

AGATA KAZIMIERSKA¹, MARTA MALEK¹, KATARZYNA PIZIORSKA¹,
ALEKSANDRA BLOCH¹, EWA KAZIMIERSKA²

AKTYWNOŚĆ CZYNNIKA VON WILLEBRANDA W WYBRANEJ GRUPIE STUDENTÓW GDAŃSKIEGO UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO

ACTIVITY OF VON WILLEBRAND'S FACTOR IN THE CHOSEN GROUP OF STUDENTS OF MEDICAL UNIVERSITY OF GDANSK

¹ Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
opiekun: dr n. med. Ewa Kazimierska

² Klinika Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
kierownik: dr hab. med. Krzysztof Sworczak, prof. nadzw.

Celem pracy była ocena aktywności czynnika von Willebranda (vWF) u 63. studentów Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o śr. wieku $22,4 \pm 1,3$ lat. Obniżoną aktywność vWF stwierdzono u siedmiu (11,1%) studentów, w tym u czterech mężczyzn i trzech kobiet. W grupie z obniżoną aktywnością vWF nie wykazano klinicznych cech skazy krwotocznej ani u badanych, ani wśród bliskich. Natomiast zaburzenia hemostazy pod postacią obfitych miesiączek miały dwie studentki. Z uwagi na wysoki odsetek osób z obniżoną aktywnością vWF badania te należy kontynuować z poszerzeniem o ocenę stężenia vWF w osoczu. Pozwoli to na uzyskanie bardziej wiarygodnych wyników.

Choroba vW została opisana po raz pierwszy przez Erika von Willebranda w 1926 roku u pięcioletniej Finki z Wysp Alandzkich. W piątym roku życia trafiła ona do szpitala w Helsinkach z objawami skazy krwotocznej o ciężkim przebiegu klinicznym. Jej cztery siostry zmarły pomiędzy 2. a 4. rokiem życia z powodu krwotoków z nosa, z ran i przewodu pokarmowego. Dziewczynka zmarła w 13. roku życia wskutek upływu krwi podczas czwartej w jej życiu miesiączki. Na 66. przebadanych członków tej rodziny u 23. stwierdzono skazę krwotoczną, w tym u 16. kobiet. Von Willebrand zauważył, że w odróżnieniu od hemofilii ta skaza krwotoczna występuje zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn oraz charakteryzuje się wydłużonym czasem krwawienia [2].

Skaza ta, manifestująca się przedłużającymi krwawieniami z ran pooperacyjnych, obfitymi krwawieniami miesięcznymi u kobiet została najpierw nazwana dziedziczną pseudohefilią, następnie trombocytopenią a później angiohefilią. W latach 50. stwierdzono, że wydłużenie

czasu krwawienia u tych chorych jest korygowane glikoproteiną osoczną. Glikoproteinę tę w 1972 roku nazwano vWF. Późniejsze badania potwierdziły ścisły związek strukturalny i czynnościowy vWF i czynnika VIII. Do sklonowania genu vWF doszło w latach 80. [1].

Czynnik ten pełni kluczową rolę w mechanizmach pierwotnej hemostazy oraz jest białkiem nośnikowym dla VIII czynnika krzepnięcia krwi. Z jednej strony jest on odpowiedzialny za adhezję płytek do warstwy podśródbłonkowej naczyń krwionośnych (w przypadku uszkodzenia śródbłonka), zaś z drugiej chroni czynnik VIII przed jego inaktywacją.

Gen kodujący vWF umiejscowiony jest na chromosomie 12. Mutacje tego genu dziedziczą się autosomalnie, recesywnie lub dominująco. Synteza vWF odbywa się w komórkach śródbłonka naczyń oraz w megakariocytach szpiku kostnego. Jest on białkiem zbudowanym z różnej wielkości multimerów rozkładanym przez metaloproteazę ADAMTS13 [2,9].

Choroba vW jest najczęściej występującą wrodzoną skazą krwotoczną, aczkolwiek rozpoznawana jest rzadko. W badaniach populacyjnych oszacowano, że częstość występowania defektów vWF w populacji ogólnej waha się w granicach 0,6 – 1,3%, zaś liczba klinicznych przypadków jest znacznie niższa i wynosi około 0,01% [5]. Liczba chorych zarejestrowanych w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie wynosi 1035 osób, co stanowi 0,0027% polskiej populacji ogólnej (dane z 06.2008 roku). Oznacza to, że u 200 000 – 500 000 Polaków choroba pozostaje nierozpoznana [9]. Zapewne wynika to z faktu, że obraz kliniczny jest uzależniony od typu choroby. Typ I, łagodny występujący najczęściej, charakteryzuje się umiarkowanym niedoborem vWF i czynnika VIII oraz przebiega zwykle bezobjawowo. Zaburzenia hemostazy u tych osób ujawniają się przy dużych zabiegach operacyjnych lub po ekstrakcji zębów, a u kobiet mogą występować przedłużające się, obfite miesiączki [1,2]. Typ III choroby vW charakteryzujący się znacznym niedoborem tych czynników, przebiega pod postacią nasilonych krwawień po zabiegach operacyjnych oraz samoistnych wylewów krwi do mięśni i stawów. W typie II wyróżnia się cztery podtypy, które uwarunkowane są zmianami jakościowymi lub ilościowymi vWF oraz różnym jego powinowactwem do glikoprotein płytkowych. Przebieg kliniczny w powyższym typie choroby jest zmienny i może być podobny do objawów chorobowych w typie III.

Badaniem powszechnie stosowanym w diagnostyce choroby vW jest test czynnościowy oceniający aktywność kofaktora rystocetyny (vWF:RCo). Określa on zdolność vWF do interakcji z prawidłowymi płytkami krwi w obecności rystocetyny, antybiotyku pośredniczącego w warunkach laboratoryjnych w wiązaniu vWF z płytkową glikoproteiną Ib. Badanie to określa aktywność vWF i może służyć jako jeden z testów przesiewowych dla tej choroby. Natomiast właściwe rozpoznanie choroby vW wymaga określenia stężenia vWF oraz aktywności prokoagulacyjnej czynnika VIII, a w niektórych przypadkach analizy multimerów vWF, agregacji płytek krwi pod wpływem niskiego stężenia rystocetyny czy testu wiązania czynnika VIII przez vWF [2,9].

Brak precyzyjnych danych odnośnie częstości występowania defektów vWF skłoniło nas do przeprowadzenia oznaczeń jego aktywności w grupie studentów naszej Uczelni.

CEL PRACY

Celem pracy była ocena częstości występowania obniżonej aktywności czynnika vWF oparta na badaniu aktywności kofaktora rystocetyny w osoczu krwi u studentów Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

GRUPA BADANA I METODY

Badaniem objęto 63 zdrowe osoby (śr. wieku $22,4 \pm 1,3$) w tym 45 studentek (śr. wieku $22,3 \pm 1,52$) i 18. studentów (śr. wieku $22,75 \pm 0,5$) Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. U wszystkich przeprowadzono wywiady przy użyciu przygotowanego kwestionariusza, ze szczególnym uwzględnieniem występowania objawów skaz krwotocznych w rodzinie oraz u badanego. Z pracy wykluczono osoby niedysponowane fizycznie oraz przyjmujące leki przeciwkrzepliwe i antyagregacyjne. Krew pobierano na czczo, w godzinach rannych po 30-minutowym odpoczynku z żyły odłokciowej przy minimalnym zastojem do próbki plastikowej zawierającej 3,2% cytrynianu sodu, w stosunku 1:9. Po odwirowaniu krwi (5000 obrotów na min. w temperaturze 4°C) próbki z osoczem zamrażano, a następnie przechowywano w temperaturze -80°C . Jednocześnie pobierano krew w celu określenia parametrów morfologicznych. Po powolnym rozmrożeniu osocza w temperaturze 37°C oznaczano aktywność kofaktora rycocetyny metodą koagulacyjną na analizatorze koagulometrycznym Behring Coagulation System (BSC) przy użyciu zestawu odczynników firmy Dade-Behring, stosując się ściśle do zaleceń producenta. Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT), czas protrombinowy oznaczono testem immunoenzymatycznym ELISA, przy zastosowaniu zestawu testów firmy Behring. Powyższe badania wykonano w Pracowni Koagulologicznej Kliniki. Morfologię krwi wykonano w Centralnym Laboratorium szpitala. Aktywność vWF podano w procentach, która u zdrowych osób mieści się w przedziale od 50–150% normy, co odpowiada 50 – 150 IU/dl.

Wyniki badań opracowano statystycznie, obliczając średnią arytmetyczną wartości uzyskanych oraz odchylenia standardowe wg odpowiednich wzorów.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

W badanej grupie obniżoną aktywność vW ($\leq 40\%$ normy) stwierdzono u siedmiu osób, w tym u trzech kobiet i u czterech mężczyzn (tab. I, II).

Dwie studentki z obniżoną vWF miały obfite miesiączki trwające ok. 7 dni, a u jednej z nich stwierdzono niskie stężenie hemoglobiny i obniżoną liczbę krwinek czerwonych. U trzeciej studentki miesiączki były średnio-obfite i trwały około 5 dni (tab. II). Ponieważ ocena nasilenia krwawienia miesiączkowego jest trudna do zobiektywizowania, wzięto pod uwagę ogólnie przyjęte metody wskazujące na utratę znacznej ilości krwi miesiączkowej. Wymiana podpaski lub tamponu częściej niż raz na godzinę lub obecność we krwi miesiączkowej skrzepów o $\text{śr.} > 2,5$ cm wskazują na utratę krwi powyżej 80 ml [9]. APTT u wyżej wymienionych mieścił się w granicach referencyjnych. Zwykle APTT jest wydłużony jedynie u tych osób, u których obserwuje się znaczne obniżenie aktywności czynnika VIII i dotyczy głównie choroby vW typu III [9].

W przeszłości rozpoznanie opierało się na oznaczeniu APTT i czasu krwawienia, które na ogół są prawidłowe w typie I i II choroby vW, a znacznie wydłużone w typie III [8,7,9]. Również wywiad rodzinny w kierunku skaz krwotocznych u tych trzech dziewcząt był ujemny, co jest zgodne z piśmiennictwem. Należy podkreślić, że krwotoczne miesiączki mogą być tylko jedynym uciążliwym objawem choroby. Badania kliniczne wykazały, że choroba vW występuje u 5–20% kobiet obficie miesiączkujących [2]. W związku z tym należałoby u tych studentek poszerzyć diagnostykę w tym kierunku.

Tabela I. Wyniki przeprowadzonych badań

Table I. Results of the study

Średnia ± SD Mean ± SD	Badana grupa / Group 63 Kobiety / Women 45 (71,4%) Mężczyźni / Men 18 (28,6%)	Z obniżoną aktywnością vWF (≤40) With decreased activity of vWF(≤40) 7 (11,1%)	
		Kobiety / Women 3	Mężczyźni / Men 4
vWF:RCo* %	83,3 ± 32,5	40 ± 1,7	40 ± 2,0
APTT ** s.	36,0 ± 7,7	35,5 ± 0,75	43 ± 4,8
wAPTT	1,0 ± 0,2	1,03 ± 0,02	1,27 ± 0,1
PT s	13,2 ± 1,9	13,3 ± 0,66	13 ± 0,6
INR	1,1 ± 0,2	1,07 ± 0,05	1,03 ± 0,9
RBC G/L	4,5 ± 0,4	4,2 ± 0,25	5,05 ± 0,1
Hb g/dl	13,3 ± 1,3	12,4 ± 1,4	14,8 ± 0,47
Ht %	38,8 ± 3,6	36,7 ± 3,2	43,75 ± 0,5
PLT G/l	254,30 ± 67,01	331,6 ± 150	250 ± 90
Skaza krwotoczna w rodzinie / Haemorrhagic diathesis	63 badanych 9 (14,3%)	45 kobiet 9 (20%)	18 mężczyzn 0
Obfite miesiączki Abundant menstruation bleeding		10 (22,2%)	
Wiek (lat) Age (years)	22,4 ± 1,3	22,3 ± 1,52	22,75 ± 0,5

* Aktywność kofaktora rycocetyny / Ristocetin Cofactor Activity – vWF: RCo

** Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji / Activated Partial Thromboplastin Time – APTT

U czterech studentów z obniżoną aktywnością vWF nie obserwowano objawów skazy krwotocznej, wywiad rodzinny również był negatywny, natomiast w układzie krzepnięcia stwierdzono nieznaczne wydłużenie APTT. Wyniki morfologii krwi nie wykazywały odchyleń od normy.

Wywiad rodzinny w kierunku skaz krwotocznych był dodatni u 9 (20%) z 45. badanych kobiet, ale żadna z nich nie miała obniżonej aktywności vWF. Obfite miesiączki stwierdzono u 10 (22%) z 45. dziewcząt, dwie z nich miały obniżoną aktywność czynnika vWF, a pozostałe 8 nie wykazywały odchyleń w przeprowadzonych badaniach.

Odsetek występowania obniżonej aktywności vWF w grupie badanej jest bardzo wysoki 11,1%. Być może miała na to wpływ mała grupa badanych. Nie można również wykluczyć nabytego niedoboru vWF, który może być efektem utajonych chorób autoimmunologicznych

[3]. Dlatego też planujemy powtórzyć badania na znacznie większej grupie zdrowych, młodych osób, oznaczając u nich aktywność, jak i stężenie vWF. Wyniki tej analizy pozwolą jednocześnie wykazać, który test jest wiarygodniejszy dla badań przesiewowych choroby vWF.

Tabela II. Wyniki przeprowadzonych badań u studentek z obniżoną aktywnością vWF $\leq 40\%$ Table II. Results of the study on a group of female students with decreased activity of vWF $\leq 40\%$

Wyniki badań Results	Badana nr 1 (R. A.)	Badana nr 2 (P. K.)	Badana nr 3 (M.A.)	Średnia \pm SD Mean \pm SD
Hb g/dl	12,8	13,7	10,9	12,4 \pm 1,4
RBC G/l	4,5	4,3	4,0	4,26 \pm 0,25
Ht %	38	39,2	33	36,7 \pm 3,28
PLT G/l	250	505	240	331,66 \pm 150,1
INR	1,04	1,14	1,05	1,07 \pm 0,05
PT s	12,9	14,1	13,0	13,3 \pm 0,66
APTT s	36,3	34,8	35,6	35,5 \pm 0,75
wAPTT	1,04	1,0	1,05	1,03 \pm 0,02
Czas trwania miesiączki Duration of menstruation	5 dni days	6 dni days	7 dni days	
Obfitość krwawień Menstruation bleeding	Średnio obfite Medium	Obfite Heavy	Obfite Heavy	
Wywiad rodzinny Family history	Ujemny Negative	Ujemny Negative	Ujemny Negative	

WNIOSKI

1. W badanej grupie studentów wykazano obniżenie aktywności vWF u 7 (11,1%) z nich.
2. Średnie stężenia aktywności vWF i innych przeprowadzonych analiz w całej grupie badanej, nie odbiegały od wartości referencyjnych.
3. Badania powinny być nadal kontynuowane na większej liczbie grupie.

PIŚMIENNICTWO

1. Bogusz M., Lewandowski K.: Choroba von Willebranda: od struktury genu do zaburzeń funkcji cząsteczki białkowej. *Acta Haematol. Pol.* 2005, 36, 1, 33 – 43. – 2. Łopaciuk S.: Choroba von Willebranda u kobiet. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2000, 103, supl. 11 – 15. – 3. Lubińska M., Świątkowska-Stodulska R., Kazimierska E., Sworczak K.: Acquired von Willebrand's syndrome in a patient with severe primary hypothyroidism associated with myasthenia gravis in the course of autoimmune polyglandular syndrome type 3. *Haemophilia* 2007, 13, 675 – 676. – 4. Michiels J.J., Budde U., i wsp.: Acquired von Willebrand syndromes: clinical features, aetiology, pathophysiology, classification and management. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2001, 14, 401 – 436. – 5. Sadler J.E., Mannucci P.M., Bochkov N. i wsp.: Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromb. Haemost.* 2000, 84, 160 – 174. – 6. Will A.: Pediatric acquired von Willebrand syndrome. *Haemophilia* 2006, 12, 287 – 288. – 7. Windyga J.: Czynniki von Willebranda – funkcje biologiczne i zastosowanie w leczeniu. *Ordynator Leków* 2007, 7, 11/12, 73 – 74. – 8. Windyga J.: Skazy krwotoczne osoczone. W: *Choroby wewnętrzne*, red. A. Szczeklik, 1. Kraków: Medycyna Praktyczna, 2005, 1571 – 1575. – 9. Zdziarska J., Chojnowski K., Klukowska A.,

Łętowska M., Mital A., i in.: Postępowanie w chorobie von Willebranda: zalecenia PTHiT. 2008. Medycyna Praktyczna 2008, wyd. spec. 12, 1 – 24.

Ankieta dla badanego data badania		
Nr badanego		
Nazwisko	imię.....	data..... ur.
Pierwsza miesiączka.....krwawienie.....ilość dni.....ilość opasek /godz. /dziennie		
Skłonność do krwawień:taknie jakie		
Przyjmowane leki, jakie		
Wywiad rodzinny: Skłonność do krwawień : Tak nie jakie krwawienia		
Stan kliniczny badanego		
Zawód		
Wyniki badań		
MORFOLOGIA		
HB		
RBC		
Ht		
MCV		
MCH		
PLT		
UKŁAD KRZEPNIĘCIA		
Aktywność cz.vW		
APTT		
wAPTT		
PT		
INR		
Poinformowano ustnie o celowości przeprowadzenia proponowanych badaniach		
Zgoda badanego na powyższe badania: podpis badanegopodpis świadka		

A. Kazimierska, M. Malek, K. Piziorska, A. Bloch, E. Kazimierska

ACTIVITY OF VON WILLEBRAND'S FACTOR IN THE CHOSEN GROUP OF STUDENTS OF MEDICAL UNIVERSITY OF GDANSK

Summary

Introduction: taking into account the fact of not well specified data considering defects of von Willebrand's factor (vWF) resulting in hemorrhagic diathesis especially after procedures or menstrual bleeding, we decided to assess the activity of this factor, in a group of young and healthy people. Aim of the study. Assessment of the incidence of decreased activity of vWF based on the examination of ristocetin co-factor activity in the serum. Material and methods. The study involved 63 healthy volunteers (mean age 22.4 ±1.3) among them 45 female students (mean age 22.3±1.52) and 18 male students (mean age 22.7±0.5) of Medical University of Gdansk. In all subjects, anamnesis was taken on the basis of prepared questionnaires with special attention to family history of hemorrhagic diathesis. All subjects not physically predisposed and/or taking drugs among others anti-platelet and anti-aggregation ones were excluded from

the study. After slow defrosting of the serum at the temperature of 37°C, activity of ristocetin cofactor was assessed by means of the coagulometric analyzer Behring Coagulation System (BSC) with the use of Dade-Behring reagents set strictly following the producer's orders. Activated partial thromboplastin time (APTT) and prothrombine time were assessed by means of the immunoenzymatic ELISA test with the use of Behring testing sets. All the above mentioned examinations were performed in the Coagulation Laboratory of our Department. Blood morphology was assessed in the Central Laboratory of the Hospital. Activity of vWF was given in percentage of the normal value which in healthy subjects ranges from 50 to 150% of the norm and corresponds to 50 – 150 IU/dl. The obtained results were analyzed statistically counting their mean arithmetical values and standard deviation according to suitable equations.

Results: in the studied group, decreased activity of vWF ($\leq 40\%$) was stated in 7 subjects – 3 women and 4 men. Two female students with decreased activity of this factor presented with significant menstrual bleeding lasting for about 7 days and in one of them decreased concentration of hemoglobin was stated. In the third female student menstruation bleeding was of medium intensity lasting about 5 days. APTT in the mentioned above students was within the normal range of values. APTT is prolonged only in persons with significantly decreased activities of factor VIII and it mainly considers vW disease type III. Also family history regarding hemorrhagic diathesis in these three students was negative which correlates with the literature. In 4 male students with decreased activity of vWF, no symptoms of diathesis were observed and family history was negative, too. However, in the coagulation system, a slight prolongation of APTT was stated. Blood morphology results did not show any deviation from normal values. Family anamnesis towards hemorrhagic diathesis of the examined subjects was positive in 9 out of 45 female students, none of them presented with decreased activity of vWF. Abundant menstruation bleeding was stated in 10 out of 45 girls, two of them had decreased activity of vWF, the other 8 did not show any deviation from the examined parameters. Percentage of the decreased activities of vWF in the examined group was very high (11.1%) what is discordant with the data from literature and Working Group of Hemostatic Disorders of the PTHiT which may be due to a small group of the examined subjects. According to this, a larger group of healthy young individuals should be examined for activity and concentration of vWF. Results of such analysis might indicate a more reliable way of screening towards vW disease. Conclusions: 1. In the examined group of the students, decreased activity of vWF was stated in 7 (11.1%) subjects. 2. Mean concentrations of vWF activity and other conducted examinations stayed within the normal range of values in the whole examined group. 3. The study should still be continued in a larger group of people.

Adres: E. Kazimierska

Klinika Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych GUMed

e-mail: ekazimierska@wp.pl