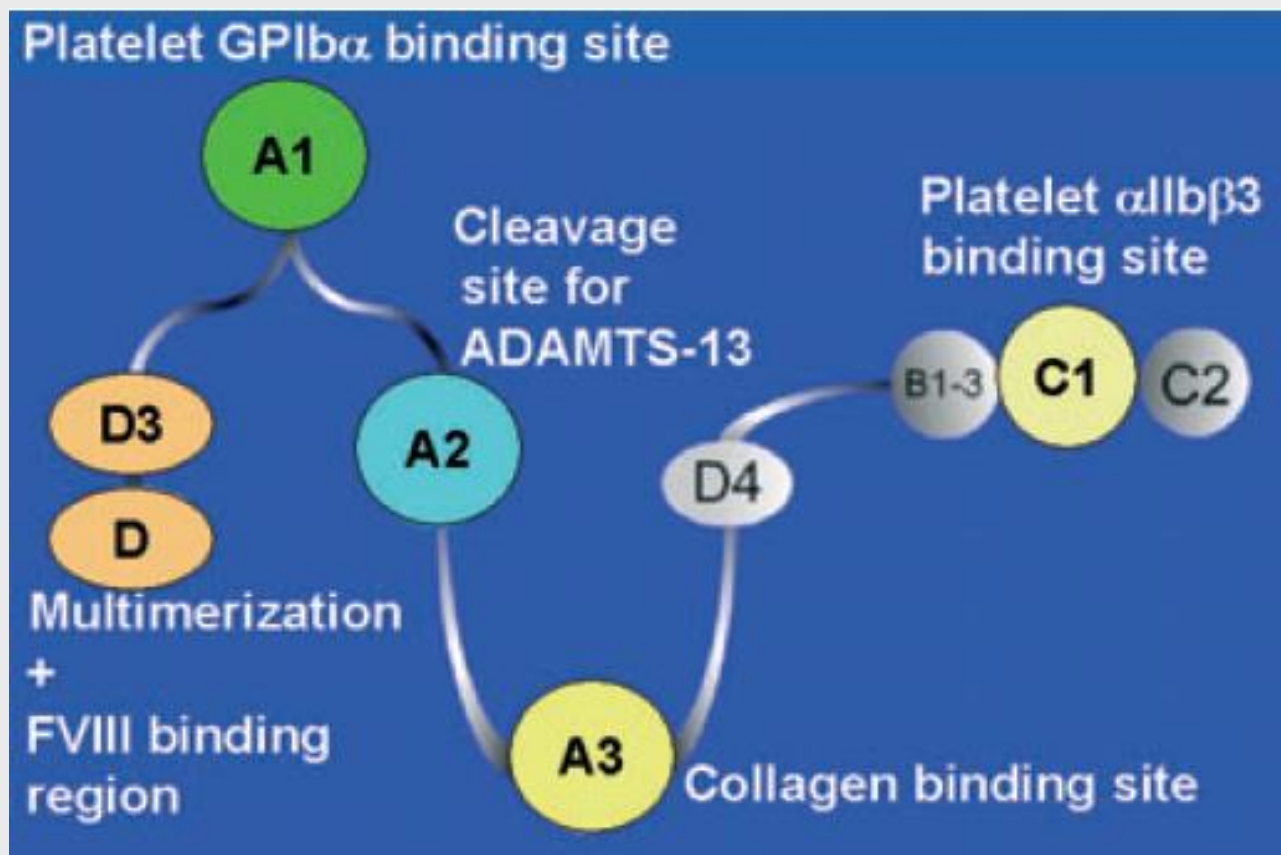


# Von Willebrandův faktor - **funkce v koagulaci**

(multimery všech molekulových hmotností)

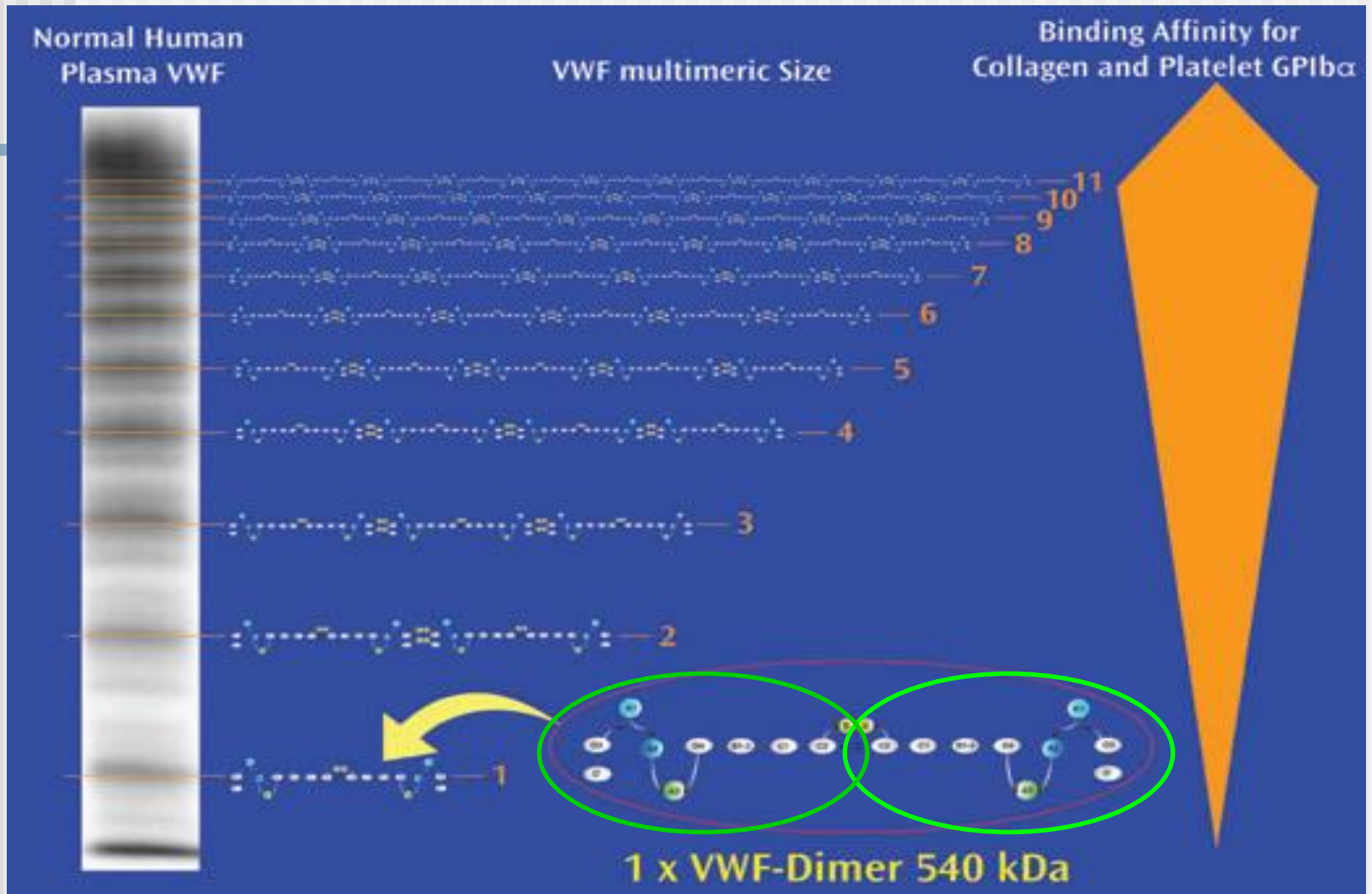
- **váže a stabilizuje FVIII (ochrana FVIII před proteolytickou degradací)**
- **lokalizuje FVIII v místě poruchy cévní stěny**
- uvolňuje FVIII do oběhu
- efekt kofaktoru při aktivaci FVIII trombinem

# Schéma základního řetězce VWF



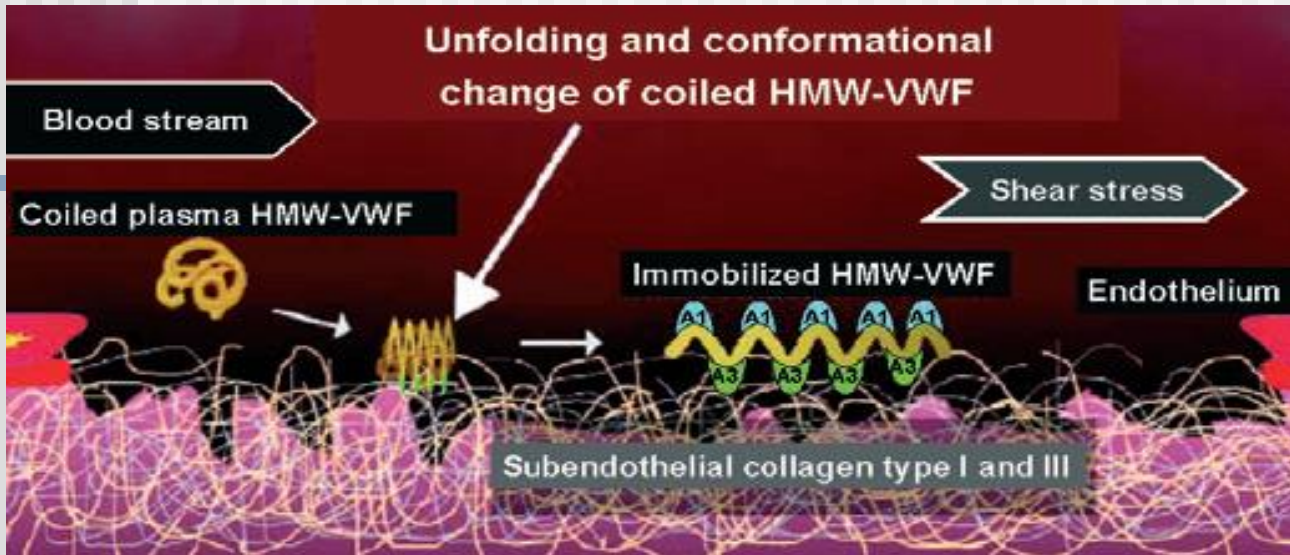
\*Reininger AJ. Haemophilia 2008;1

# Multimerní struktura VWF – korelace s elektroforézou



\*Reininger AJ. Haemophilia 2008;1

# Schéma funkce VWF v primární hemostáze



\*Reininger AJ.  
Haemophilia 2008;14  
(Suppl.5):11-26

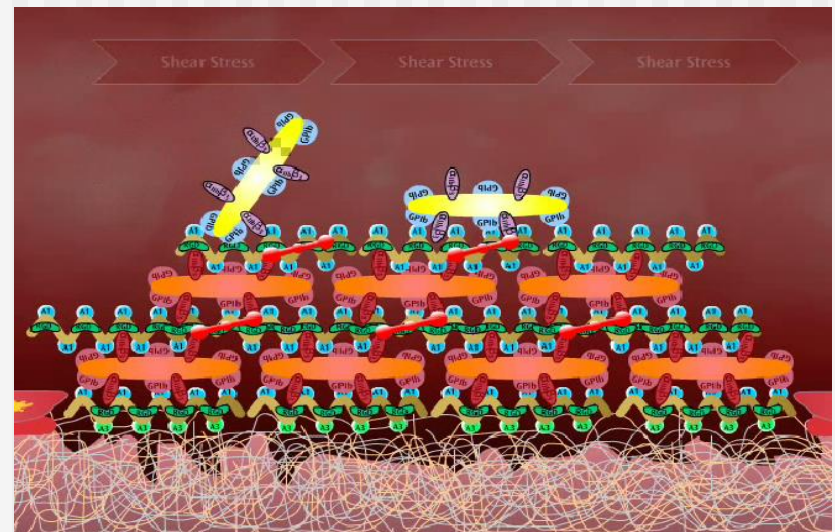
Klidový stav      35 Dyn/cm<sup>2</sup> = 875 s<sup>-1</sup>

No Shear → Shear Applied by AFM Probe → 35 Dyn/cm<sup>2</sup> Applied by Rotating Disk



Globular vWF      Short Extended Chain      Extended Chain

\*Siedlecki ChA.  
Blood  
1996;88:2239-50



# Von Willebrandova choroba

- **vrozené defekty - porucha i mimo gen pro VWF - von Willebrandova choroba – VWCH**
- **získané defekty – získaný VWsy**
  - imunitně podmíněné
  - v důsledku zvýšené adherence na destičky, tumorózní buňky
  - hyposyntéza
  - zvýšená proteolýza
  - zvýšené smykové napětí
- **pseudo-VWCH – destičkový typ**
  - ↑ **afinita GPIb k VWF**



# Prevalence VWCH

- **Celková až 1%**
- klinicky krvácivé projevy 100-200/ 1 milion
- život ohrožující krvácení 0,5-3/ 1 milion
- ohrožených krvácením 1000/ 1 milion
- **minimálně jako hemofilie A+B**

# Klasifikace VWCH (Sadler 1994)

- typ 1
  - **parciální kvantitativní defekt**
  - připuštěny i odchylky struktury multimerů a relativní snížení HMW multimerů, není-li postižena funkce VWF (2006)
  - autosomálně **dominantně**
  - 70 - 80%
- typ 2 - **kvalitativní defekt VWF**
  - autosomálně **dominantně (recesivně 2N)**
  - 20 - 25%
- typ 3
  - **úplný nedostatek VWF**
  - autosomálně **recesivně**
  - VWF < 5%, FVIII < 10%

# VWCH typ 2 - podtypy

- 2A** - ↓ adheze trombocytů zprostředkované VWF (AD)
  - **chybění HMW multimerů**
  - 15% (3/4 typu 2)
- 2M** - ↓ adheze trombocytů zprostředkované VWF (AD)
  - **bez chybění HMW multimerů**
- 2B** - ↑ **afinita ke GPIb** (AD)
- 2N** - ↓ **afinita k FVIII** (AR)

# Diagnóza VWCH typ 1

- **jistá:**
  - a) **krvácivé projevy**
  - b) **VWCH v rodině**
  - c) **laboratorní nález:**
    - VWF:RCo a VWF:Ag  $< 2$  SD  
(KS 0, non-0)
- **možná (possible):** - nesplněno a) nebo b)
- **nutno ze dvou odběrů**

# Diagnóza VWCH typ 1 (problémy)

Nejsou přesné normy, protože jsou vlivy:

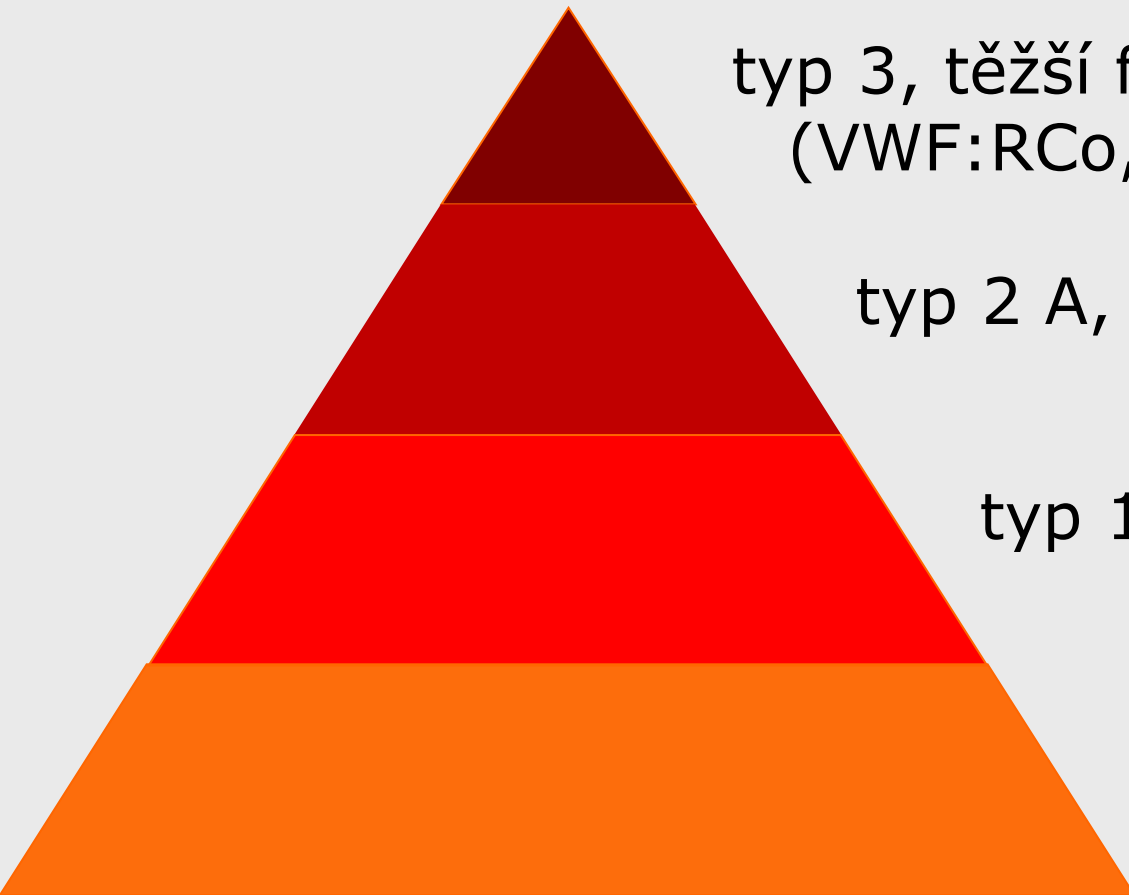
- **krevní skupiny 0 a non-0**
- věku
- pohlaví
- *menstruačního cyklu:*
  - *u některých žen je nižší hladina koncem menstruace*
- **VWF je reaktant akutní fáze**

# Diagnóza VWCH typ 1 (problémy)

Ne zcela jasná hranice normy, hladina VWF závisí na:

- krevní skupině 0 a non-0:
  - KS 0 VWF ↓ o 25% oproti non-0
  - MCMDM-1vWD cut off pro percentil 2,5 (n=1166):
    - KS 0:
      - VWF:RCo 43%
      - VWF:Ag 44,4%
    - KS non-0:
      - VWF:RCo 54%
      - VWF:Ag 54%

# Rozložení tíže defektu VWF



typ 3, těžší forma typu 2A, M  
(VWF:RCo, VWF:Ag <10%)

typ 2 A, B, M (VWF:RCo <30%)

typ 1 (VWF <30%)

typ 1 (VWF 30-50%)

nejasné, zda se  
jedná o chorobu

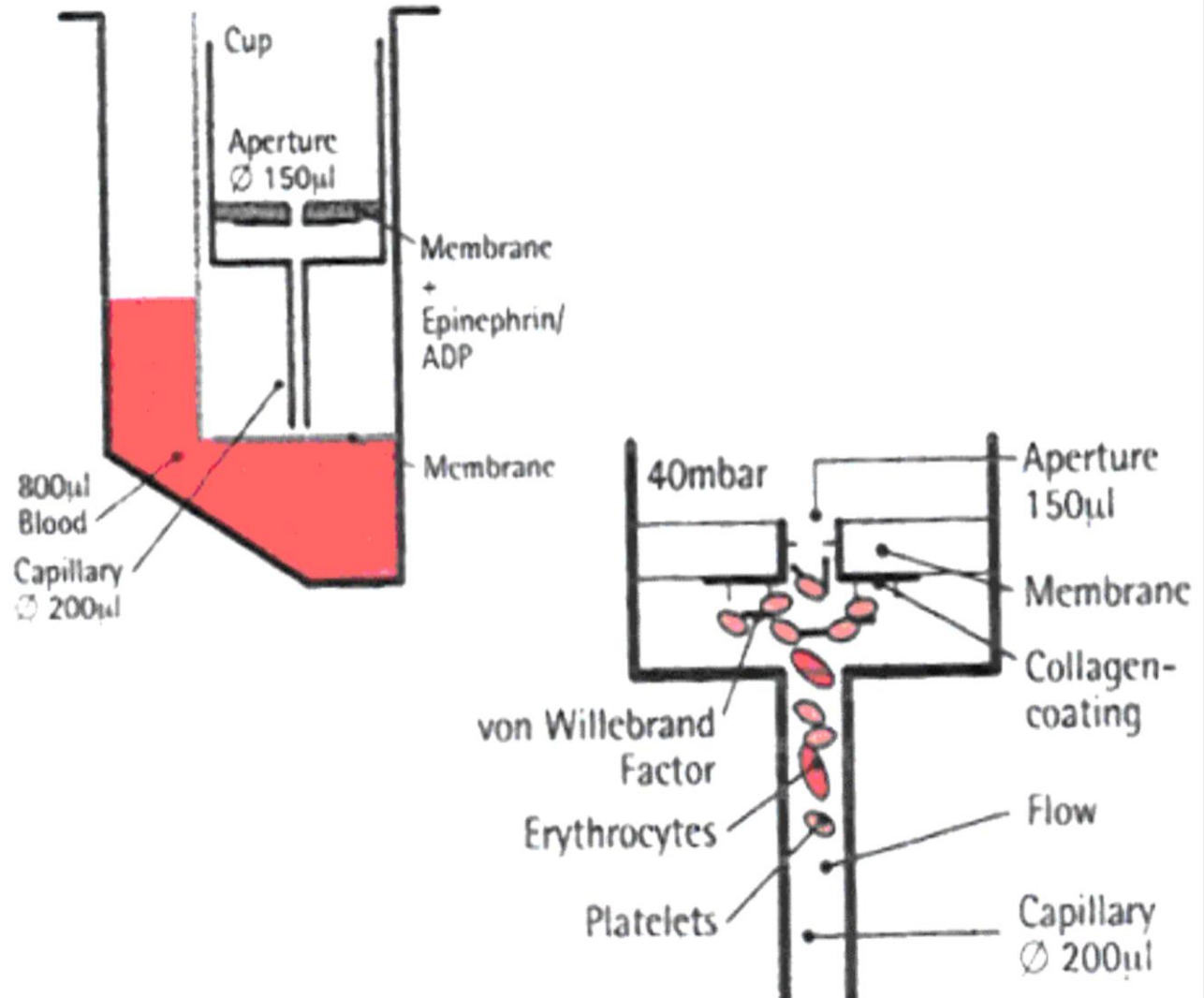
# Diagnostika VWCH - screening:

*senzitivita*

- trombocyty (↓typ 2B) \_\_\_\_\_
- aPTT 30%
- doba krvácení < 40%
- **PFA-100** 79-100%
- osobní anamnéza krvácivých projevů :
  - **slizniční krvácení a hematomy**
  - **potraumatické a perioperační (zubní extrakce)**
- rodinná anamnéza



# PFA-100®



# PFA-100

- screeningový test primární hemostázy
- citrátová krev
- otvor 150  $\mu\text{m}$
- Kolagen + ADP nebo epinefrin
- čas k vytvoření koagula „closure time“ – CT
  - ADP <118 (127) s      - kolagen <193 (193) s
- sensitivita i u typu 1 VWCH 75-100%
- hereditárních trombocytopenií nepředčů DK?

# Laboratorní diagnostika VWCH

- specifické testy:

**VWF:RCo (ristocetin kofaktor)**

**FVIII:C (koagulační aktivita)**

**VWF:Ag (antigen)**

**VWF:CB (vazeba na kolagen)**

# Laboratorní diagnostika VWCH

## - diskriminační testy:

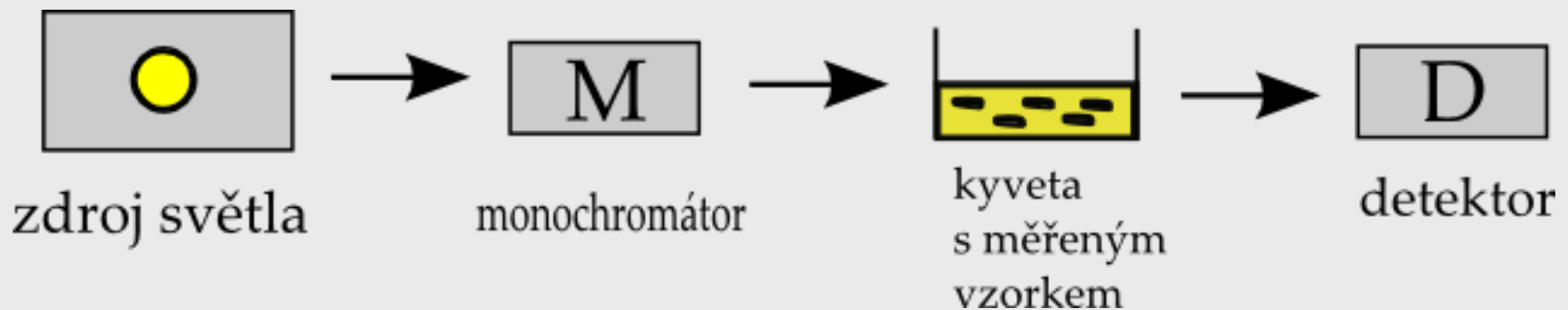
- **RIPA (ristocetinem indukovaná destičková agregace)**
- **analýza multimerů vWF**
- **Vazba VWF pro FVIII**
- vyšetření trombocytárního vWF

# VWF:RCo

- ristocetin po navázání na GPI umožní vazbu VWF
- HMW + IMW multimery = 50%
- standard
- k monitoraci léčby koncentráty VWF/FVIII
- agregační a aglutinační metoda
- VWF:RCo / VWF:Ag
  - $< 0,7$  u typu 2 A, B, M

# Stanovení VWF:RCo

- promyté destičky + Atb. ristocetin + plazma pacienta chudá na destičky (zdroj VWF)
- imunoturbidimetrická metoda

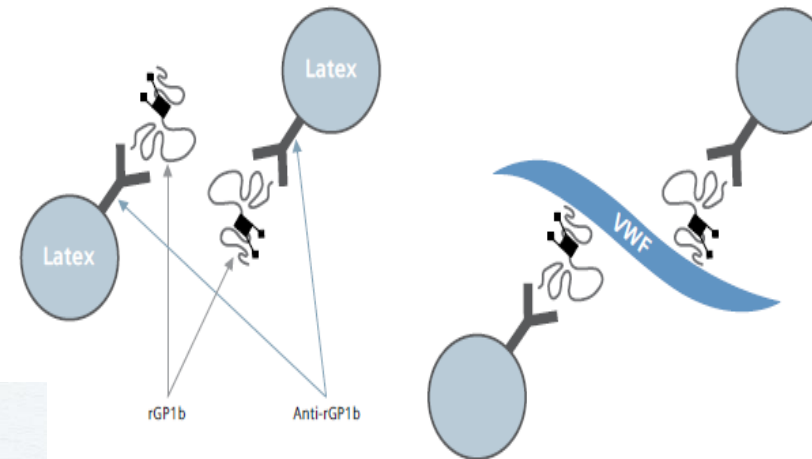


# VWF:RCo - automatizace metody

- protilátka k vazebnému místu VWF na GP  $Ib_{\alpha}$ :
  - ELISA: **VWF:Ab**
    - nespolehlivé odlišení typu 1 a 2 VWCH
- vazba VWF na rf-GP  $Ib_{\alpha}$  fixovaný protilátkou v přítomnosti ristocetinu – ELISA, LIA: **VWF:GPIbR**
  - dobrá korelace v klasickou metodou **VWF:Rco**
- vazba VWF na gain of function rf-GP  $Ib_{\alpha}$  fixovaný protilátkou bez nutnosti přidá **VWF:GPIbM** ristocetin (VWF:Ac) – ELISA, LIA:
  - dobrá korelace v klasickou metodou **VWF:RCo**

# Princip testu INNOVANCE® VWF:Ac

## Assay Principle



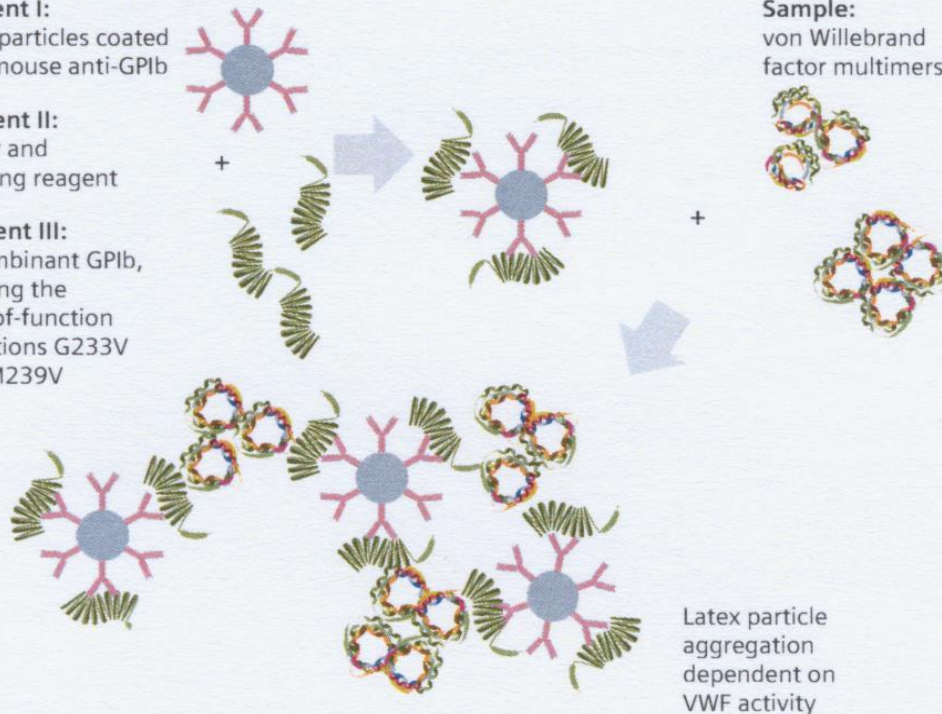
## The INNOVANCE VWF Ac Assay principle

**Reagent I:**  
Latex particles coated  
with mouse anti-GPIb

**Reagent II:**  
Buffer and  
blocking reagent

**Reagent III:**  
Recombinant GPIb,  
carrying the  
gain-of-function  
mutations G233V  
and M239V

**Sample:**  
von Willebrand  
factor multimers



INNOVANCE VWF AC Reagent

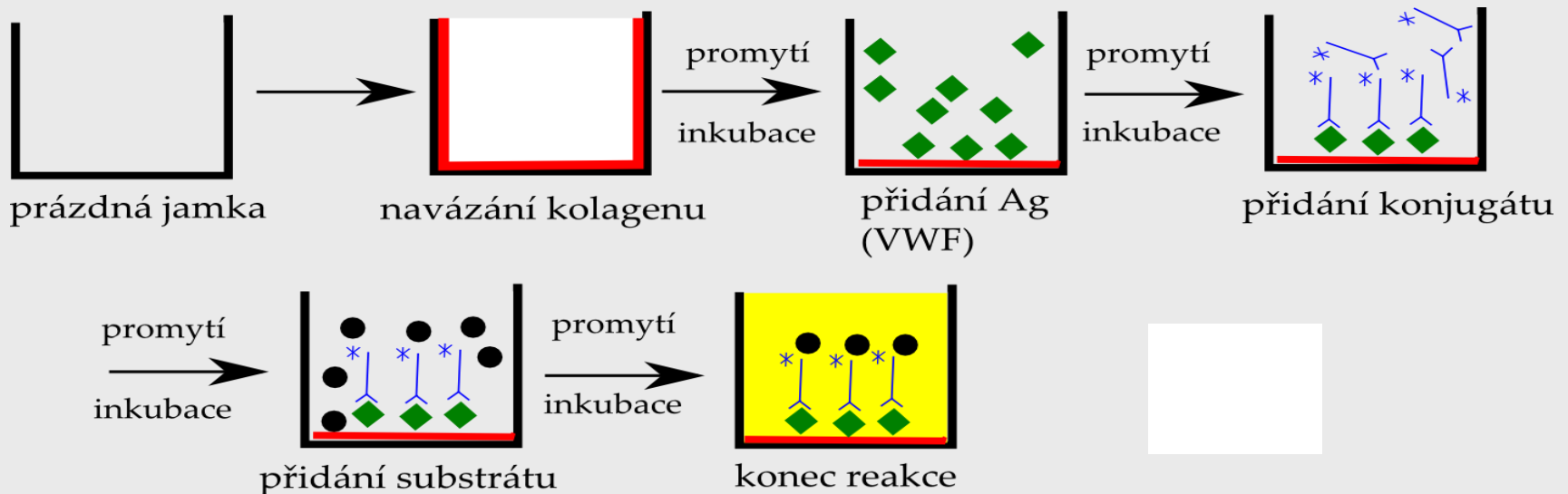
Aggregation with VWF

Latex particle  
aggregation  
dependent on  
VWF activity



# Stanovení VWF:CB

- collagen binding assay
- HMW multimery = 30%
- sensitivnější pro typ 2A, 2B:  
 $VWF:Ag / CB > 2$



# Collagen binding assay - VWF:CB

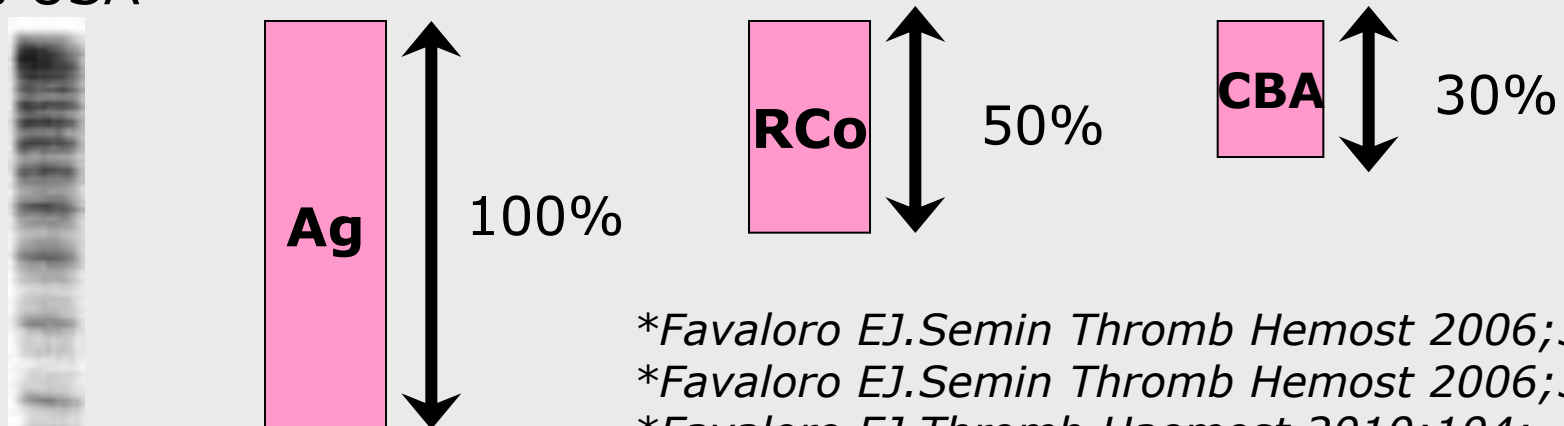
## ■ Citlivější k deficitu HMW multimerů

- typ 2A, 2B:  $VWF:CB / VWF:Ag < 0,5$

## ■ Závisí na typu kolagenu:

- směs type I/III (koňské či hovězí šlachy) preferovány
- typ III se váže na VWF až příliš snadno:
  - nejen k HMW multimerům
- typ I se váže na VWF velmi málo:
  - ↑ sensitivita k deficitu HMW multimerů, ale velká variabilita

- 2006: používáno laboratořemi: 50% Austrálie, 25% EU, 10% UK, < 5% USA



\*Favaloro EJ.Semin Thromb Hemost 2006;32:456-

\*Favaloro EJ.Semin Thromb Hemost 2006;32:566-

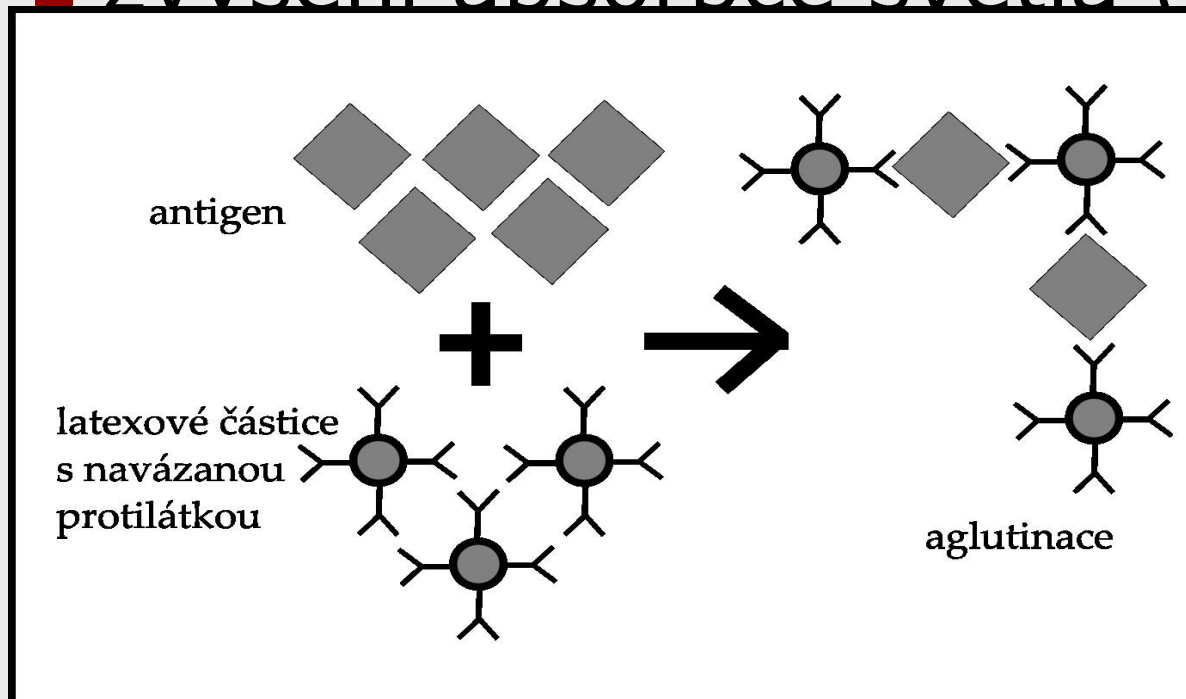
\*Favaloro EJ.Thromb Haemost 2010;104:..... - .....

# VWF:Ag

- **EID:**
  - méně citlivé:
    - na typ 2 VWCH
    - vWF <10%
  - zkřížená EID
- **ELISA:** - standard
- **LIA:**
  - falešná pozitivita při RF
  - méně citlivé vWF <10%

# Stanovení VWF:Ag

- částice s navázaným Ag absorbují světlo více
- zvýšení absorpce světla (540 nm),



# RIPA

(ristocetinem indukovaná destičková agregace)

- **ristocetin  $\geq 1,0$  mg / ml**
  - ↓ u typu 3, 2A (2M, těžšího 1)
- **ristocetin 0,2 – 0,8 mg / ml**
  - pozitivita agregace: - typ 2B
    - destičkový typ

# Dif. dg. VWCH 2B a destičkový typ

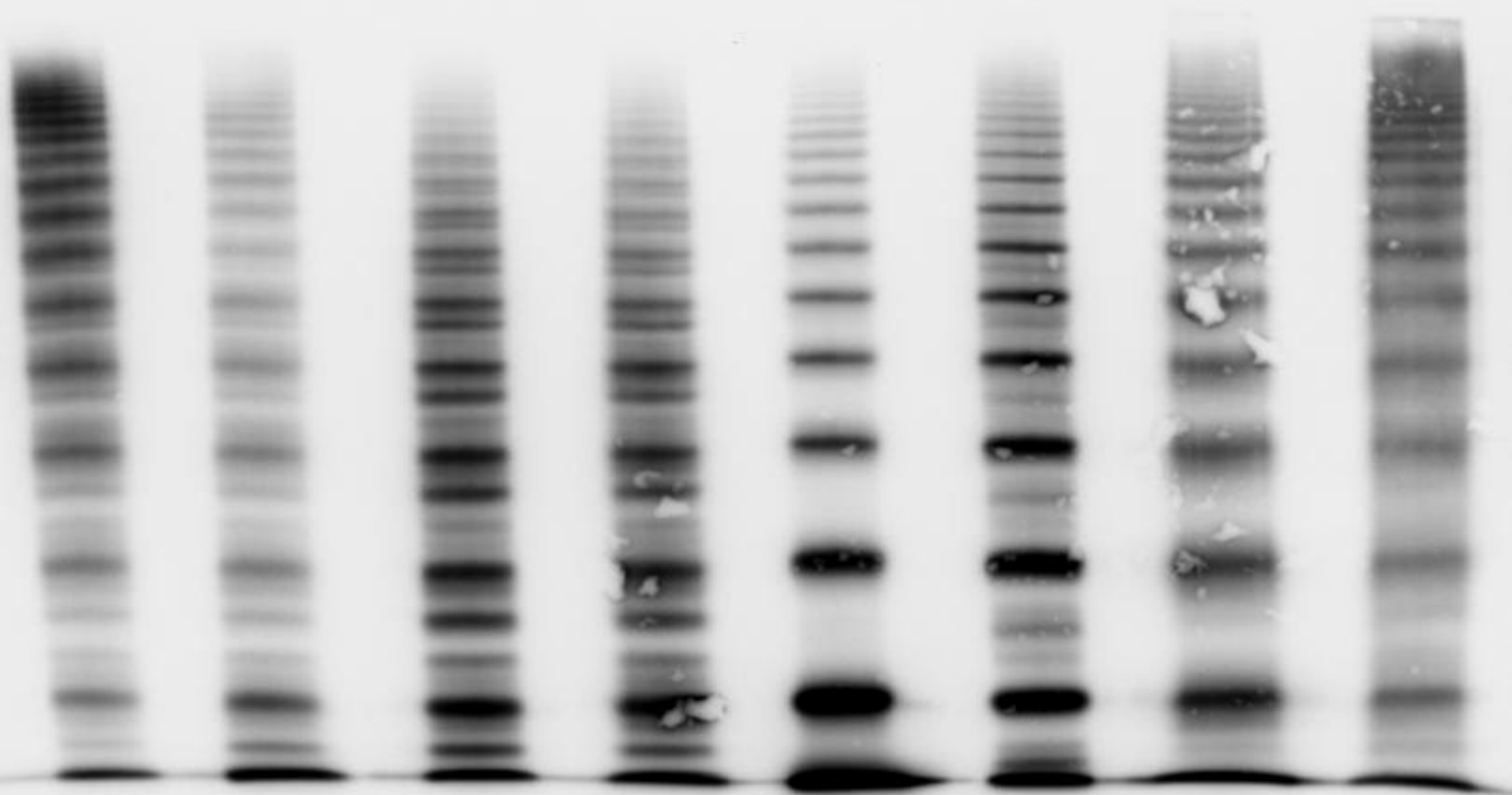
- 1 : 4 kryoprecipitát : pacientova PRP + ristocetin
- 1 : 1 PPP pacienta : PRP normálu + ristocetin
- Destičkový typ jen 4 mutace:
  - Gly233Val
  - Met239Val
  - Gly233Ser
  - Delece 27 páru bází

# Analýza multimerů VWF

- ELFO na agarózovém gelu
- vizualizace:
  - radiograficky
  - luminiscenčně
  - enzymaticky

# Struktura multimerů VWF u kvalitativního defektu

*(U. Budde, Hamburg, ISTH vWF SSC Information Homepage)*

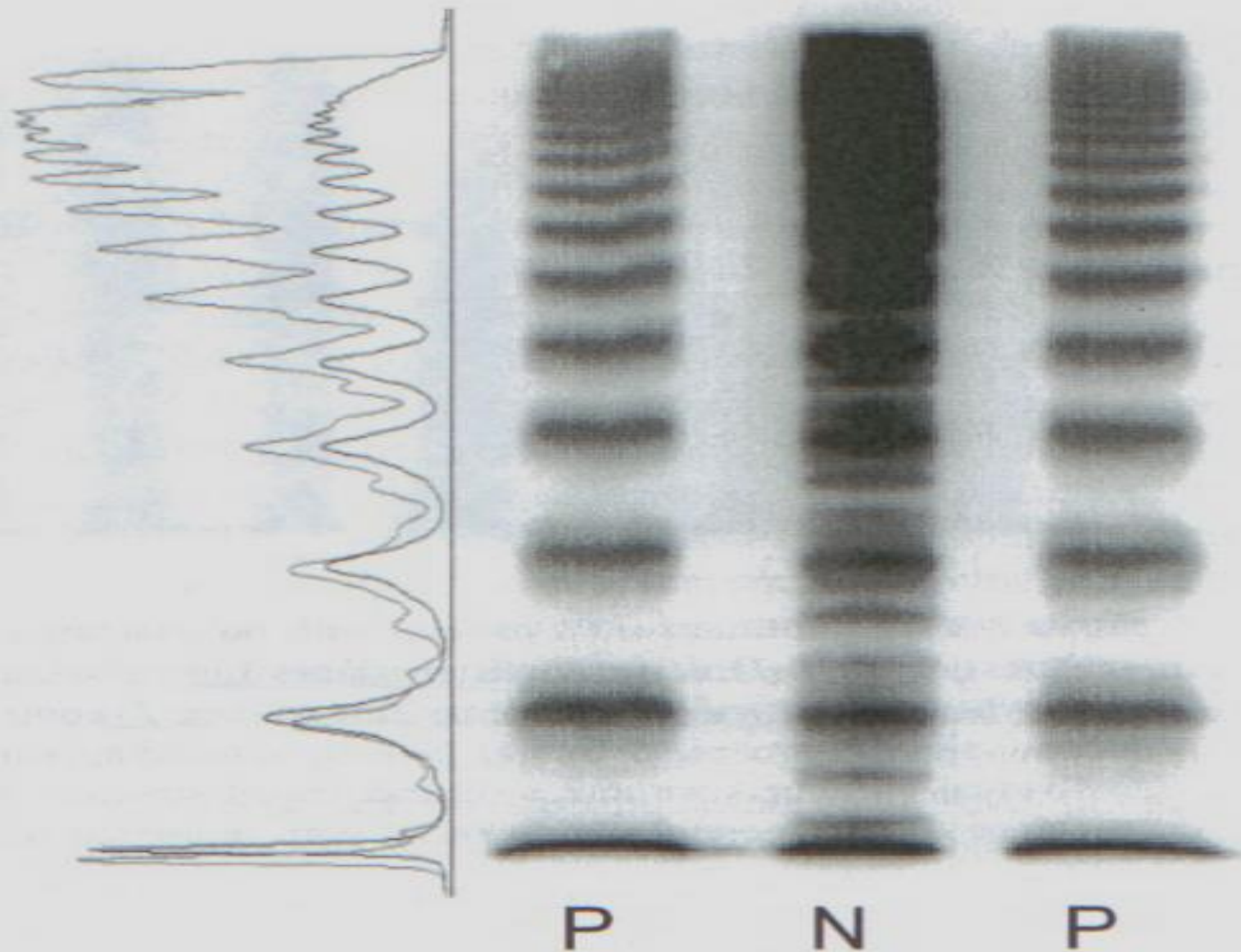


Normal plasma    2A(1B)    2A    2B    2A(II C)    2A(II D)    2A(II E)    2A(sm)



# Densitometrie multimerů vWF u VWCH typu 2A (IIE)

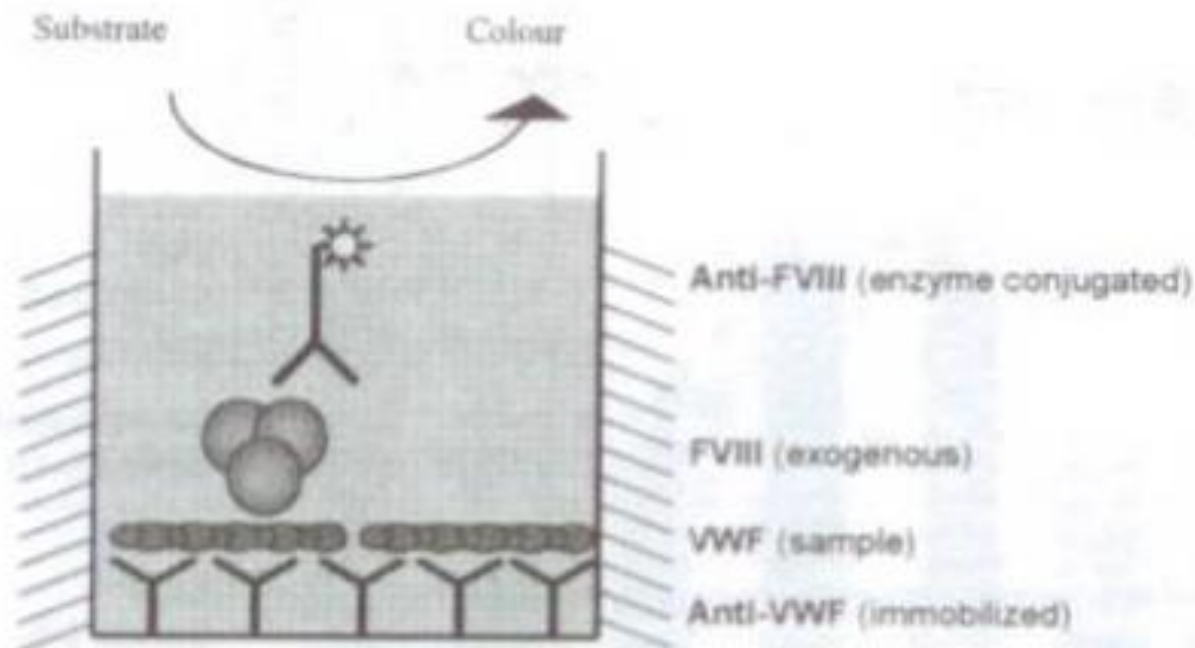
(*R.Schneppenheim, Semin Hematol 2004; 42: 15-28*)



# Vazba FVIII na VWF:

- **vyšetřit při VWF:Ag / FVIII:C > 1,4**
- ELISA set:
  - fixace VWF pacienta
  - odstranění endogenního FVIII pacienta
  - přidání známého množství exogenního rFVIIIa
    - detekuje se:
      - VWF
      - FVIII navázaný na VWF:
- vazba FVIII/VWF < 0,6      » typ 2N

# Factor VIII binding assay



Crucial step:

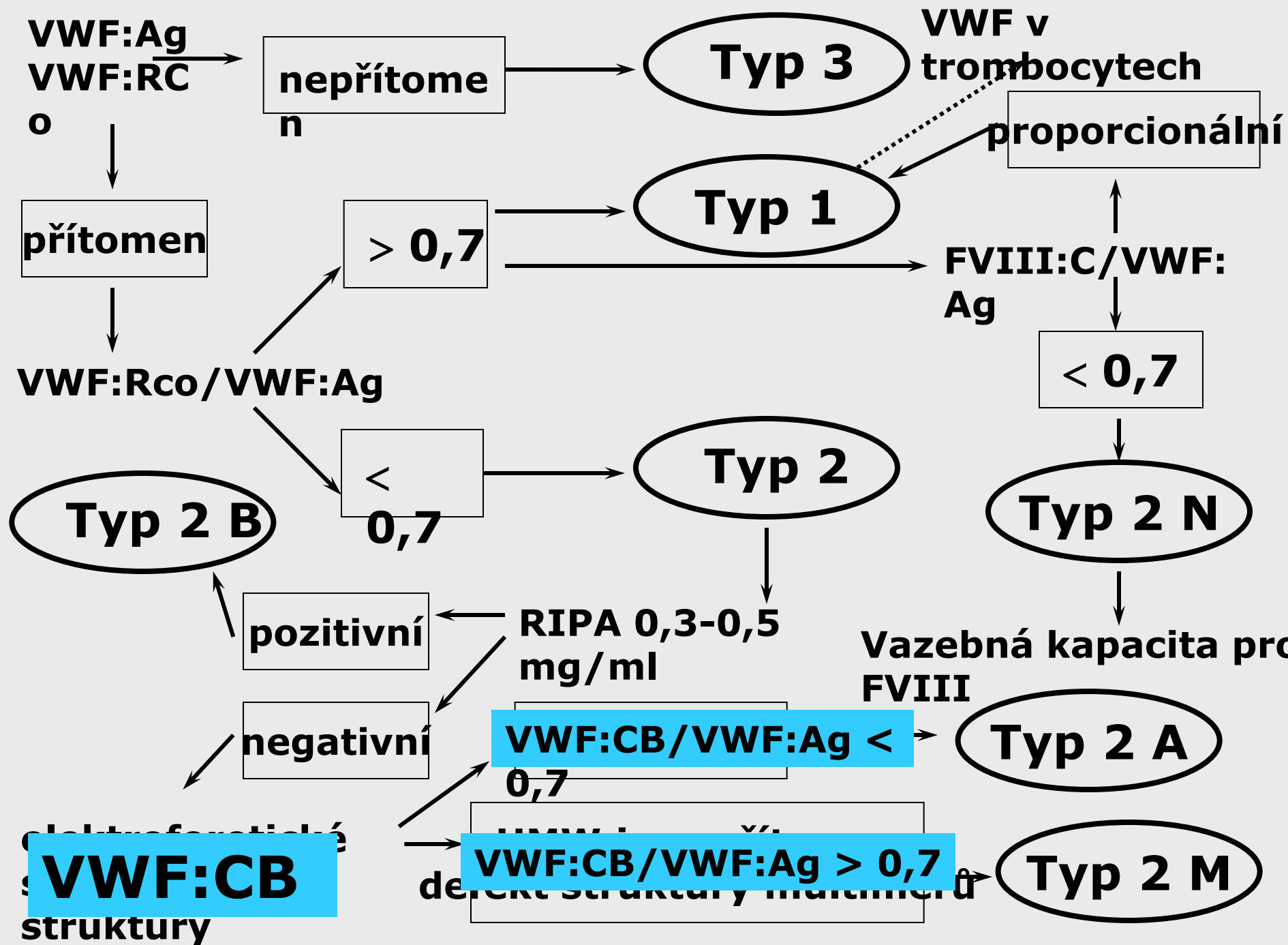
- Wash away endogenous FVIII
- Addition of a known concentration of FVIII
- The VWF:Ag must be measured simultaneously

# Genetická diagnostika

- VWCH všechny typy 2:
  - missense mutace
- VWCH typ 1:
  - dosud neznámé mutace
  - heterogenní
- VWCH typ 3:
  - delece, nonsense, frameshift, missense

# Diagnostika VWCH

typ	RIPA	RCo	Ag	FVIII	RCo/Ag	CBA	CBA/Ag
<b>1</b>	<b>N↓</b>	↓	↓	<b>N↓</b>	<b>N</b>	↓	<b>N</b>
<b>2A</b>	↓↓	↓↓	<b>N↓</b>	<b>N↓</b>	↓ < <b>0,7</b>	↓↓	↓ < <b>0,5</b>
<b>2B</b>	<b>N↑</b>	↓	<b>N↓</b>	<b>N↓</b>	↓ < <b>0,7</b>	↓↓	↓ < <b>0,5</b>
<b>2M</b>	<b>N↓</b>	↓	<b>N↓</b>	<b>N↓</b>	↓ < <b>0,7</b>	<b>N↓</b>	<b>N</b>
<b>2N</b>	<b>N</b>	<b>N↓</b>	<b>N↓</b>	↓	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
<b>3</b>	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	<b>N↓</b>	↓↓	<b>N↓</b>



# von Willebrandova choroba - léčba

Substituční terapie      < 40 % VWF:RCo  
   < 50 % FVIII:C

- Haemate P ( 2,4 j. VWF:RCo / 1 j. FVIII:C)
- Fanhdi, Wilate (1 j. VWF:RCo / 1 j. FVIII:C)
- Willfact (10 j. VWF:RCo / 1 j. FVIII:C)
  
- 1 j. VWF:RCo / kg = 2 %  
   $t_{1/2}$  = 6 - 12 hod.
  
- 1 j. FVIII:C / kg      = 2 %  
   $t_{1/2}$  = 12 – 24 hod.

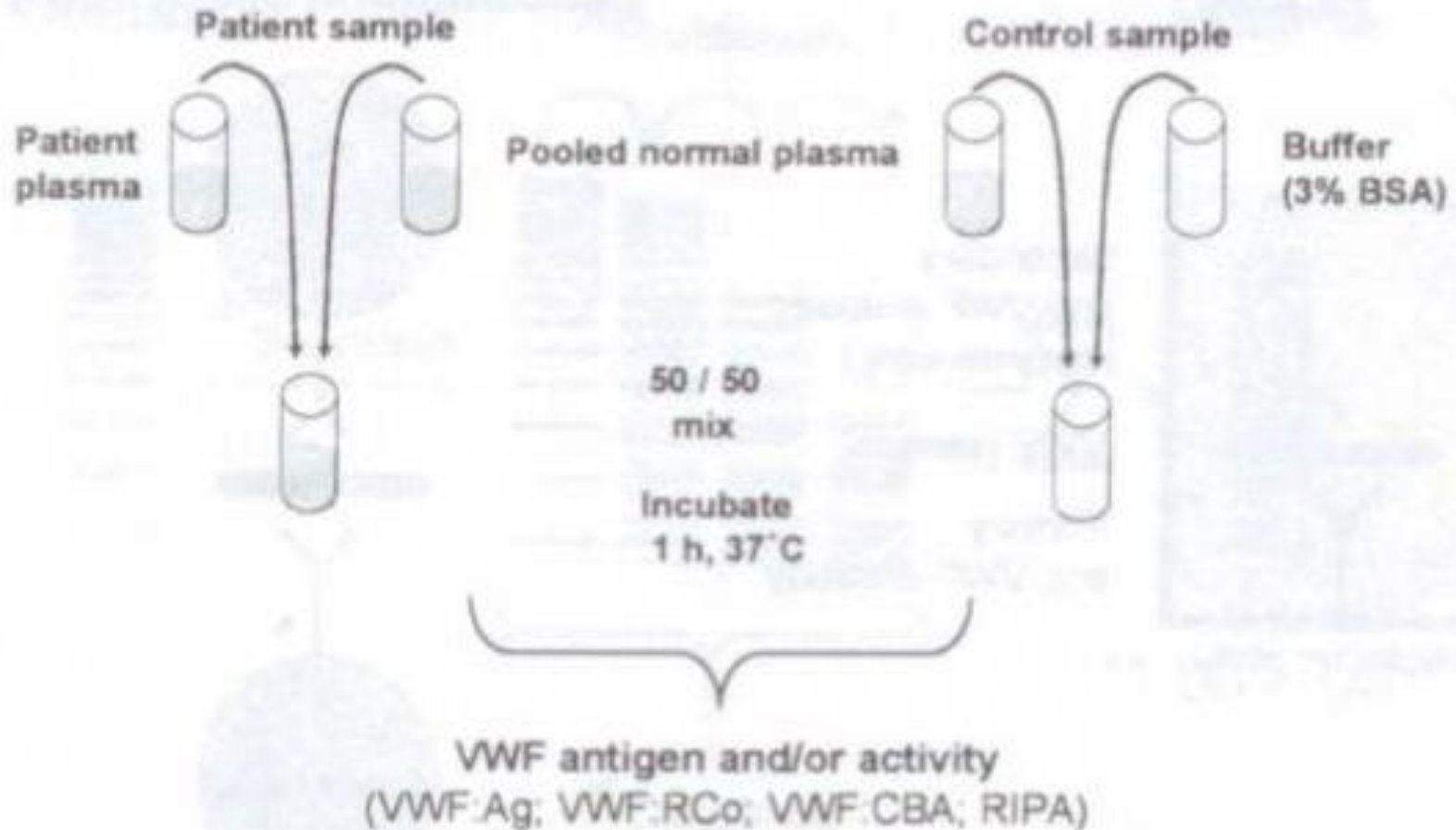
# von Willebrandova choroba - léčba

- **DDAVP** - 0,3  $\mu\text{g}$  / kg i.v. á 12 - 24 hod., max. 5 dnů  
(150 - 300  $\mu\text{g}$  i. n.)
  - elevace: - **VWF 2-4x** t<sub>2</sub> 5 - 10 hod.
  - **FVIII 2-6x** t<sub>2</sub> 6 - 12 hod.
- podpůrná
  - antifibrinolytika
  - venofarmaka
  - ethamsylát (Dicynone)
  - HAK



# Mixing studies

("Bethesda-like" procedures)



# Solid phase immunoassay for antibodies against von Willebrand factor (ELISA)

## 1. Coating

of microplate wells with VWF ( $\approx 5 \mu\text{g/mL}$ )

## 2. Blocking

with bovine serum albumin

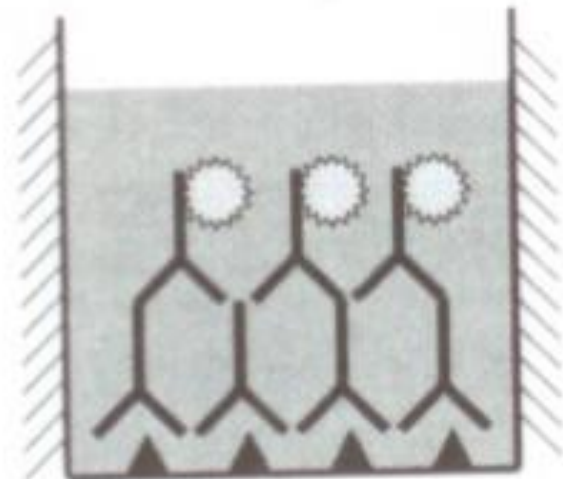
## 3. Sample

(source for antibodies)

## 4. Enzyme-conj. anti-human Ig

(anti-IgG and/or anti-IgM [IgA])

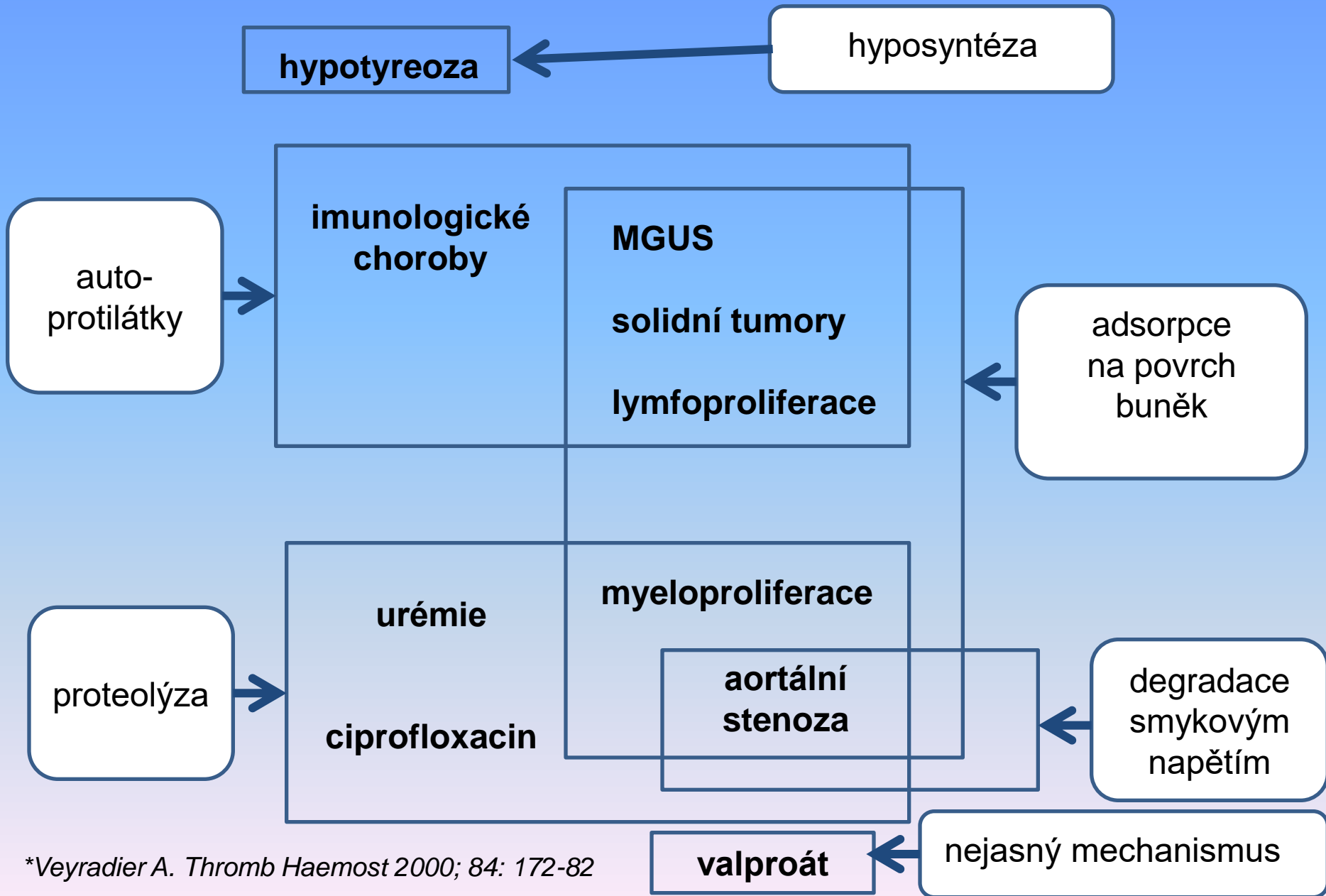
## 5. Substrate



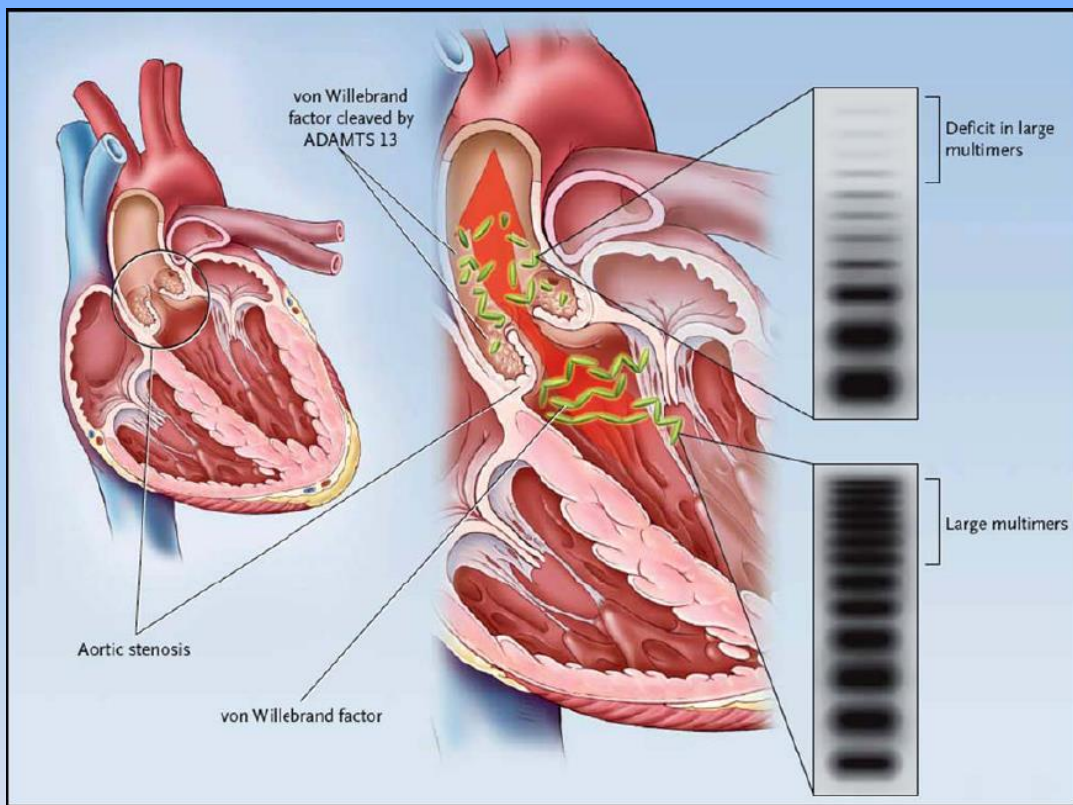
# Léčba při inhibitoru VWF

- **výskyt inhibitoru**
  - **v 5 - 10% typu 3 VWCH**
  - **získaná forma VWCH (léčba zákl. onem.: lymfoproliferace)**
- rFVIII (krátký  $t_{1/2}$ )
- rFVIIa
- imunoglobuliny
- DDAVP

# Patofyziologie získaného VWS



## Mechanismus získaného VWS u aortální stenózy



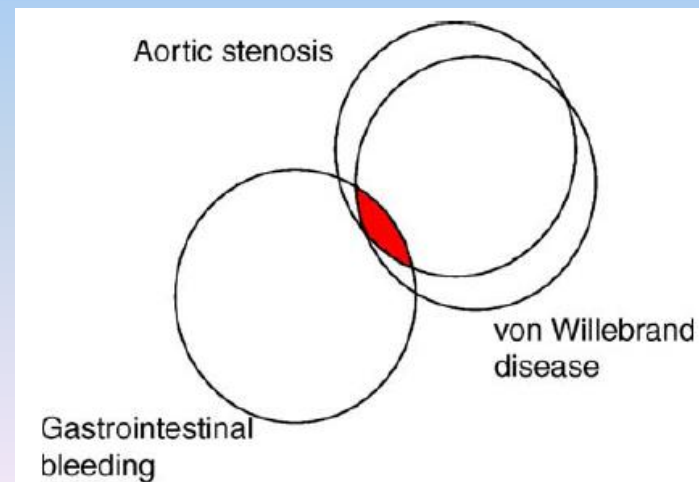
\*Makris M. *Thrombosis research* 2006;118,S1:13-17

### „Heyde´s“ syndrom:

\*Heyde EC, *NEJM* 1958; 259: 196

- Aortální stenóza
- GIT krvácení
- ↓ HMW multimerů VWF
- ↓ VWF v endotelu
  - neovaskularizace

\*Starke RD, *Blood* 2011;117:1071-80



# Diagnostika získaného VWS

## Anamnéza:

- Krvácivé projevy až ve „vyšším“ věku
- Negativní RA
- Onemocnění spojené se získaným VWS:
  - Lymfoproliferace 7% (8/113)
  - Myeloproliferace 11% (14/125)

*\*Tiede A et al. Blood 2011;117:6777-6785*

## Laboratorní vyšetření:

- PFA-100
- FVIII, VWF:Ag, **VWF:RCo**, VWF:CB:
  - ↓ VWF:RCo/VWF:Ag, ↓ VWF:CB/VWF:Ag
- Multimery VWF
- Propeptid VWF:
  - ↑ VWFpp/VWF:Ag při ↑ clearance VWF
- Inhibitor non-neutralizující, ↑ clearance VWF:
  - Nelze prokázat Bethesda metodou

# Léčba získaného VWS

- Léčba základního onemocnění:
  - Efekt u autoimunitních onemocnění
  - Neúčinné při MGUS
- DDAVP:
  - U solidních tumorů efekt v 75%, není registrován
- Koncentrát VWF/FVIII:
  - Krátký poločas
- rFVIIa:
  - Ekonomická náročnost
- HD-IVIG:
  - Pouze u IgG MGUS
- Plazmaferéza:
  - U IgM MGUS

*\*Tiede A et al. Blood 2011;117:6777-6785*