

УДК 616-008.852-577.182.84

К. Кастаман
Резюме и комментарии

Центр гемофилии и тромбозов, Отделение клеточной терапии и гематологии, Больница Сан-Бортоло, г. Виченца, Италия

Оригинальное название:

A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity.

Сравнительная оценка нового автоматизированного анализа активности фактора Виллебранда.

Lawrie AS, Stufano F, Canciani MT, Mackie IJ, Machin SJ, Peyvandi F.

Haemophilia 2013; 19(2): 338

РИСТОЦЕТИН ДЛЯ АНАЛИЗА ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА: НУЖЕН ЛИ ОН НАМ?**Резюме**

Ристоцетин-кофакторный анализ (ФфВ:RCo) является основным методом для оценки активности фактора фон Виллебранда (ФфВ) при диагностировании болезни Виллебранда (БВ). Тем не менее, этот анализ отличается плохой воспроизводимостью и малой чувствительностью при низких уровнях ФфВ, и является достаточно трудоемким. В данной работе Lawrie и соавт. оценили производительность нового иммунотурбидиметрического анализа для определения активности ФфВ (INNOVANCE® VWF Ac., Siemens Healthcare Diagnostics, Марбург, Германия). В этом анализе ристоцетин и тромбоциты не используются и заменены фрагментом рекомбинантного гликопротеина тромбоцитов Ib (GPIb) с искусственно введенными мутациями, улучшающими связывание ФфВ с GPIb.

В анализе использовали 50 нормальных контрольных образцов, образцы крови от 80 пациентов с БВ и 50 образцов с признаками гемолиза, желтухи или липемии, которые сравнили с данными классического, основанного на тромбоцитах теста ФфВ:RCo. Корреляция с результатами ФфВ:RCo была удовлетворительной, как и рассчитанное соотношение ФфВ:Ac и ФфВ:RCo к ФфВ:Ag (рис. 1). Тем не менее, предел обнаружения ФфВ: Ac был ниже по сравнению с ФфВ:RCo (3 Ед/дл и 5 Ед/дл, соответственно). Авторы пришли к выводу, что новый анализ является надежным и более чувствительным, чем ФфВ:RCo при низкой концентрации ФфВ. Анализ является простым и менее трудоемким для проведения в неспециализированных лабораториях.

Ключевые слова: Ристоцетин-кофакторный анализ, иммунотурбидиметрический анализ, образцы крови, эксперимент.

Комментарии

В 1975 г. Macfarlane и сотрудники опубликовали новый метод для анализа уровней ФфВ в плазме [1]. Метод был назван «ристоцетин-кофакторная активность ФфВ» (ФфВ:RCo, или ФфВ:РКА) и основан на способности ристоцетина вызывать агрегацию тромбоцитов в реакции, зависимой от наличия/отсутствия мультимеров фактора фон Виллебранда с высоким молекулярным весом. Техника этого анализа берет начало из наблюдений о том, что прием антибиотика ристоцетина, назначаемого для терапии различных заболеваний с начала 60-ых годов XX века, часто сопровождается тромбоцитопенией как побочным эффектом [2]. Антибиотик был впоследствии отозван с рынка, однако демонстрация того, что тромбоцитопения вызвана взаимодействием ФфВ с гликопротеином Ib (GPIb) на поверхности тромбоцитов, легла в основу нового способа анализа функции ФфВ в плазме пациента. С помощью этого метода определяется активность ФфВ путем измерения скорости и степени агглютинации в перемешиваемой суспензии тромбоцитов в ответ на фиксированную дозу ристоцетина (обычно 1 мг/мл после добавления последовательно разведенной плазмы пациента или нормальной контрольной плазмы). Тем не менее, было обнаружено, что анализ является плохо воспроизводимым, трудоемким и обладающим сравнительно малой чувствительностью к низким уровням ФфВ в плазме пациента. Дальнейшие исследования указали на несколько требований, которые рекомендуется выполнять для полу-

чения более надежных результатов классического ристоцетин-теста.

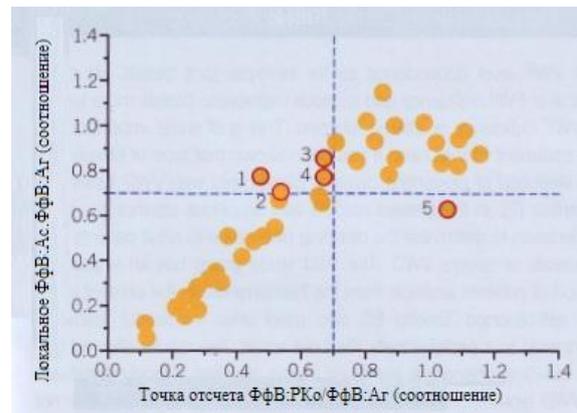


Рисунок 1. Корреляция между соотношениями ФфВ:RCo и ФфВ:Ac к ФфВ:Ag в образцах, полученных от пациентов с БВ. Пунктирная линия соответствует соотношению 0,7. Соотношение <0,7 связано с дисфункциональным ФфВ.

1: БВ типа 2 / IIE (мутация *p.P1127_G1180delinsR*);
2: тип 2М Виченца (Vicenza) (мутация *p.R1205H*);
3: Тип 1 (мутация отсутствует);
4: Тип 1 (Мутация *p.S1024fa*);
5: Тип 1 (мутация отсутствует).
Мутации обнаружены в гетерозиготной форме.

Среди них: использование формалин- и глутаральдегид-фиксированных тромбоцитов, добавление ристоцетина в концентрации 1 мг/мл, использование трех различных разбавлений испытуемого образца, дополнительной калибровочной кривой, калибровки местного стандарта по сравнению с международными эталонными контрольными препаратами (с использованием ФфВ-дефицитной плазмы для разбавления в кривых «доза-ответ», если в анализ включена лиофилированная плазма). Среди других условий: продолжительность анализа не должна превышать 2-х часов, с включением в анализ контроля плазмы с высоким и низким содержанием ФфВ в каждом анализе [3].

Перечисленные трудности при проведении теста нередко встречаются даже в специализированных лабораториях [4]. Поэтому для замены ФфВ:RCo был предложен ряд других тестов, включая коллаген-связывающую активность или иммунотурбидиметрические методы для ФфВ:RCo. Тем не менее ни один тест нельзя однозначно рекомендовать вместо основанного на взаимодействии тромбоцитов ФфВ:RCo. Однако следует иметь в виду, что ристоцетин не является физиологическим компонентом системы свертывания и, таким образом, даже классический тест на ристоцетин-кофакторную активность представляет собой лишь искусственное моделирование функций ФфВ, наблюдаемых *in vivo*.

Для решения обозначенных выше проблем недавно был разработан новый анализ. Тест-система на основе ИФА исследует взаимодействие «ФфВ – GPIb» с использованием рекомбинантного белка с генетически модифицированного гена *GPIb* (GPIba235Y, 239V), содержащего две естественные мутации, которые вызывают БВ тромбоцитарного типа (PT-БВ) [5]. Наличие этих мутаций усиливает связывание гликопротеина Ib с его молекулами-партнерами. Действительно, PT-БВ – это наследственное нарушение функции тромбоцитов, вызываемое мутациями в *GPIb*, которые обуславливают спонтанное усиление взаимодействия с ФфВ и приводят к тромбоцитопении [6]. Таким образом, используемая генетическая конструкция имитирует БВ типа 2В - с тем лишь отличием, что в последнем случае описанные выше мутации находятся в домене A1 ФфВ [7]. С помощью этого анализа на всех типах БВ были получены результаты, аналогичные данным классического теста ФфВ:RCo. Исключение составили лишь пациенты с БВ типа 2В, которые показали повышенные результаты в соотношении тестов ИФА / ФфВ:Ag из-за того, что у большинства пациентов нормальные уровни в ходе анализа были измерены на основе ИФА [5]. Этот результат демонстрирует то, что в ходе нового теста можно эффективно отделить пациентов с БВ типом 2А от типа 2В, в ряде случаев дополнительно демонстрируя аномальную природу молекулы ФфВ (например, отсутствие мультимеров с высокой молекулярной массой).

В настоящем исследовании *Lawrie и соавт.* использовали новый метод в формате автоматизированного иммунотурбидиметрического теста, разработанного компанией Siemens Healthcare Diagnostics. Реагенты поставляются в жидком виде, в анализе используются полистирольные микрогранулы, покрытые антителами к GPIb. После добавления рекомбинантного GPIba235Y.239V человека этот белок связы-

вается с антителами на полистирольных гранулах с одной стороны и с молекулами ФфВ из исследуемого образца с другой. Данное взаимодействие вызывает «склеивание» гранул между собой и изменение физических свойств образца, по которым и определяют результат теста. Каждый образец был проанализирован в двух различных разведениях; данные показали хорошую корреляцию с классическим тестом ($r_s = 0,99$, $P < 0,0001$). Аналогично, нормальные контрольные и испытуемые клинические образцы показали хорошую корреляцию между ФфВ:RCo и ФфВ:Ac, характеризуясь лишь незначительной погрешностью. Более высокая чувствительность метода к низким уровням ФфВ:Ac по сравнению с классическим тестом ФфВ:RCo позволила успешно измерить активность ФфВ:Ac в тех 17 образцах БВ, где активность была ниже предела чувствительности классического ФфВ:RCo. Как следствие, соотношение ФфВ:Ac к ФфВ:Ag, выявленное с помощью этой новой методики, является более надежным.

В заключение стоит отметить, что новый анализ на основе ИФА, описанный в работе *Lawrie и соавт.*, является надежным и точным методом, с улучшенной чувствительностью к низким концентрациям ФфВ по сравнению с классическим анализом ФфВ:RCo. В основе предлагаемого теста лежит простая и понятная методология, что делает его удобным для использования в лабораториях с ограниченным опытом диагностики болезни фон Виллебранда. Тем не менее, необходимы дополнительные данные по поведению этой новой тест-системы в различных ситуациях (например, мониторинг влияния десмопрессина [DDAVP] или ответа на введение концентратов ФVIII/ФфВ) прежде чем рекомендовать данный тест для повсеместного использования.

Литература:

1. Macfarlane DE, Stibbe J, Kirby EP *et al.* A method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofactor). *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 34: 306-308.
2. Gangarosa EJ, Johnson TR, Ramos HS. Ristocetin-induced thrombocytopenia: site and mechanism of action. *Arch Intern Med* 1960; 105:83-89.
3. Rodeghiero F, Castaman G. Calibration of lyophilized standards for ristocetin cofactor activity of von Willebrand Factor (vWF) requires vWF-deficient plasma as diluent for dose-response curves. *Thromb Haemost* 1987; 58: 978-981.
4. Lee CA, Hubbard A, Sabin CA *et al.*, 15th SSC Subcommittee on ФфВ. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease: results from a prospective and blind study in 32 laboratories worldwide using lyophilized plasmas. *J Thromb Haemost* 2011; 91: 220-222.
5. Flood VH, Gill JC, Morateck PA *et al.* Gain-of-function GPIb ELISA assay for ФфВ activity in the Zimmerman Program for the Molecular and Clinical Biology of VWD. *Blood* 2011; 117: e67-74.
6. Othman M. Platelet-type von Willebrand disease: a rare, often misdiagnosed and underdiagnosed bleeding disorder. *Semin Thromb Hemost* 2011; 37: 464-469.
7. Federici AB, Mannucci PM, Castaman G *et al.* Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: a cohort study of 67 patients. *Blood* 2009; 113: 526-534.

Тұжырым

ВИЛЛЕБРАНД ФАКТОРЫН ТАЛДАУ ҮШІН РИСТОЦЕТИН: ОЛ БІЗГЕ КЕРЕК ПЕ?

Ристоцетин-кофакторлы талдау (ФфВ:RCo) Виллебранд (ВА) ауруын диагностикалау кезіндегі Виллебранд фоны факторының (ФфВ) белсенділігін бағалау үшін негізгі әдіс болып табылады. Алайда, осы талдау ФфВ төмен деңгейі кезінде жаман қайта өндірумен және кішкене сезімталдылықпен ерекшеленеді және көп еңбекті қажет ететін болып табылады. Осы еңбекте Lawrie авторластарымен ФфВ белсенділігін анықтау үшін жаңа иммунотурбидиметриялық талдаудың өнімділігін бағалады (INNOVANCE® VWFAc., Siemens Healthcare Diagnostics, Марбург, Германия). Осы талдауда ристоцетин мен тромбоциттер қолданылмайды және ФфВ GPIb байланыстыруды жақсартушы жасанды енгізілген мутациялармен тромбоциттердің рекомбинантты гликопротеин Іb (GPIb) фрагменттерімен ауыстырылған.

Талдауда 50 қалыпты бақылау үлгілері, ВА –мен 80 пациент қанының үлгілері және гемолиздің, сарыаурудың немесе липемияның нышандарымен 50 үлгі қолданылған, оларды ФфВ:RCo тестінің тромбоциттеріне негізделген классикалық деректермен салыстырылды. ФфВ:RCo нәтижелерімен корреляция қанағаттанарлық болды, сол сияқты ФфВ:Ac және ФфВ:RCo ФфВ:Ag есептелген ара қатынасы ретінде. Алайда ФфВ айқындау шегі: ФфВ:RCo –пен салыстырғанда Ac төмен болды (тіісінше 3 Бірл/үз және 5 Бірл/үз).

Авторлар ФфВ төмен концентрациясы кезінде ФфВ:RCo қарағанда жаңа талдау сенімді және сезімталдырақ болып табылады деген қорытындыға келді. Талдау мамандандырылған емес зертханаларда өткізу үшін қарапайым және көп еңбекті қажет етпейтін болып табылады.

Негізгі сөздер: Ристоцетин-кофакторлы талдау, иммунотурбидиметриялық талдау, қан үлгілері, эксперимент.

Summary

Ristocetin for analysis of von Willebrand factor: Do we actually need it?

Ristocetin – cofactor analysis (R:Co) is the main method for estimation of von Willebrand factor activity at diagnostic of Willebrand diseases (WD). Nevertheless, this analysis is distinct with bad reproducibility and low sensibility at low rates of FWV and it is considerably time-consuming. In this paper, Lawrie and coauthor have evaluated the productivity of new immuno-turbidimetric analysis to define activity of FWV (INNOVANCE® VWFAc., Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany). In this analysis ristocetin and thrombocytes are not use and changed with fragment of recombinant glycoprotein of thrombocytes Іb (GPIb) with affectedly impregnate mutations ameliorative fixation FWV and GPIp.

There were use 50 standard control samples, blood samples of 80 WD patients and 50 with erythrocatalysis, icterus and hiperlipoidemia evidences which were compared with data of classic FWV:RCo test, rest on thrombocytes. Results correlation of FWV:RCo was satisfactory as well as calculated quotient of FWV:Ac and FWV:RCo to FWV:Ar. Nonetheless, detection limit of FWV:Ac was lower than FWV:RCo (3cl/Ig and 5cl/Ig) properly.

Authors reason that new analysis is sure and more sensitive than FWV:RCo at low concentration of FWV. Analysis is simple and less difficult for carrying out at unspecialized laboratories.

Key words: Ristocetin – cofactor analysis, immuno-turbidimetric analysis, blood samples, experiment.

УДК 612.42-616-097-612.014.482.1

М.Р. Мадиева, А.К. Мусайнова, Б.А. Жетписбаев, С.Е. Узбекова, Х.С. Жетписбаева

Государственный медицинский университет города Семей

ИЗМЕНЕНИЯ СОСТОЯНИЙ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ ИММУНОГЕНЕЗА В ПОЗДНЕМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ФРАКЦИОНИРОВАННОЙ ДОЗЫ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ

Аннотация

В отдаленном периоде после общего фракционированного гамма-излучения сниженными остаются масса и число тимоцитов в тимусе, лимфоидных клеток в лимфатических узлах тонкого кишечника.

Ключевые слова: фракционированное гамма-излучение, тимоциты, лимфоидные клетки.

Лимфоидные клетки, с которыми связаны все иммунные механизмы организма, появляются, созревают и функционируют в определенных органах иммунной системы. В свою очередь они делятся на два типа: первичные (центральные) и вторичные (периферические). В центральных лимфоидных органах иммуногенеза созревание лимфоцитов происходит без существенного влияния антигенов, в то время периферические лимфоидные органы зависят от антигенного воздействия. В центральных лимфоидных органах иммуногенеза – костный мозг, тимус и сумка Фабрициуса происходит дифференцировка определенных популяций лимфоцитов: тимус представляет собой тимусзависимые, или Т-лимфоциты, а в сумке Фабрициуса образуются В-лимфоциты. После рождения костный

мозг становится основным источником стволовых клеток [1,2].

Периферическими лимфоидными органами следует считать селезенку, лимфатические узлы, миндалины, а также ассоциированную с кишечником и бронхами лимфоидную ткань. Периферические органы иммунной системы заселяются Т- и В-лимфоцитами из центральных органов, при этом каждая популяция лимфоцитов мигрирует в определенные области периферических органов, которые называются тимусзависимыми и тимуснезависимыми зонами [1-4].