

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATAŠA KRALJIČ

**VPELJAVA AGLUTINACIJSKE METODE ZA DOLOČANJE
AKTIVNOSTI VON WILLEBRANDOVEGA FAKTORJA V PLAZMI
PO DODATKU RISTOCETINA**

**INTRODUCING AGGLUTINATION METHOD FOR
DETERMINATION OF ACTIVITY OF VON WILLEBRAND
FACTOR IN PLASMA AFTER APPENDIX OF RISTOCETIN**

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljala v Specializiranem hematološkem laboratoriju kliničnega oddelka za hematologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Tadeja Pajiča univ. dipl. ing. kem. ing. spec. med. biokem.

Zahvala

Mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. Biokemije in somentorju asist. dr. Tadeju Pajiču, spec.med.biokem. za strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvala gre tudi Valeriji Bogovčič, Slavici Markač in Ani Mramor, ki so me skrbno uvedle v laboratorijsko delo in mi pomagale ter usmerjale pri vseh nastalih težavah.

Posebna zahvala tudi vsem mojim najdražjim za potrpežljivost, spodbudne besede, modre nasvete in vso njihovo podporo.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. Biokemije in somentorstvom asist. dr. Tadeja Pajiča, spec.med.biokem.

Ljubljana, september 2010

Nataša Kraljič

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Albin Kristl

Član diplomske komisije: doc. dr. Lucija Peterlin Mašič

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM SLIK, PREGLEDNIC, TABEL IN SHEM	IV
1 UVOD	1
1.1 HEMOSTAZA	1
1.1.1 Primarna hemostaza.....	5
1.1.2 Sekundarna hemostaza	6
1.2 MOTNJE HEMOSTAZE	9
1.2.1 Motnje primarne hemostaze	9
1.2.2 Motnje sekundarne hemostaze.....	10
1.3 VON WILLEBRANDOVA BOLEZEN	11
1.3.1 Zgodovina.....	11
1.3.2 Epidemiologija	11
1.3.3 Dedovanje	12
1.3.4 Molekularna struktura vWF	12
1.3.5 Sinteza, skladiščenje in izločanje vWF	14
1.3.5.1 Weibel-Paladijeva telesca.....	14
1.3.5.2 ADAMTS 13	15
1.3.6 Biološka aktivnost vWF	16
1.3.7 Klasifikacija von Willebrandove bolezni	18
1.3.8 Klinična slika vWB	20
1.3.9 Laboratorijsko preiskovanje	21
1.3.9.1 Presejalne preiskave	21
1.3.9.2 Specialne preiskave	21
1.3.10 Zdravljenje.....	23
2 NAMEN DELA	24
3 MATERIALI IN METODE	25
3.1 METODA	25
3.2 PRINCIP METODE	26
3.2.1 Izris aglutinacijske krivulje in določanje vrednosti naklonov	30
3.2.2 Risanje umeritvene krivulje.....	31
3.2.3 Končne vrednosti aktivnosti von Willebrandovega faktorja	32
3.3 APARATI IN PRIBOR	33
3.4 PREISKOVANCI	34
3.5 ODVZEM VZORCEV	34
4 DELO	35
4.1 RAVNANJE Z VZORCI PO ODVZEMU	35
4.2 REAGENTI ZA AGLUTINACIJO TROMBOCITOV Z RISTOCETINOM	35
4.2.1 Priprava ter shranjevanje reagentov in kontrol.....	36

4.2.2 Sheme pipetiranja reagentov, kontrol in preiskovanih vzorcev	37
4.2.2.1 Serijsko redčenje referenčne plazme	37
4.2.2.2 Priprava kontrolne plazme v referenčnem območju.....	38
4.2.2.3 Priprava vzorca bolnika	38
4.2.3 Testiranje	39
5.1 UMERITVENI DIAGRAMI.....	42
5.2 IZSLEDKI TESTIRANJ.....	43
6 SKLEP.....	50
7 VIRI.....	51

POVZETEK

Von Willebrandova bolezen spada med najpogosteje podedovane motnje koagulacije. Z ozirom na to ter upoštevajoč heterogeno naravo bolezni, njeno odkrivanje in klasifikacija nista preprosta, saj so posamezniki, ki imajo življenjsko ogrožajoče krvavitve redki.

Preiskave, ki jih uporabljamo pri ugotavljanju in klasifikaciji von Willebrandove bolezni, se izvajajo stopenjsko. Metoda izbora, ki jo uporabljamo pri opredelitvi von Willebrandove bolezni, je določanje aktivnosti von Willebrandovega faktorja v pacientovi plazmi. VWF omogoča povezavo med receptorjem GPIb/GPIX trombocita in receptorjem na površini endoteljske celice. VWF, ki je prost v plazmi, se ne veže na GPIb/GPIX, kadar ne dodamo antibiotika ristocetina.

Preiskave morajo biti izvedene na način, ki zagotavlja dolgoročno kakovost rezultatov. Reagenti za agregacijo trombocitov z ristocetinom, s katerimi opredelimo tip oziroma podtip bolezni, so zelo občutljivi na okoljske dejavnike (temperaturo, raztapljanje, mešanje); to pa se nemalokrat izrazi tudi v ponovljivosti metode in nenazadnje na samem rezultatu preiskave.

V okviru diplomskega dela smo ovrednotili ponovljivost pri novo vpeljani metodi, ki naj bi po navodilih proizvajalca zagotavljala bolj optimalne rezultate preiskav za ocenitev tipa in podtipa von Willebrandove bolezni. K vpeljavi in oceni primernosti metode smo pristopili z določitvijo aktivnosti von Willebrandovega faktorja pri 5-ih bolnikih z že potrjeno boleznijo. Razpon starosti je bil od 19 do 37 let, povprečna vrednost pa 27,8.

Ponovljivost znotraj serije smo določili z meritvami dveh vzorcev z osemkratnimi ponovitvami testiranj za vsakega, za tri vzorce pa smo v tripletu določili ponovljivost v treh serijah, izvedenih v treh zaporednih dnevih. Na ta način smo s koeficientom variacije opredelili ponovljivost v seriji in med serijami. Koeficient variacije pri prvem vzorcu je znašal 50%, pri drugem pa 33%. Povprečni koeficient variacije za oceno ponovljivosti med serijami je za prvi vzorec znašal 16%, za drugi 63% in za tretji vzorec 31%. Z metodo dosegamo visoko variabilne rezultate, ki predstavljajo resno omejitev tega testa.

ABSTRACT

Von Willebrand disease is one the most common inherited coagulation disorder. The heterogeneous nature of the disease makes its detection and classification not easy, as there are rare individuals who have life-threatening bleeding.

Clinical investigations of identification and classification of von Willebrand disease are conducted in steps. The method of choice, which is used in the definition of von Willebrand disease is determining the von Willebrand activity factor in patient's plasma. VWF as a protein is a connection between the platelet's GPIIb/IIIa receptor and a receptor on the surface of endothelial cells. VWF is free in the plasma and does not bind to GPIIb/IIIa when the antibiotic ristocetin is not added.

Investigations should be conducted in a manner that ensures long-term quality of the results. Reagents for platelet aggregation with ristocetin which identify the type and subtype of the disease are very sensitive to environmental factors (temperature, dissolving, mixing), which is often expressed as the repeatability of the method and at the very least the outcome of the investigation.

In the context of the thesis, we evaluated the reproducibility of the newly introduced method according to the manufacturer's instructions to provide more optimal results of investigations to assess the type and subtype of von Willebrand disease. In order to introduce and evaluate the suitability of the method we started by determining von Willebrand activity factor of 5 patients with confirmed disease. The age range was from 19 to 37 years and the average 27.8.

Within-run precision was determined by measurements of two samples of eight repetitions for each test,. Between-run precision was determined by the measurement of three samples repeatability in three runs conducted over three consecutive days. The coefficients of variation within-run in two separate runs were 50% and 33%, respectively. The coefficients of variation between-run were 16%, 63% and 31% in three different runs each day. The method produces highly variable results which constitute a serious limitation for this test.

SEZNAM OKRAJŠAV

<i>ADAMTS 13</i>	disintegrin in metaloproteinaza z trombospondinom tipa 1, 13
<i>ADP</i>	Adenozin difosfat
<i>AT</i>	antitrombin
<i>ATP</i>	Adenozin trifosfat
<i>DDAVP</i>	1-deamino-8-D-arginin-vasopresin
<i>GP</i>	glikoprotein
<i>GP 1b</i>	Glikoproteinski receptor
<i>HMWK</i>	kininogen z veliko molekulsko maso (high molecular weight kininogen)
<i>IgG</i>	Imunoglobulin razreda G
<i>PDGF</i>	rastni faktor trombocitov (platelet derived growth factor)
<i>TF</i>	tkivni faktor
<i>t-PA</i>	tkivni aktivator plazminogena
<i>TTP</i>	trombotična trombocitopenična purpura
<i>vWB</i>	von Willebrandova bolezen
<i>vWF</i>	von Willebrandov faktor
<i>WPt</i>	Weibel-Paladijeva telesca

SEZNAM SLIK, PREGLEDNIC, TABEL IN SHEM

<i>Slika 1:</i>	Morfologija trombocita
<i>Slika 2:</i>	Zgradba žilne stene
<i>Slika 3:</i>	Adhezija trombocitov in sekrecija iz zrn v citoplazmi
<i>Slika 4:</i>	Agregacija trombocitov
<i>Slika 5:</i>	Sekundarna hemostaza
<i>Slika 6:</i>	Pretvorba fibrinogena v fibrin
<i>Slika 7:</i>	Nastanek fibrinske mreže
<i>Slika 8:</i>	Mono in multimerna struktura von Willebrandovega faktorja
<i>Slika 9:</i>	Molekularna zgradba von Willebrandovega faktorja
<i>Slika 10:</i>	Weibel-Paladijevo telesce
<i>Slika 11:</i>	Molekularna struktura ADAMTS 13
<i>Slika 12:</i>	Delovanje kovinske proteinaze ADAMTS 13
<i>Slika 13:</i>	Receptorji na površini trombocita
<i>Slika 14:</i>	Mehanizem vezave GPIb in GPIIb/IIIa
<i>Slika 15:</i>	Strukturna formula ristocetina A
<i>Slika 16:</i>	Aglutinacija trombocitov
<i>Slika 17:</i>	Optični agregometer
<i>Slika 18:</i>	Prikaz sipanja svetlobe na trdnem delcu v suspenziji
<i>Slika 19:</i>	Aglutinacijska krivulja
<i>Slika 20:</i>	Naklonska črta na aglutinacijski krivulji in določitev dveh točk na njej
<i>Slika 21:</i>	Ročno narisana umeritvena krivulja na dvojno logaritemsko skalo
<i>Slika 22:</i>	Odčitavanje rezultatov na podlagi umeritvene krivulje
<i>Slika 23:</i>	Umeritvene krivulje

<i>Preglednica I:</i>	Klasifikacija von Willebrandove bolezni
-----------------------	---

<i>Tabela 1:</i>	Mednarodna nomenklatura koagulacijskih faktorjev
<i>Tabela 2:</i>	Izsledki testiranj za opredelitev ponovljivosti za dva vzorca v seriji
<i>Tabela 3:</i>	Izsledki testiranj za opredelitev ponovljivosti pri vzorcu 1 po izločitvi

	najbolj izstopajočih meritev
Tabela 4:	Izsledki testiranj za opredelitev ponovljivosti med serijami pri vzorcu 1 v vseh treh serijah meritev
Tabela 5:	Izsledki testiranj za opredelitev ponovljivosti med serijami pri vzorcu 2 v vseh treh serijah meritev
Tabela 6:	Izsledki testiranj pri vzorcu 2 v vseh treh serijah meritev po izločitvi najbolj izstopajočih meritev
Tabela 7:	Izsledki testiranj za opredelitev ponovljivosti med serijami pri vzorcu 3 v vseh treh serijah meritev
Tabela 8:	Izsledki testiranj pri vzorcu 3 v vseh treh serijah meritev po izločitvi najbolj izstopajočih meritev

Shema 1:	Diagnostični diagram
Shema 2:	Monokromator
Shema 3:	Dvožarkovni spektrofotometer
Shema 4:	Princip delovanja detektorja (fotopomnoževalke)
Shema 5:	Serijsko redčenje referenčne plazme za pripravo umeritvene krivulje
Shema 6:	Serijsko redčenje kontrolne plazme v referenčnem območju
Shema 7:	Redčenje vzorca bolnikove plazme

1 UVOD

1.1 HEMOSTAZA

Je odziv telesa na poškodbo krvne žile. Kri mora ostati v krvnih žilah tekoča, če pride do poškodbe pa se mora na mestu poškodbe strditi, saj je le na ta način preprečena nadaljnja krvavitev.

Hemostazo lahko opredelimo kot niz dogajanj in biokemičnih reakcij, ki zajema proces nastanka strdka in njegovo odstranjevanje ter obnovo prvotno poškodovane žile. Za nemoteno delovanje celotnega procesa skrbijo z usklajenim medsebojnim delovanjem:

- trombociti,
- žilna stena,
- koagulacijske in fibrinolitične beljakovine ter
- inhibitorji koagulacije in fibrinolize.

Krvavitev se začne zaustavljati takoj, ko je zaradi poškodbe, bolezni ali kakšnega drugega stresnega dejavnika prekinjena površina endotelijskih celic v žili (2).

Kri pride v stik s subendotelijskim slojem žile, na poškodovanem mestu nastane trombinski čep, kar opredelimo kot primarno hemostazo. V sekundarni hemostazi začnejo na poškodovanem mestu hitro nastajati tudi vlakna fibrina, ki učvrstijo trombinski čep, zato se ustavi krvavitev tudi iz večjih žil.

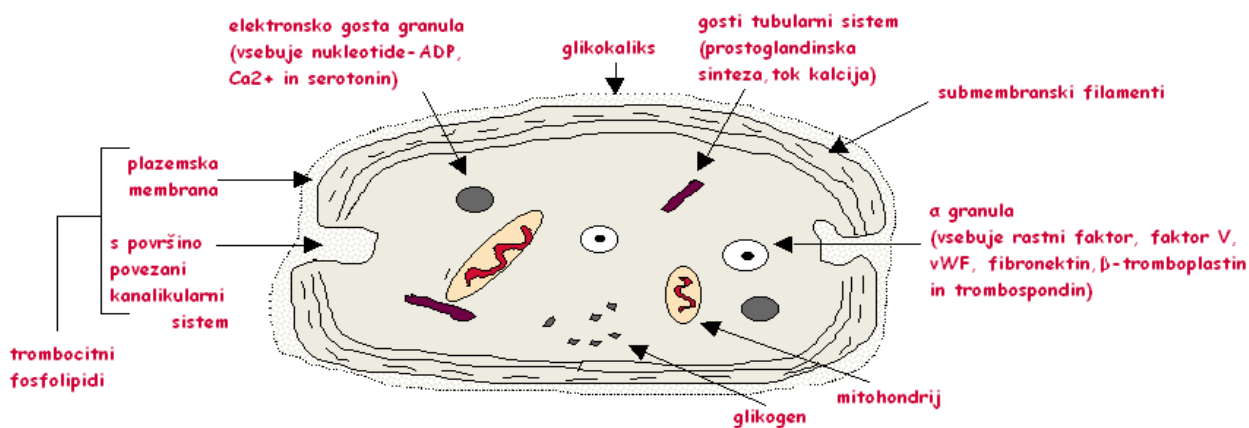
Številne podedovane in pridobljene bolezni povzročajo motnje v hemostazi, ki se kažejo kot motnje v strjevanju krvi (npr. von Willebrandova bolezen - vWB, hemofilija) ali motnje v prekomerni koagulaciji (nastanek strdkov) (2, 3).

• *Trombociti – nastanek in morfologija*

Trombociti nastanejo iz megakariocitov, največjih celic v kostnem mozgu. Megakariocit ima lobulirano jedro in v premeru od 30 do 100 μm . Na zgodnji stopnji razvoja megakariocita (megakarioblast) je celica majhna z zažetim jedrom, z endomitozo nastane poliploidno jedro, celica se veča (promegakariocit, megakariocit). Z zorenjem citoplazme

nastajajo zrnca (granule), mešički (vezikule) in sistem membran. Na matično celico, usmerjeno v megakariocitno – trombocitno vrsto, vplivajo različni rastni in diferenciacijski dejavniki. Megakariociti po krvnem obtoku zapustijo kostni mozeg ter se zagostijo v pljučih in kapilarah. Tu nastanejo trombociti z razpadom robnega dela megakariocitne citoplazme (2).

Na površini opazimo plašč, sestavljen iz različnih beljakovin, membrana celice je troslojna. Celično ogrodje, ki omogoča vzdrževanje in spreminjanje oblike sestavljajo membranski filamenti. V celici so mitohondriji, lizosomna zrnca s kislimi hidrolazami, gosta zrnca s kalcijem, ADP, ATP ter zrnca α , ki vsebujejo trombocitni faktor 4, fibrinogen, vWF (von Willebrandov faktor), trombospondin, FV, FXI, protein S in rastni faktor trombocitov (PDGF) in drugi. *Slika (1)*



Slika 1: Morfologija trombocita (povzeto po viru 42)

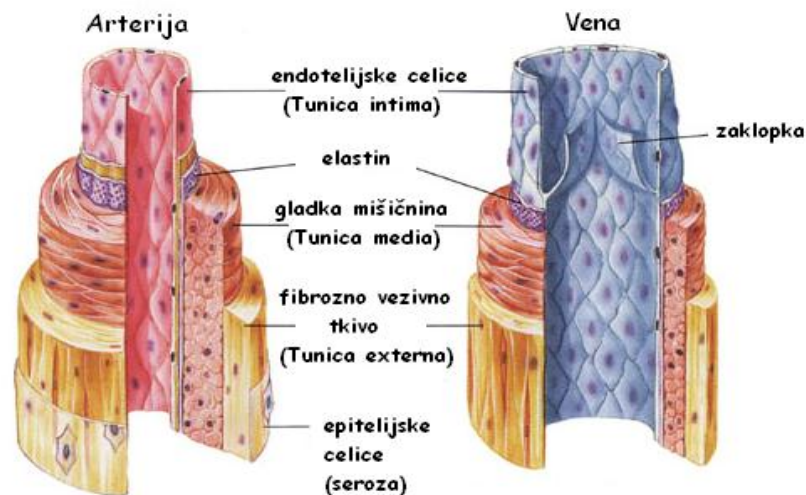
Normalno je v krvi 140 do 400 x 10⁹/ L trombocitov, ki so v mirujočem stanju diskoidne oblike. V krvnem obtoku preživijo od 8 do 10 dni; 40% se jih zadržuje v vraničnem krvnem obtoku, samo majhen del se jih porabi za zaustavljanje krvavit. Ostarele trombocite odstranijo makrofagi (2).

• **Žilna stena**

Žilna stena je zgrajena iz treh plasti:

- notranja plast – tunica intima (plast endotelijskih celic na bazalni membrani),
- srednja plast – tunica media (vsebuje elastično vezivo in gladko mišičje),
- zunanja plast – tunica adventitia (zgrajena iz veziva, ki žilo veže z okolico).

Endotelij žil predstavlja strukturno mejo, ki preprečuje prosto prehajanje krvnih celic in številnih snovi iz krvi v intersticij in obratno. Vendar žilni endotelij ne predstavlja le strukturne meje; s sintetiziranjem in sproščanjem številnih vazoaktivnih snovi je glavni regulator žilnega tonusa, pomembno sodeluje pri procesih preoblikovanja žilne stene in pri vzdrževanju občutljivega ravnovesja med koagulacijskim in fibrinolitičnim sistemom. V zdravih krvnih žilah je površina endotelijskih celic v lumnu neobčutljiva za adhezivne sestavine krvi (7, 8). (Slika 2)



Slika 2: Zgradba žilne stene (povzeto po viru 51)

• **Koagulacijske in fibrinolitične beljakovine**

Koagulacijski sistem sestavljajo beljakovine, poleg njih pa tudi prekalikrein, kininogen z veliko molekulsko maso (high molecular weight kininogen - HMWK), lipoproteini in kalcijevi ioni, ki v zaporedju encimskih reakcij (kaskadah) omogočajo nastanek trombocitnega strdka (16).

Označujemo jih z rimskimi številkami, obenem pa lahko uporabljamo tudi stare nazive:

<i>Oznaka</i>	<i>Ime faktorja</i>	<i>Oznaka</i>	<i>Ime faktorja</i>
<i>I</i>	fibrinogen	<i>VIII</i>	antihemofilni globulin, antihemofilni faktor A
<i>II</i>	protrombin	<i>IX</i>	Christmasov faktor, antihemofilni faktor B
<i>III</i>	tkivni faktor, tkivni tromboplastin	<i>X</i>	Stuart-Prowerjev faktor, Stuartov faktor
<i>IV</i>	kalcij	<i>XI</i>	antihemofilni faktor C
<i>V</i>	proakcelerin, labilni faktor, globulin Ac	<i>XII</i>	Hagemanov faktor
<i>VI</i>	ne obstaja	<i>XIII</i>	fibrin stabilirajoči faktor, Laki-Lorandov faktor
<i>VII</i>	prokonvertin, stabilni faktor		

Tabela 1: Mednarodna nomenklatura koagulacijskih faktorjev

(povzeto po viru 16)

Večina koagulacijskih beljakovin nastane v jetrih, nekatere pa tudi v makrofagih, megakariocitih, trombocitih in endotelijskih celicah. Koagulacijske beljakovine – tkivni faktorji so v krvnem obtoku v neaktivni obliki – proencimi (FXII, FXI, FX, FIX, FVII, FII). Ker pretvorba proencima v encim ne zadošča, da bi reakcija potekla, je potreben za ustrezno delovanje še kofaktor (FV, FVIII), ki nima lastnosti encima, omogoča pa, da encim prepozna substrat, da se reakcije vršijo na površini celic, specifičnost encima in njegovo večjo učinkovitost. Tako – aktivno obliko faktorja označimo z malo črko a (2).

• **Inhibitorji koagulacije in fibrinolize**

Delovanje koagulacijskega sistema uravnavajo inhibitorji aktivnih encimov (antitrombin - AT, protein C - PC, protein S - PS). Njihovo delovanje je zlasti pomembno v krvnem obtoku, saj omogočajo, da je nastajanje krvnega strdka omejeno na mesto poškodbe.

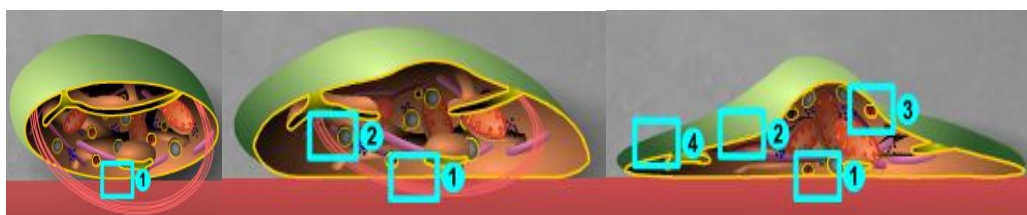
Pri jetrnih boleznih je okvarjena sinteza mnogih koagulacijskih faktorjev. Zmanjšana je koncentracija zaviralcev, ki v hemostatskih procesih zavirajo koagulacijo, zvišana pa je koncentracija zaviralcev, ki zavirajo fibrinolizo: Alfa₂-makroglobulin, Alfa₁-antitripsin (27). Med inhibitorje koagulacije uvrščamo tudi PAI-1 (plazminogen aktivator inhibitor-1), ki inaktivira protein C v aktivirani obliki in zato tudi vpliva na fibrinolizo. Podedovano ali pridobljeno pomanjkanje ali pomanjkljiva aktivnost inhibitorjev, kot so AT, PC, PS in drugih ima lahko za posledico trombofilijo (nagnjenost k trombozi) (16).

1.1.1 Primarna hemostaza

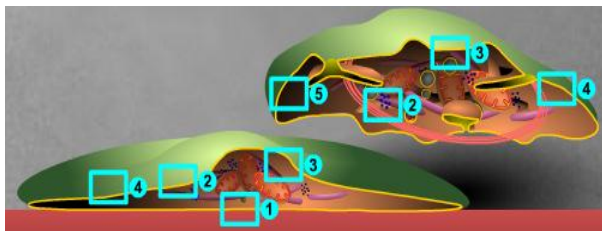
Je proces nastanka trombocitnega strdka na mestu poškodbe žilne stene, pri katerem sodelujejo trombociti in žilna stena.

Ko je žilna stena in s tem tudi endotelijske celice v njej zaradi mehanske poškodbe ali bolezni prekinjena in pride zaradi tega do stika krvi s subendotelijskim slojem, se začnejo na poškodovanem mestu ob prisotnosti vazokonstrikcije zbirati trombociti in sproščati aktivne snovi ter receptorje za vezavo faktorjev koagulacije, tako nastaja trombinski čep (16). Primarno hemostazo v kateri torej odločilno vlogo igrajo trombociti, katerih število in funkcija morata biti ustrezna, bi lahko v grobem razdelili na tri poglobitve dogodke:

- **adhezijo trombocitov** (sprijemanje trombocitov za kolagen v subendotelijskih tkivih in žilni steni), ki privede tudi do spremembe oblike trombocita in reorganizacije njegovega citoskeleta (*Slika 3; faza 1 in 2*),
- **sekrecijo iz zrn v citoplazmi** (gostih zrn, zrn α in lizosomov) in **izpostavitve receptorjev** na površini trombocita (*Slika 3; faza 3*),
- **agregacijo trombocitov** (medsebojno zlepljanje trombocitov) zaradi sproščenih produktov trombocita v prejšnjih fazah (2, 4). (*Slika 4; faza 4, 5 in 6*)



Slika 3: Adhezija trombocitov in sekrecija iz zrn v citoplazmi (povzeto po viru 40)



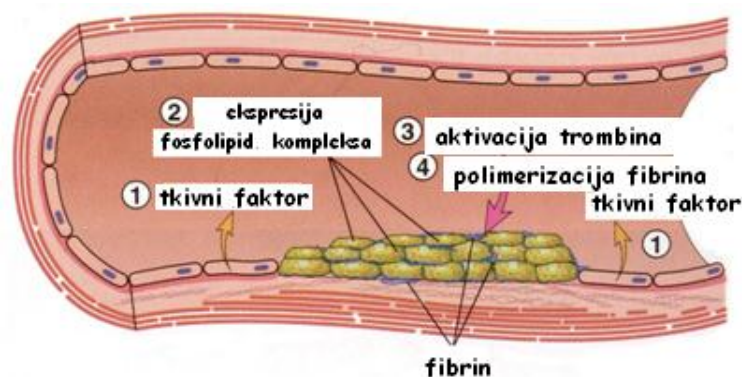
Slika 4: Agregacija trombocitov (povzeto po viru 40)

1.1.2 Sekundarna hemostaza

Osnova sekundarne hemostaze in vivo je niz reakcij, ki jih imenujemo kaskada, v kateri en faktor aktivira drugega, drugi tretjega, itd. Sekundarna in primarna hemostaza potekata sočasno, tudi koncept intrinzične in ekstrinzične poti velja za razlago in razumevanje dogodkov in vitro, s katerim lažje razložimo laboratorijske podatke. (Slika 5)

Sočasno z nastajanjem trombocitnega strdka nastaja tudi fibrin. Nastanek se sproži na dva načina, ki potekata sočasno, vendar ju zaradi lažjega razumevanja ločimo na notranjo in zunanjo pot:

- **poškodba žilnega endotelija** (*intrinzična pot* – notranji sistem) privede do procesa, ki se začne s kontaktno aktivacijo, kjer se aktivirata faktorja XII in XI na subendotelijskih strukturah, nato pa še FIX in FX. Faktor VIIIa (nima kofaktorskih lastnosti, dokler ga v aktivno obliko ne spremeni trombin) skupaj s fosfolipidi in kalcijem pospeši aktivacijo FX v FXa, za katero sta potrebna tudi kalikrein in visokomolekularni kininogen (HMWK) (3),
- **poškodba tkiva** (*ekstrinzična pot* – zunanji sistem) poteka preko FVII, ki je v majhnih koncentracijah vedno prisoten v krvi, saj pospešuje aktivacijo koagulacije. FVII se veže s tkivnim faktorjem (TF). Ta tvori skupaj s fosfolipidi tkivni tromboplastin. FV aktivira FIX in FX, slednji tvori s tkivnim faktorjem pospeševalno zanko, ki omogoča visoke aktivnosti FXa. FXa in FVa predstavljata protrombinazni kompleks-encimski kofaktorski kompleks, ki pretvarja FII (protrombin) v FIIa (trombin) (3).



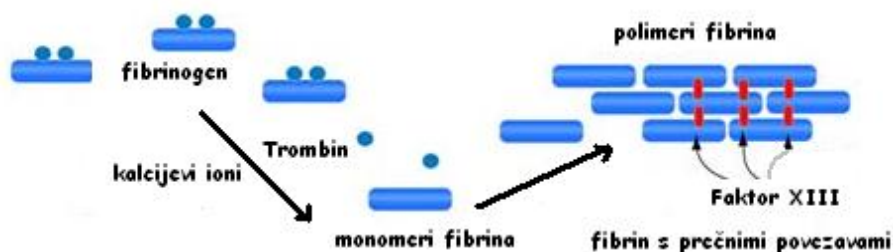
Slika 5: Sekundarna hemostaza (povzeto po viru 37)

Faktor Xa torej nastane po dveh poteh:

- Pri poškodbi tkiva (intrinzična pot in vitro) FXIIa katalizira pretvorbo FXI v FXIa, ta nato aktivira FIX. Šele zatem FIXa aktivira FX.
- Pri poškodbi žilnega endotelija (ekstrinzična pot in vitro) s katalitičnim kompleksom TF + FVIIa.

Končni encim koagulacijske kaskade je **trombin**, ki nastane iz proencima protrombina (FII), katerega pretvorbo sproži FXa ob prisotnosti FVa in Ca^{2+} . Za pretvorbo protrombina v trombin je potrebna negativno nabita celična površina s fosfolipidi. Molekularna konca faktorjev II in FXa se povežeta prek kalcijevih ionov na fosfolipide na površini celic. Kompleks, ki nastane cepi protrombin – *skupna pot*. Glavni učinek trombina je *pretvorba fibrinogena v fibrin*.

Fibrinogen je glavna sestavina strdkov in se sintetizira v jetrih. Sestavljen je iz dveh dimerov, vsak izmed njiju pa iz treh verig: α s peptidom A, β s peptidom B in γ . (Slika 6)



Slika 6: Pretvorba fibrinogena v fibrin pod vplivom trombina (povzeto po viru 40)

Te so med seboj povezane z disulfidnimi vezmi. Nastanejo monomeri fibrina, ki polimerizirajo v polimere fibrina, v obliki želatinastega strdka (fibrin brez prečnih povezav). Kataliza nastanka povezav FXIIIa povzroči, da strdek pridobi na trdnosti (fibrin s prečnimi povezavami). Ko fibrin opravi svojo vlogo se razgradi v procesu fibrinolize (2). (Slika 7)



Slika 7: Nastanek fibrinske mreže (povzeto po viru 31)

► **Fibrinolitični sistem**

Fibrinoliza je pomemben fiziološki mehanizem, ki razgrajuje fibrinske strdke in omejuje njihovo širjenje po tem, ko so že opravili svojo fiziološko vlogo. Fibrinoliza pomaga pri ponovni vzpostavitvi prehodnosti žil in nastane kot odgovor na poškodbe žile.

Fibrinolitični sistem se aktivira sočasno s koagulacijo. Endotelijske celice sprostijo tkivni aktivator plazminogena (t-PA), ki aktivira plazminogen v plazmin. Plazminogen kroži po krvi in se postopoma veže na nastajajoči strdek. Inhibitor alfa₂-antiplazmin inaktivira plazmin v obtoku. Plazmin tako ne more hidrolizirati fibrinogena in koagulacijskih faktorjev zunaj strdka. Plazminogen je specifično adsorbiran na fibrin in fibrinogen prek lizina. Ker ima fibrin specifična mesta za vezavo aktivatorjev plazminogena (fibrinogen jih nima), je le malo plazminogena aktiviranega brez fibrina, kar pomeni, da je fibrinolitični sistem aktiviran v prisotnosti fibrina.

Plazmin lahko razgradi fibrinogen v fibrin v t.i. razgradne produkte. Plazmin razgradi fibrinogen v fragment X, peptid B in zunanji končni del verige A alfa. Plazmin razgradi

fibrin brez prečnih povezav. Nastanejo podobni produkti kot pri razgradnji fibrinogena, le da nimajo peptida A in B, ker ju je že odcepil trombin.

Pri obsežnih poškodbah tkiva in nekaterih rakavih boleznih se v krvni obtok sprost velika količina t-PA. Inhibitor alfa₂-antiplazmin ne inaktivira v celoti nastalega plazmina. Zato posledično plazmin razgradi fibrinogen, fibrin, FV in FVIII, zato nastane nagnjenost h krvavitvam in krvavitve (2,5).

1.2 MOTNJE HEMOSTAZE

1.2.1 Motnje primarne hemostaze

Motnje primarne hemostaze so posledica spremenjenega števila trombocitov in njihovega delovanja ter spremenjenih žil, kar lahko privede bodisi do krvavitve ali do tromboze. Motnje, ki pripeljejo do prvega ali drugega stanja so dedne ali pridobljene (2).

■ **Spremenjeno število trombocitov.** Sem uvrščamo trombocitopenije. To so vsa stanja pri katerih je število trombocitov v krvi manjše od normalnega – manj kot $140 \times 10^9 / L$. Če je število manjše kot $20 \times 10^9 / L$, so krvavitve pogoste, medtem ko pri številu trombocitov med 60 do $80 \times 10^9 / L$ in več običajno ni krvavitev, ravno tako se zmanjša tudi tveganje za krvavitve po operativnih posegih. Krvavitve niso vedno sorazmerne številu trombocitov, celo pri hudi trombocitopeniji spontane krvavitve niso nujno prisotne (2).

Vzroki za trombocitopenijo so:

- Zmanjšano nastajanje megakariocitov v kostnem mozgu zaradi okvare matične celice.
- Zvečan razpad in porabljanje trombocitov (npr. po transfuzijah trombocitov), zaradi avtoprotiteles (npr. zaradi virusnih bolezni). Povečan razpad opazamo tudi pri idiopatični trombocitopenični purpuri (2).

■ **Motnje delovanja trombocitov** so dedne ali pridobljene. Prve so redke in nastanejo zaradi nepravilnosti membrane trombocitov (npr. izguba funkcije glikoproteinskih receptorjev GPIb/IX za von Willebrandov faktor (vWF), ki omogoča adhezijo trombocitov), spremenjene sestave (npr. zmanjšana količina serotonina in nukleotidov v

gostih telescih) in števila granul, ter motenj aktivacije celice (dedno pomanjkanje aktivnosti ciklooksigenaze).

Pridobljene motnje so pogoste, nastanejo zaradi učinka zdravil ali spremembe trombocitov pri različnih boleznih (npr. kronična mieloična levkemija, pri kateri je poleg hipersplenizma (povečane vranice) in neučinkovite sinteze faktorjev strjevanja krvi lahko prisotna kronična diseminirana intravaskularna koagulacija).

■ **Žilne motnje** primarne hemostaze se od krvavitev zaradi trombocitopenije in motenj v delovanju trombocitov razlikujejo po tem, da so krvavitve prisotne pretežno v koži, medtem ko so pri ostalih dveh motnjah prisotne tudi v sluznicah. Krvavitve so posledica spremenjene kapilarne krhkosti, zlasti pri zvečanju tlaka in prepustnosti (2).

1.2.2 Motnje sekundarne hemostaze

Tu krvavitev ali nagnjenost h krvavitvi nastane zaradi pomanjkanja ali pomanjkljive aktivnosti koagulacijskih faktorjev ali zaradi prisotnosti protiteles z lastnostjo inhibitorja. Pomanjkanje ali pomanjkljiva aktivnost koagulacijskih faktorjev je prirojena ali pridobljena. Slednja nastane zaradi bolezni jeter ali zdravil. Sintezo koagulacijskih faktorjev (FII, FVII, FIX in FX) v jetrih omogoča karboksilaza, odvisna od vitamina K. Zdravila – antagonisti vitamina K zavirajo delovanje karboksilaze, zaradi česar nastajajo neučinkovite beljakovinske molekule (2, 5).

1.3 VON WILLEBRANDOVA BOLEZEN

Von Willebrandova bolezen (vWB) je skupina dednih motenj, ki nastane zaradi motene primarne hemostaze von Willebrandovega faktorja, bodisi njegove odsotnosti, pomanjkanja ali motenj v delovanju. Zmanjšana je tudi aktivnost faktorja VIII. Posledica je lahko nagnjenost h krvavitvam ali krvavitve (2, 10).

1.3.1 Zgodovina

VWF je poimenovan po dr. Eriku Adolfu von Willebrandu, finskem zdravniku, ki je leta 1924 prvi opisal podedovano motnjo krvavitve pri družini iz Ålandovih otokov, pri kateri se je pojavljalo nagnjenje k mukoznim in podkožnim krvavitvam, vključno s pretirano dolgo in obilno krvavitvijo med menstrualnim ciklom (menoragijo). Kljub temu, da von Willebrand ni mogel ugotoviti osnovnega razloga takega pojava, je vWB razločil od hemofilije in drugih oblik bolezni, ker se je pojavljalo nagnjenje h krvavitvam.

Leta 1950 je bilo dokazano, da nastane vWB zaradi okvare plazemskega faktorja (in ne zaradi okvare trombocitov, kot se je sprva predvidevalo). Etiologija in patogeneza sta ostali nepojasneni vse do leta 1970, ko je Zimmerman ugotovil, da je v krvi nekaterih bolnikov z vWB znižana raven antigena vWF. Istega leta je bil protein vWF prvič izoliran, leto kasneje pa prvič dokazan z imunološko preiskavo. Ker sta FVIII in vWF v krvnem obtoku vezana v kompleks, so domnevali, da so dokazali del molekule FVIII. Tako do sredine sedemdesetih let niso ločili med obema proteinoma. Kar je v tistem času napisano za FVIII, se dejansko nanaša na kompleks FVIII/vWF (6, 10, 13, 14).

1.3.2 Epidemiologija

VWB je skupaj s hemofilijo A najpogosteje podedovana motnja koagulacije krvi zaradi kvantitativne ali kvalitativne okvare vWF. Podatki o pojavnosti vWB so različni in odvisni od diagnostičnih meril za vWB.

Rodeghiero je v epidemiološki študiji ugotavljal, da znaša prevalenca lahkih in zmernih oblik 0,82%, drugi so ugotavljali celo prevalenco 1-2%. Najpogostejši je tip 1, ki se pojavlja v več kot 70-80%, ostali bolniki imajo večinoma tip 2 (10-15%), medtem ko ima

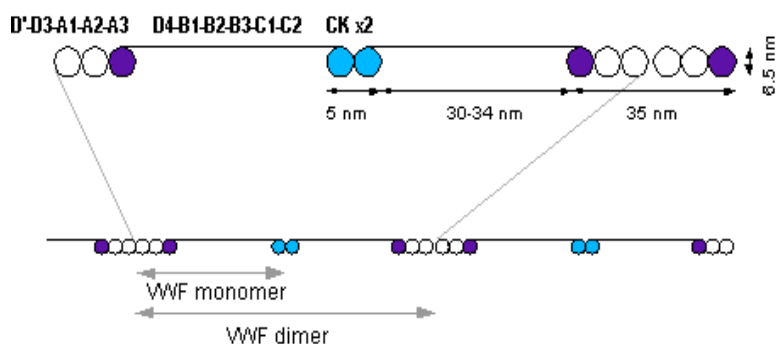
tip 3 vWB le 3 do 5 bolnikov na milijon prebivalcev. Tip 1 vWB ima variabilno ekspresivnost, ki je v glavnem posledica več genetskih in okoljskih dejavnikov. Zaradi tega ima kljub veliki prevalenci v splošni populaciji le približno 100 oseb z vWB na milijon prebivalcev pomembne krvavitve, ki zahtevajo zdravljenje. Kljub enakomerni razporeditvi bolezni med spoloma pa v registrih bolnikov z vWB prevladujejo ženske. V življenju žensk namreč nastopajo dogodki, pri katerih se vWB lahko klinično prej izrazi (9, 11, 14, 17).

1.3.3 Dedovanje

Bolezen se deduje avtosomno recesivno (tip 2N in tip 3) ali dominantno; torej obolevajo ženske in moški. Bolniki – heterozigoti imajo en normalen in en nenormalen alel, zaradi česar je zmanjšana koncentracija vWF ali pa gre za selektivno pomanjkanje srednje velikih ali velikih multimerov. Gen, ki nosi zapise za sintezo vWF, se nahaja na vrhu kratkega kromosoma 12 (12p13.2) in vsebuje 178 Kb ter 52 eksonov. Ker ima gen za vWF različno prodornost in ekspresijo, je težko razlikovati med zdravimi in obolelimi potomci staršev z vWB. Značilno za bolezen je tudi, da je nagnjenost h krvavitvam lahko različna pri članih iste družine, pri bolniku pa se sčasoma tudi spreminja. Večina primerov vWB je podedovanih, nepravilnosti so lahko tudi pridobljene. Tak primer je sindrom Heyde, kjer zaradi stenoze aortne zaklopke vWF povzroča gastrointestinalne krvavitve (2, 10, 12, 15, 16, 17).

1.3.4 Molekularna struktura vWF

VWF je plazemski glikoprotein, ki se sintetizira v endotelijskih celicah in megakariocitih. Osnovna enota (monomer) z molekulsko maso 26 000 tvori najprej dimere in nato polimere z molekulsko maso od 500 000 do 20 000 000. Veliki polimeri imajo številna vezavna mesta za trombocite in druge celice in so zato funkcijsko bolj učinkoviti od manjših polimerov (5). (*Slika 8*)



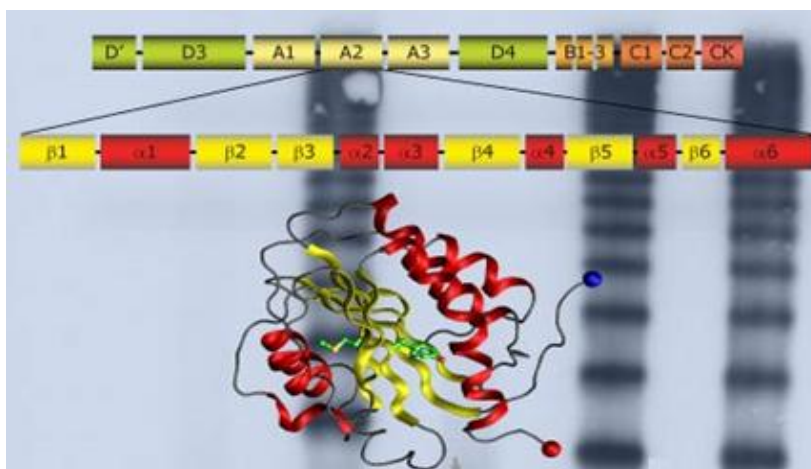
Slika 8: Mono in multimerna struktura von Willebrandovega faktorja (povzeto po viru 39)

Primarna produkcija gena za vWF je 2.813 aminokislin. Zgrajen je iz:

- signalnega peptida (22 ak),
- velikega propeptida (741 ak),
- dozorele podenote (2.050 ak) – osnovni monomeri.

Vsak osnovni monomer vsebuje veliko domen (D1, D2, D', D3, A1, A', A3, D4, B, C1, C2), ki imajo specifične funkcije:

- D'/ D3 domena omogoča vezavo s F VIII,
- A1 domena omogoča vezavo z:
 - receptorjem GP Ib trombocita,
 - heparinom,
 - kolagenom,
- A3 domena se veže s kolagenom,
- C1 domena v kateri se glicin veže s trombocitnim integrinom, ko je le-ta aktiviran (15, 17). (Slika 9)



Slika 9: Molekularna zgradba monomerne enote vWF (povzeto po viru 33)

1.3.5 Sinteza, skladiščenje in izločanje vWF

Sinteza vWF poteka pretežno v endotelijskih celicah, deloma pa v megakariocitih (trombocitih). V endotelijskih celicah se shranjuje v Weibel-Paladijevih telescih (WPt) v citoplazmi, v trombocitih pa v zrnih α .

Končna oblika dozorelega von Willebrandovega faktorja je rezultat zaporedja številnih procesov, ki se odvijajo vzdolž sekretorne poti. Nedožorela aminokislina se premika vzdolž sekretorne poti endotelijskih celic. Monomeri – osnovne enote vWF, se najprej uredijo v dimere in se v endoplazmatskem retikulumu n-glikozilirajo. Nato se v Golgijevem aparatu, kjer se tvori končna – multimerna oblika faktorja, povežejo preko prečnih disulfidnih vezi s cisteinom. Zaključek celotne sekretorne poti predstavljajo WPt, kjer je faktor v multimerni obliki in se tam tudi skladišči. Iz WPt, kjer je vskladiščenega približno 80 % vsega vWF, se ta izloča kontrolirano, medtem ko se iz trombocitnih zrn α , v katerih je moč najti 20% vWF, izloča šele po njihovi aktivaciji. (2, 15, 17). (Slika 7)

Koncentracija vWF v plazmi: 5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

1.3.5.1 Weibel-Paladijeva telesca

Weibel-Paladijeva telesca (WPt) sta prvič opisala znanstvenika Weibel in Palade leta 1964. Od takrat so glavni razpoznavni znak endotelijskih celic. (Slika 10)

Weibel-Paladijeva telesca so sekretorni organeli, ki služijo za skladiščenje produktov po sintezi v endotelijskih celicah. Poleg glavne sestavine (vWF) vsebujejo še celo paleto drugih bioaktivnih molekul, ki so potrebne za zadostitev hitrih kompleksnih odzivov v krvnih žilah. Število WPt in sestava njihove vsebine se razlikujeta med posameznimi endotelijskimi tkivi, katera imajo različno fiziološko funkcijo. So značilne cigaraste oblike, velikosti 1-6 μm , na katero vpliva predvsem skladiščen vWF. Ta hemostatični protein se iz WPt lahko sprosti izjemno hitro z eksocitozo, vendar le če je ta posredovana s strani aktivirane endotelijske celice.



Slika 10: Weibel-Paladijevo telesce (povzeto po viru 38)

Visokomolekularne oblike vWF (oblika niti), ki se po poškodbi vaskularne žile sproščajo v krvni obtok, so dolge lahko tudi nekaj milimetrov. Kot take so protrombotične molekule vWF preveč aktivne, zato jih na ustrezno velikost zmanjša kovinska (metalo) proteinaza ADAMTS 13 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin components). Molekule vWF z manjšo molekulsko maso se ravno tako izločajo v plazmo. Tiste, ki se izločajo apikalno pomagajo pri nastanku strdka in vezavi FVIII, bazalno izločane se vežejo na subendotelijski matriks ter tudi tako posredno vplivajo na stabilizacijo nastajajočega strdka (20).

1.3.5.2 ADAMTS 13

Monomeri vWF so med seboj povezani z disulfidnimi vezmi in tvorijo zelo velike multimerne z različnimi molekulskimi masami. Ti multimeri sodeljujejo pri adheziji in agregaciji trombocitov preko receptorjev GP Ib. Ker je vWF edini substrat za ADAMTS 13 le-ta razgradi zelo velike multimerne na mestu 842 Tyr-843 Met v A2 domeni vWF tako, da se tvori vWF z značilno multimerno sestavo. (Slika 12)

ADAMTS 13 je ena izmed 18 strukturno podobnih cink vsebujočih kovinskih proteinaz (encim). Gen za ADAMTS 13 se nahaja na kromosomu 9q34 in nastaja pretežno v jetrih. (Slika 11)



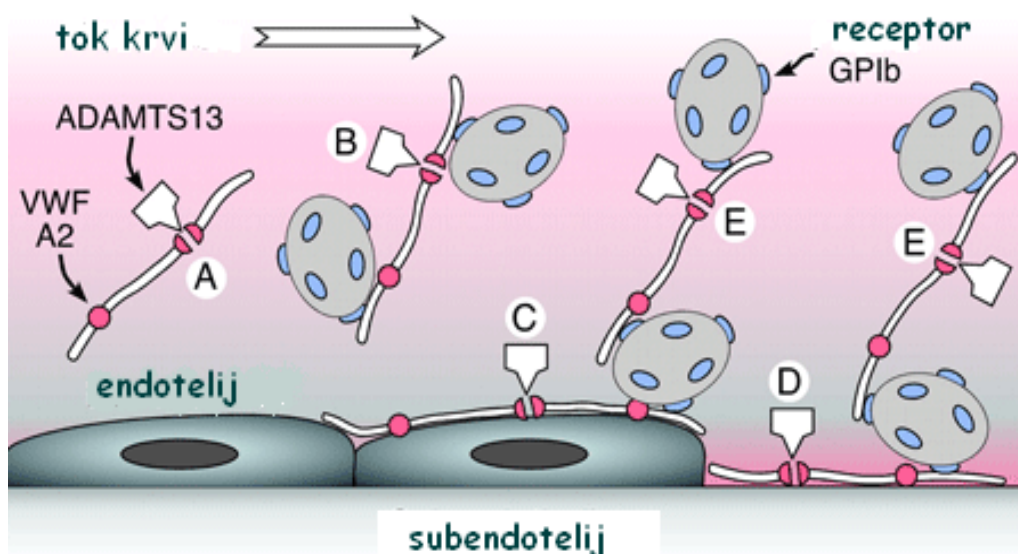
Slika 11: Molekularna struktura ADAMTS 13 (povzeto po viru 43)

Pri podedovani motnji v produkciji ADAMTS 13, kjer je prisotna mutacija alela na enem ali obeh kromosomih, je aktivnost ADAMTS 13 običajno pod 5%; podobno sledimo odsotno ali močno zmanjšano aktivnost tudi pri pridobljenih motnjah v delovanju ADAMTS 13, zaradi prisotnosti avtoprotiteles tipa IgG. Avtoprotitelesa inhibirajo aktivnost ali skrajšujejo življenjsko dobo ADAMTS 13. Nizke vrednosti ADAMTS 13 so

ugotovili tudi pri nosečnicah, novorojenčkih, bolnikih z jetrno boleznijo, razširjeno rakavo boleznijo, terapiji z DDAVP (1-deamino-8-D-arginine-vasopressin) ter kroničnimi metabolnimi in vnetnimi stanji.

Ob odsotnosti ali nezmožnosti delovanja ADAMTS 13 na površini endotelijskih celic in v krvnem obtoku ostajajo zelo veliki multimeri, ki se bolj učinkovito vežejo na receptorje GP Ib. To vodi v nastanek trombocitnih trombov, ki pri določeni velikosti embolizirajo. Primer takega pojava je trombotična trombocitopenična purpura (TTP).

Nasprotno pa pomanjkanje visokomolekularnih multimerov vWF (kot na primer pri tipih vWB 2A in 2B) rezultira kot motnja primarne hemostaze in obilnem krvavenju iz sluznic (21, 22, 24, 25).



Slika 12: Delovanje kovinske proteinaze ADAMTS 13 (povzeto po viru 32)

1.3.6 Biološka aktivnost vWF

Normalna hemostatska funkcija vWF je odvisna od obeh; tako od količine multimerov, kot tudi od sestave proteina.

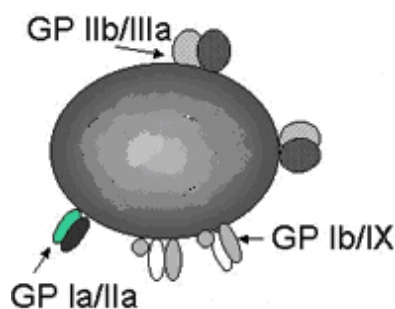
Von Willebrandov faktor ni encim in zato nima nobene katalitične aktivnosti. Njegova primarna funkcija je vezava na druge proteine; je eden redkih proteinov, ki nosi antigene AB0 sistema, ima pa tudi druge vloge med katerimi bi izpostavili:

- Vezavo na FVIII (vezani FVIII ima tako veliko daljše preživetje v krvnem obtoku kot nevezani, ker ga vWF varuje pred proteolizo. V kompleksu FVIII/vWF večino (98%) predstavlja vWF. Ta bimolekularni kompleks se veže na površino trombocitov. Tako je FVIII blizu drugim koagulacijskim faktorjem in trombin na ta način nastane lažje).
- Vezava na žilno steno.
- Vezava na kolagen, ko pride do poškodbe krvne žile.
- Vezava s heparinom.
- Vezava z GP Ib in GP IIb/IIIa.

→ Mehanizem vezave z glikoproteinskimi receptorji Ib in IIb/IIIa:

Na površini trombocitne membrane se nahajajo glikoproteinske molekule z lastnostmi receptorjev – GPIb/GP IX, GPIIb/IIIa. V kompleksu GPIb/GPIX delovanje GPIX ni znano. Receptor GPIIb/IIIa nastane kmalu po sintezi obeh kompleksov v endoplazmatskem retikulumu in se zatem prenese do celične membrane. (*Slika 13*) GPIIb/IIIa je receptor, ki je potreben za agregacijo trombocitov z vsemi agonisti (ADP, adrenalin, kolagen, trombin), ravno tako je tudi receptor za fibrinogen. Posledica sprememb v enem ali drugem delu kompleksa je moteno delovanje receptorja.

VWF se na eni strani veže z receptorjem GPIb na površini trombocita na drugi pa na žilno steno, s čimer je omogočena adhezija trombocitov na subendotelijski sloj žile. (*Slika 14*)

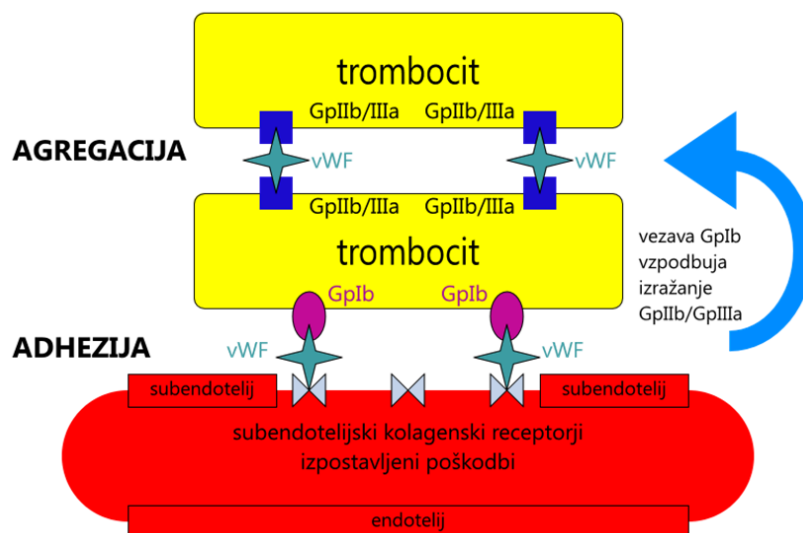


Slika 13: Receptorji na površini trombocita (*povzeto poviru 36*)

Po vezavi vWF na receptor Ib nastane aktivacija trombocitov s sekrecijo biološko aktivnih snovi v okolico. Tako pride do dodatnega zbiranja trombocitov in večanja skupka na tem

mestu (agregacije). Vezava vWF na receptor GPIIb/IIIa igra ključno vlogo pri adheziji trombocitov na žilno steno, ko je tok krvi hiter in je prisotna velika strižna napetost.

Posledica neučinkovitosti receptorja je motnja v nastajanju trombocitnega čepka na mestu poškodbe in krvavitev (2, 6, 10, 15, 18, 25).



Slika 14: Mehanizem vezave z GPIb in GPIIb/IIIa (povzeto po viru 34)

1.3.7 Klasifikacija von Willebrandove bolezni

Sistem klasifikacije vWB je bil sprejet leta 1994 in loči vWB z zmanjšano količino normalnega vWF (kvantitativna motnja) od vWB, pri kateri je spremenjeno le delovanje vWF (kvalitativna motnja). Pristop do klasifikacije je hierarhičen in predstavlja dve glavni ravni razdelitve: primarno (tip 1, 2 in 3) in sekundarno (podtip A, B, M in N). Namen take razdelitve je primarno vedno klinični; za lažje postavljanje diagnoze, zdravljenje in svetovanje bolnikom z von Willebrandovo boleznijo (14, 41). (*Preglednica I*)

- **Tip 1:** je najpogostejša oblika vWB. Klinični simptomi so lahki ali zmerni. Za končno diagnozo potrebujemo podatke o pojavljanju krvavitev pri preiskovani osebi in/ali pri družinskih članih ter nizko raven normalnega vWF. Tip 1 vWB težko dokažemo. Predvsem težko ločimo osebe z lahko obliko vWB od oseb, ki te motnje nimajo. Nekatere bolnike lahko zelo pozno odkrijemo ali sploh nikoli. Do 50% obveznih prenašalcev tipa 1 vWB je popolnoma brez znakov bolezni. Pogosto je pri ugotavljanju tipa 1 potrebnih več testiranj zapored, da dobimo jasen odgovor o poteku

bolezni, saj se raven vWF lahko dnevno spreminja (dejavniki okolja - 40%: starost, stres, nosečnost, menstruacija, zdravila in vnetje; ostalih 60% spreminjanja je posledica genetskih dejavnikov zunaj gena za vWF, od tega 30% zaradi krvnih skupin ABO). Najpomembnejša za diagnozo in zdravljenje tipa 1 vWB je klinična anamneza. Posamezniki s podobno ravni vWF imajo podobne klinične težave. Dodatno pa otežuje diagnozo tipa 1 vWB to, da se krvavitve precej pogosto pojavljajo tudi v normalni populaciji (obilna menstruacija - 44% žensk brez motenj strjevanja krvi, krvavitev iz nosu 5-36%, krvavitev pri porodu 19,5-23%, po operaciji 6%, krvavitev iz majhnih ran v 2%) (14).

○ **Tip 2** je zelo heterogena skupina kvalitativnih motenj. Klinične težave so lahke, zmerne ali težke. Deli se v naslednje podtipe:

- Podtip 2A je najpogostejši podtip. Multimerična struktura vWF ni normalna zaradi izgube velikih multimerov in povečane intenzitete multimerov z nizko molekularno maso.
- Podtip 2B ima povišano afiniteto za trombocitni GPIb. Ta tip moramo ločiti od *Psevdo vWB*, t.j. prirojene motnje trombocitov s povečano afiniteto za vWF.
- Podtip 2M je poseben tip vWB, pri katerem je motena vezava vWF na trombocite.
- Pri podtipu 2N je zaradi nenormalnosti vWF motena vezava na FVIII. Razpolovna doba FVIII je zato skrajšana, njegova aktivnost pa običajno le med 0,03 in 0,12 E/mL. Bolezen lahko zamenjamo s klasično hemofilijo (10, 14).

○ **Tip 3** je težka oblika vWB. 10-15% bolnikov, pri katerih težko obliko tipa 3 vWB povzroča delecija gena za vWF, je nagnjenih k pojavu aloprotiteles (inhibitorjev) proti vWF. Protitelesa povzročijo slabo učinkovitost nadomestnega zdravljenja. Če so prisotna v visoki koncentraciji, nadomestno zdravljenje ni le neučinkovito, ampak sproži celo življenje ogrožujočo anafilaktično reakcijo zaradi tvorbe imunskih kompleksov. Bolniki imajo pogoste sluznične in kožne krvavitve. Podobno kot pri bolnikih s hemofilijo se pri bolnikih z vWB pojavljajo krvavitve v sklepe, mišice in hematomi. Vzrok je motena biosinteza vWF (14).

Pridobljeni von Willebrandov sindrom je redka pridobljena motnja v strjevanju krvi, za katero je značilen podaljšan čas krvavitve, znižana raven antigena (vWF:Ag), znižana

aktivnost vWF ristocetinskega kofaktorja (vWF: Rco) in raven aktivnosti FVIII. Zdi se, da se pretežno pojavlja v povezavi z novotvorbami in imunskimi boleznimi. Klinična slika je zelo različna. Krvavitve so lahko blage, težke, lahko pa celo ogrožajo življenje (14).

Preglednica I: Klasifikacija von Willebrandove bolezni (povzeto po viru 14)

<i>Tip</i>	<i>Opis</i>
Tip 1 (kvantitativen)	Znižana raven vWF; struktura in funkcija sta normalni
Tip 2 (kvalitativen)	Motnja v strukturi in funkciji vWF
Podtip 2A	Moteno delovanje vWF s trombociti zaradi odsotnosti visokomolekularnih multimer vWF
Podtip 2B	Povečana afiniteta vWF za trombocitni receptor GPIb, sledi izguba visokomolekularnih multimerov vWF
Podtip 2M	Zmanjšano delovanje vWF, vendar ne zaradi odsotnih velikih multimer vWF
Podtip 2N	Znižana aktivnost FVIII, ker je motena vezava vWF na FVIII
Tip 3 (kvantitativen)	Nedoločljiva raven vWF

1.3.8 Klinična slika vWB

Bolniki so lahko od otroške dobe naprej nagnjeni h krvavitvam lahke, zmerne ali težke stopnje, kar je običajno v odnosu s stopnjo spremembe vWF. Pri postavitvi klinične slike pomaga anamneza, ki je nujna in vedno ključnega pomena za oceno, ali gre za motnjo v hemostazi in ali je ta prirojena ali pridobljena. Iz tega bo izhajala tudi zdravnikova odločitev o vrsti laboratorijskega preiskovanja.

Nagnjenost h krvavitvam se lahko kaže z različnimi simptomi, npr. krvavitvami v sluznice, mišice in sklepe, po poškodbi ali po kirurškem posegu. Najbolj pogoste so sluznične krvavitve (nosna sluznica, dlesen, obilne menstruacijske krvavitve, poporodne krvavitve do 35. dne, krvavitve v prebavila) in hitro pojavljanje kožnih krvavitev. Pri težki obliki se zaradi nizke ravni FVIII lahko pridružijo še krvavitve v mišice ter podkožne krvavitve (2, 9, 10, 14, 28). Ker so ti simptomi podobni simptomom drugih bolezni, je potrebno vWB ločiti od:

- hemofilije,
- psevido ali trombocitnega tipa vWB, ki je funkcijska nepravilnost trombocitov,
- pridobljene vWB, ki nastane kot zaplet pri novotvorbah in pri prirojenih srčnih hibah) (16).

1.3.9 Laboratorijsko preiskovanje

Ob prej opisani klinični sliki in o podatkih o krvavitvah v družini in pri posamezniku se zdravnik odloči za nadaljnje preiskovanje. Obstaja več tipov vWB, in ker je znotraj posameznega tipa več podtipov bolezni, lahko laboratorijsko preiskovanje izvedemo stopenjsko – s presejalnimi in specialnimi preiskavami (10).

1.3.9.1 Presejalne preiskave

Med presejalne preiskave štejemo celotno krvno sliko, protrombinski čas (PČ), parcialni tromboplastinski čas (PTČ), trombinski čas (TČ), koncentracijo fibrinogena ter zapiralna časa (KOL/ADP in KOL/EPI). PTČ in zapiralna časa sta lahko podaljšana ali normalna. PČ in TČ sta normalna, število trombocitov je lahko znižano. Zapiralni čas je občutljiv za preiskovalno testiranje vWB, ni pa specifičen (10).

1.3.9.2 Specialne preiskave

Specialne preiskave za potrditev von Willebrandove bolezni delimo v dve skupini.

■ *specialne preiskave prvega izbora za potrditev vWB*

V tej skupini s preiskavami določimo antigen vWF (vWF:Ag), merimo aktivnost koagulacije FVIII (FVIII:C) in določamo funkcijo vWF. Funkcijo vWF ocenimo s preiskavami aktivnosti ristocetinskega kofaktorja (vWF:RCo) in vezalne sposobnosti na kolagen (vWF:CB).

Tip vWB opredelimo s kombinacijo presejalnih testov iz skupine zgoraj navedenih preiskav. Med (vWf:Rco) in (vWF:Ag) ter (vWF:CB) in (vWF:Ag) izračunamo razmerja. Pri običajni populaciji je povprečna mejna vrednost med obema razmerjema 0,7. Kombinacija obeh razmerij je uporabna za ločitev med tipoma 2 in 1 ter za odkrivanje oblik tipa 2 vWB (10).

- (*vWF:Ag*): Merjenje koncentracije vWF:Ag je zasnovano na uporabi heterolognih protiteles. Izvedemo ga lahko z encimsko imunskim načinom (ELISA) ali metodo lateksne aglutinacije (avtomatizirano na koagulacijskem aparatu). Ta preiskava je pomembna za takojšne razlikovanje tipa 3 od drugih tipov vWB, ker je pri tipu 3 nedoločljiva raven ali raven vWF pod 0,03 E/mL. Normalna prisotnost vWF:Ag ne pomeni vedno normalne aktivnosti vWF, ki jo klasično imenujemo ristocetinski kofaktor.

Referenčna vrednost vWF:Ag: 0,60 – 1,50 E/mL

- (*FVIII:C*): Koagulacijsko aktivnost FVIII (FVIII:C) določamo z merjenjem spremenjenega PTČ. VWF je specifični prenašalec FVIII, zato se sprememba v ravni vWF v plazmi odraža v spremembah FVIII:C.

Referenčna vrednost FVIII:C: 0,80 – 1,20 E/mL

- (*vWF:RCo*): VWF omogoča povezavo med receptorjem GP Ib/GP IX trombocita in receptorjem na površini endotelijske celice. VWF, ki je prost v plazmi, se ne veže na GPIb/GPIX, kadar ne dodamo antibiotika ristocetina. Te ugotovitve so osnova za test določanja aktivnosti vWF v plazmi (aktivnost ristocetinskega kofaktorja). Ker za vezavo ni potreben metabolično aktiven in aktiviran trombocit, lahko uporabimo fiksirane trombocite zdravega in ristocetin, ki ju dodamo k plazmi bolnika. Ristocetin sproži vezavo vWF v plazmi na GPIb/GPIX, to povzroči aglutinacijo. Aktivnost vWF:RCo je sorazmerna stopnji aglutinacije.

Referenčna vrednost vWF:Rco: 0,50 – 1,60 E/mL

- (*vWF:CB*): Preiskavo vezalne sposobnosti vWF za kolagen (vWF:CB; collagen-binding capacity) napravimo z encimsko imunskim testom ELISA. Plošče so prekrite s kolagenom tipa III, določamo sposobnost vezave vWF (iz bolnikove plazme) na kolagen. Primeren je za razlikovanje med tipoma 2A in 2M.

Referenčna vrednost vWF:CB: 0,50 – 4,00 E/mL

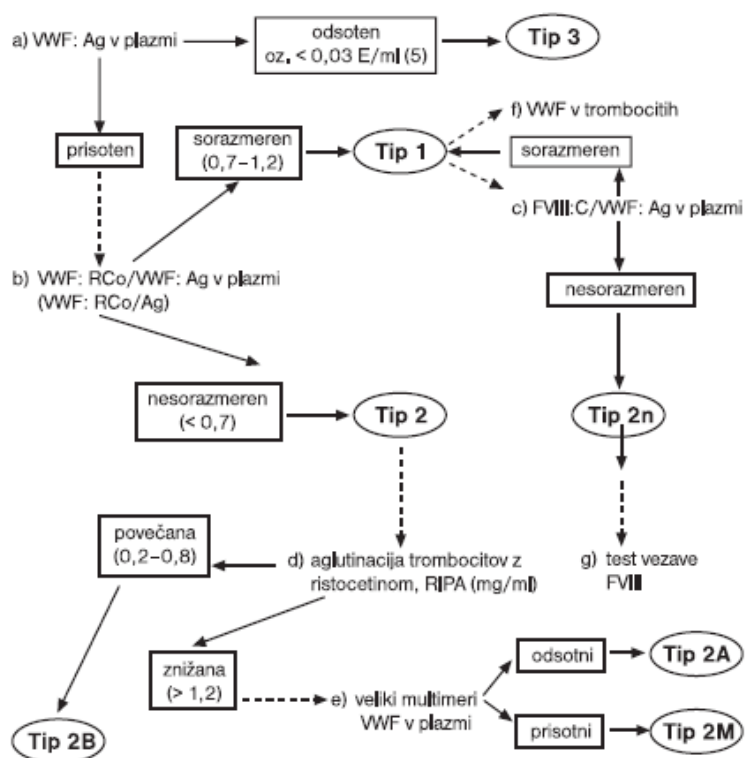
■ *Specialne preiskave drugega izbora za potrditev vWB*

Za opredelitev podtipov je potrebno napraviti še dodaten izbor preiskav, s katerimi lahko opredelimo podtipe tipa vWB 2 (podtipe 2A, 2B, 2M, 2N). Mednje uvrščamo določitev funkcije vWF z aglutinacijo bolnikovih trombocitov z ristocetinom, analizo sestave multimerov vWF in preiskavo, ki ocenjuje vezavo vWF na FVIII.

Izračun razmerja (FVIII:C) in (vWF:Ag) uporabimo pri potrditvi tipa 2N (10, 14).

Pri opredelitvi bolezni si lahko pomagamo tudi z različnimi diagnostičnimi diagrami.

(Shema 1)



Shema 1: Diagnostični diagram (povzeto po viru 44)

1.3.10 Zdravljenje

Natančna opredelitev tipov in podtipov vWB je včasih težka, čeprav je ključnega pomena za izbiro pravega načina zdravljenja. Le-ta temelji na korelaciji dvojne nepravilnosti:

- pomanjkanja vWF,
- pomanjkanja FVIII.

Zdravila, ki se uporabljajo delimo v zdravila, ki povzročijo prehodni dvig koncentracije vWF (dezmopresin, FVIII-vWF) in zdravila, ki lahko pomagajo pri hemostazi (antifibrinolitiki, hormonska zdravila). Zdravljenje načrtujemo individualno; odvisno je od podtipa vWB in od mesta ter obsežnosti krvavitve oziroma vrste predvidenega posega.

- **Dezmopresin:** DDAVP (1-deamino-8-D-arginine-vasopressin) (14)

2 NAMEN DELA

Med pomembne laboratorijske preiskave za opredelitev von Willebrandove bolezni uvrščamo oceno aktivnosti von Willebrandovega faktorja (vWF:RCo). Po podatkih iz literature so izsledki preiskave zelo variabilni. Zato želimo opredeliti natančnost postopka s ponovljivostjo rezultatov vWF:RCo v seriji in med serijami meritev.

K vpeljavi in oceni primernosti metode bomo pristopili z določitvijo aktivnosti von Willebrandovega faktorja po priporočilih proizvajalca kompleta, ki jo bomo dobili iz izsledkov serijskih in medserijskih meritev bolnikov z že potrjeno boleznijo.

Iz izsledkov bomo izračunali povprečne vrednosti, standardni odklon in koeficient variacije, s katerim bomo opredelili ponovljivost rezultatov in s tem primernost uporabe metode za rutinsko delo.

3 MATERIALI IN METODE

Pri vpeljavi aglutinacijske metode za določitev aktivnosti von Willebrandovega faktorja v plazmi po dodatku ristocetina smo uporabili agregometer.

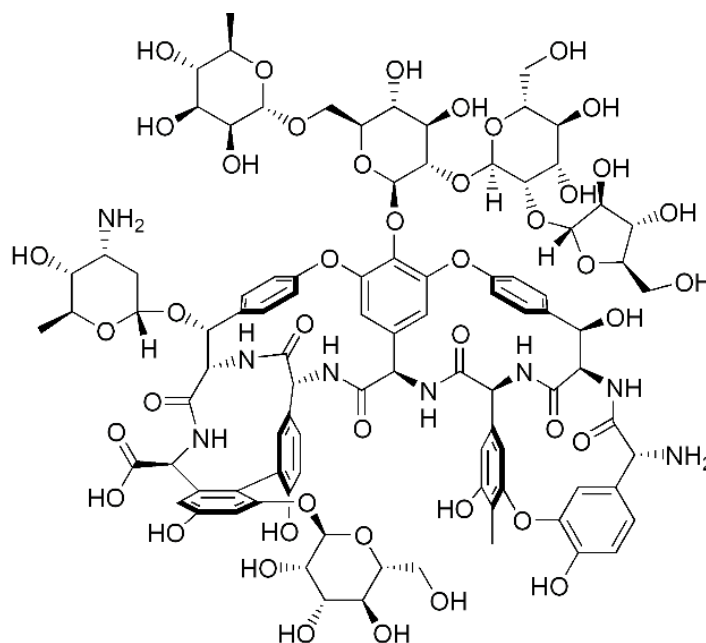
K delu smo pristopili z uporabo reagenčnega kompleta proizvajalca Helena Biosciences, Europe. Zanimala nas je ponovljivost v in med serijami, katero smo določili na podlagi testiranj plazme petih bolnikov z že opredeljeno von Willebrandovo boleznijo.

3.1 METODA

VWF omogoča povezavo med receptorjem GPIb trombocita in receptorjem na površini endotelijske celice.

Vir vWF katerega aktivnost želimo pri bolniku določiti je njegova plazma. Ker postopek izvajamo in vitro, potrebujemo tudi trombocite, ki so fiksirani s formalinom, zaradi česar je aktiven le receptor GPIb in mediator, ki vzpodbudi reakcijo. Le pod takimi pogoji bo lahko vWF v plazmi reagiral s trombociti oziroma njihovimi GP receptorji in bomo lahko kvantitativno določili aktivnost von Willebrandovega faktorja.

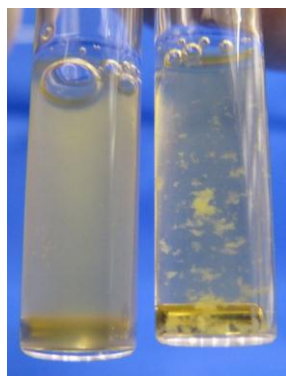
Ristocetin oziroma ristomicin je glikopeptidni antibiotik z molekularno formulo $C_{95}H_{110}N_8O_{44}$, ki ga proizvaja bakterija *Amycolatopsis lurida*. (Slika 15)



Slika 15: Strukturna formula ristocetina A (povzeto po viru 52)

Ristocetin (ristocetinski kofaktor – RCo) je mediator prvega izbora za aglutinacijo trombocitov. Obstajata dve obliki ristocetina, A in B.

Ristocetin A je bolj aktiven in se od ristocetina B razlikuje po številu glukoznih, manoznih in D-arabinoznih skupin na stranskih verigah. Sprva se je uporabljal za zdravljenje stafilokoknih okužb. Ker povzroča aglutinacijo trombocitov, koagulacijo krvi, in ker je toksičen, se v namene zdravljenja ne uporablja več (52). Nivo z ristocetinom vzpodbujene aglutinacije je povezan s koncentracijo vWF. (*Slika 16*)



Slika 16: Desna kiveta prikazuje aglutinate, ki nastanejo zaradi delovanja vWF na s formalinom fiksirane trombocite ob prisotnosti ristocetina (*povzeto po viru 35*)

Kvantitativna določitev aktivnosti von Willebrandovega faktorja je pomembna za postavitev diagnoze in pri spremljanju uspešnosti terapije pri bolnikih z že potrjeno boleznijo (10).

3.2 PRINCIP METODE

Optični agregometer (*Slika 17*), ki smo ga uporabili z namenom določitve aktivnosti von Willebrandovega faktorja, je pravzaprav spektrofotometer (*Shema 3*), ki za svoje delovanje uporablja infrardečo svetlobo. Predpona *infra* označuje frekvenco infrardečega valovanja, ki je pod frekvenco rdeče svetlobe, ta pa ima v spektru vidne svetlobe najnižjo frekvenco. Območje valovnih dolžin infrardečega valovanja sega prek treh velikostnih redov – od 700 nm do 1 mm (46).

Iz tega izhaja osnovni – turbidimetrični princip, ki meri prepuščeno svetlobo. Prepuščanje svetlobe se zniža zaradi odboja svetlobe in reakcije z delcem v raztopini. Turbidimetrični princip je bil opredeljen na osnovi dveh teorij: vse snovi v neki meri odbijajo (sipajo) svetlobo (John Tyndall, 1845); odbita svetloba potuje v določeni smeri (Rayleigh, 1871) (49).



Slika 17: Optični agregometer (povzeto po viru 47)

Na sipanje svetlobe vplivajo:

- velikost delca,
- valovna dolžina dovedene svetlobe,
- koncentracije delcev (46).

Svetloba iz vira pripotuje do monokromatorja. Monokromator je optična naprava, ki iz vhodnega širokega spektra svetlobe prepusti na izhod zelo ozek frekvenčni pas svetlobe.

Na vstopni reži monokromatorja vstopa polikromatska svetloba, ki potuje do kolimatorja; to je leča ali ogledalo, s katerim dobimo vzporedni žarek, ki pade na disperzijski element.

Prizma ali uklonska mrežica (disperzijski element) razprši polikromatsko sevanje. Nato žariščno zrcalo usmeri vso razpršeno svetlobo na izstopno režo, katera izbere valovno dolžino. (Shema 2)

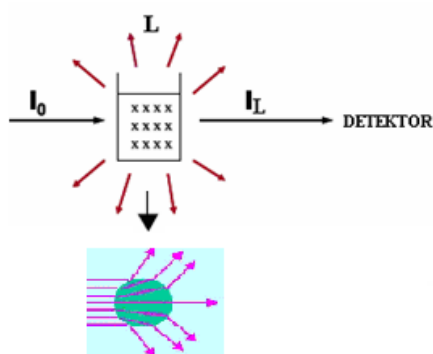
Iz monokromatorja izhajata dva žarka infrardeče svetlobe. Prvi žarek je usmerjen na kiveto, postavljeno na mesto PPP (Platelet Pure Plasma – plazma z nizko vsebnostjo trombocitov), v kateri je pripravljena referenčna suspenzija pufra in s formalinom

fiksiranih trombocitov. Drugi žarek je usmerjen na kiveto v kateri so prav tako fiksirani trombociti in ristocetin. To kiveto postavimo na mesto PRP (Platelet Rich Plasma – plazma z visoko vsebnostjo trombocitov) (46, 48).



Shema 2: Monokromator (povzeto po viru 46)

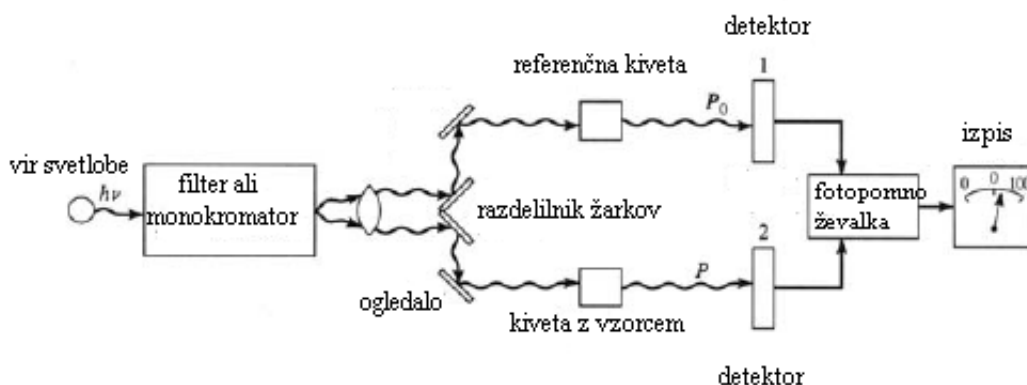
Suspenzija tako vzorčne kot referenčne kivete je motna in zato je količina razpršene svetlobe sorazmerna količini delcev v suspenziji. Tako je svetloba, ki preide suspenzijo napram začetni (vpadni) svetlobi oslABLJENA. (Slika 18) Prepustnost skozi obe kiveti je merjena sorazmerno (48).



Slika 18: Prikaz sipanja svetlobe na trdnem delcu v suspenziji (povzeto po viru 45)

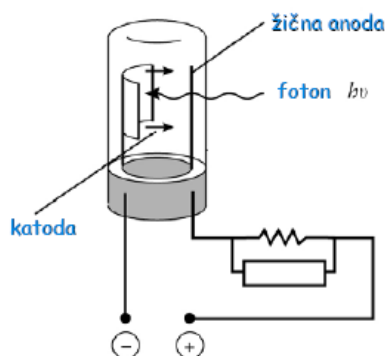
- I_0 je jakost začetnega žarka preden gre skozi suspenzijo
- L je dolžina optične poti skozi vzorec
- I_L jakost žarka, ki je že prešel skozi suspenzijo z delci

Po vstavitvi ustreznih kivet na določena mesta uravnamo bazno linijo in z njo nastavimo prepustnost svetlobe; za PPP 100% in za PRP 0%. Po dodatku pacientove plazme v kiveto na mestu PRP, se bodo začeli zaradi prisotnosti vWF tvoriti aglutinati, suspenzija se bo začela bistriti in skozi njo bo prehajalo več svetlobe. Povečanje prepustnosti žarka skozi suspenzijo je direktno sorazmerno količini nastalih aglutinativ (48).



Shema 3: Dvožarkovni spektrofotometer (*Povzeto po viru 46*)

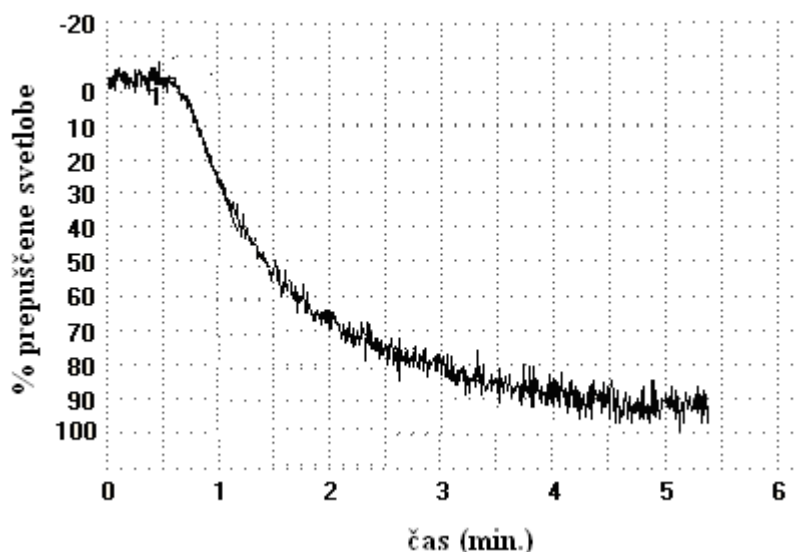
Do detektorja (fotopomnoževalke) pride samo svetloba pod kotom 0° , ki se na delcih v suspenziji ni razpršila. Prepušeni svetlobni signal na fotopomnoževalkah povzroči fotoelektrični efekt: foton, ki pade na katodo prekrito s posebno površino izbije elektron. Merimo tok, ki je sorazmeren številu fotonov, ki padejo na fotokatodo. (*Shema 4*) Tako se pretvori optični signal v električni (merljiv) signal (46).



Shema 4: Princip delovanja detektorja (fotopomnoževalke) (*povzeto po viru 46*)

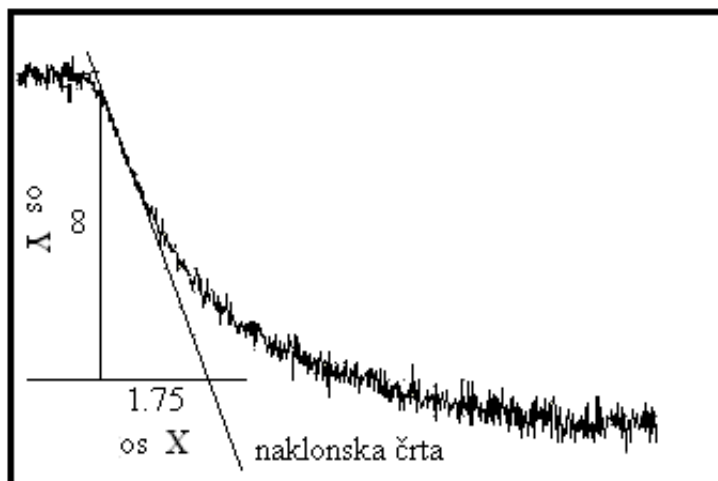
3.2.1 Izris aglutinacijske krivulje in določanje vrednosti naklonov

Svetlobni detektorji glede na količino prejetih fotonov spremenijo svojo upornost, kar posledično vpliva na jakost toka, ki teče skozi. Ob tem pride zaradi tvorbe aglutinativov v določeni časovni enoti do sprememb impedance detektorja (razmerja med napetostjo in tokom, ki teče skozi detektor), kar neprestano spremlja računalniški program in spremembe izriše v obliki aglutinacijske krivulje. (Slika 19)



Slika 19: Aglutinacijska krivulja (povzeto po viru 30)

Najpomembnejši parameter, ki ga program upošteva pri podajanju končnega rezultata meritve, je področje pod aglutinacijsko krivuljo. To je odvisno od višine aglutinacijske krivulje in od njenega naklona ter je tako najbolj primeren parameter za določanje vWF:RCo. Ravno iz podatkov o višini in naklonu aglutinacijske krivulje program izračuna še dva dodatna parametra. Aglutinacija predstavlja vrh krivulje (najvišji del krivulje), hitrost pa njen maksimalni naklon. Na ta način program določi največji linearni del krivulje, to je del, kjer reakcija narašča in se začne krivulja izrisovati takoj po dodatku bolnikove plazme, ob katerem nariše premico (naklonsko črto) (30, 53). (Slika 20)



Slika 20: Naklonska črta na aglutinacijski krivulji in določitev dveh točk na njej (povzeto po viru 30)

Na naklonski črti program izbere dve točki. Prva je na najvišjem delu (vrhu) krivulje, kjer se je aglutinacija začela in predstavlja dolžino Y (verikalne) osi. Dolžino X (horizontalne) osi pa določi z drugo točko, ki je na delu krivulje, nastalem po treh minutah meritve. (Slika 20) Naklon premice program izračuna tako, da obe izmerjeni vrednosti deli med seboj, dobljeni rezultat pa pomnoži z 10. Končno vrednost zaokroži na najbližje celo število.

Primer: Y = 8

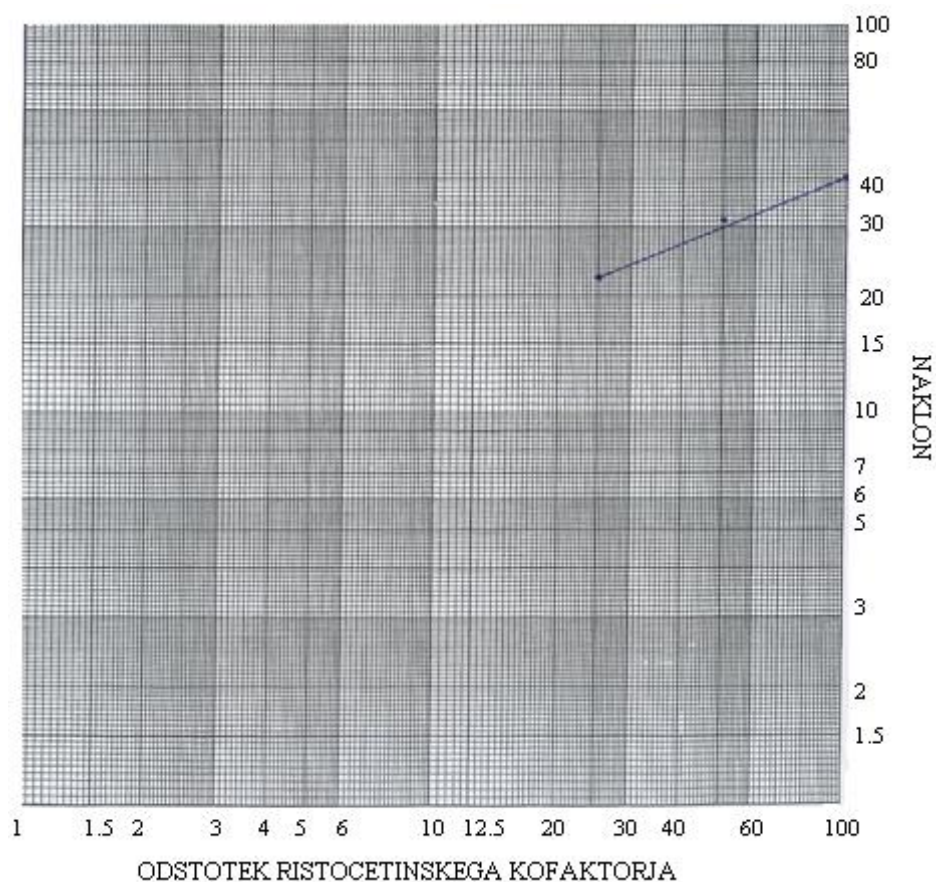
X = 1,75

$$8/1,75 = 4,57$$

$$4,57 \times 10 = 45,7 \quad \text{..... zaokroženo na } 46$$

3.2.2 Risanje umeritvene krivulje

Na podlagi dobljenih podatkov o naklonih krivulje, pridobljenih s pomočjo računalniškega programa, lahko narišemo umeritveno krivuljo (standarno premico) na dvojno logaritemsko skalo.

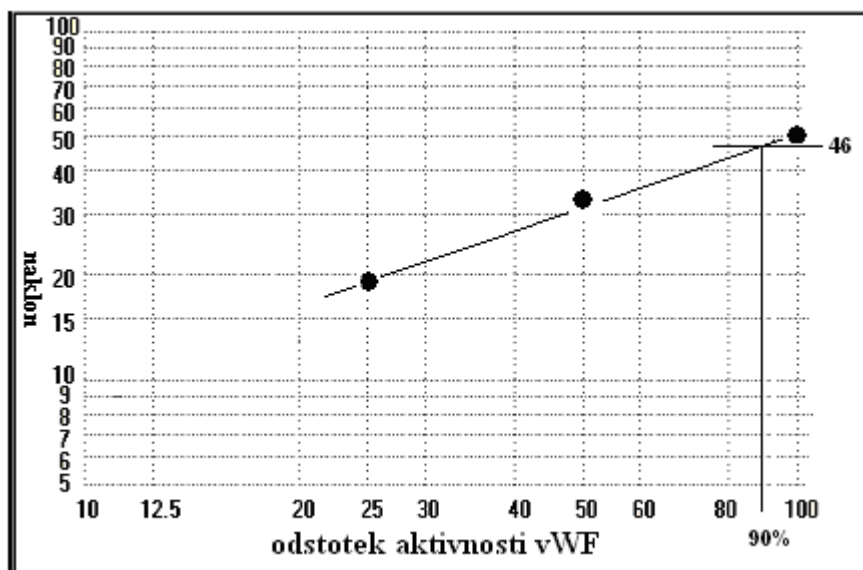


Slika 21: Ročno narisana umeritvena krivulja na dvojno logaritemsko skalo

Na x osi papirja je označen odstotek aktivnosti vWF pri 100%, 50% in 25%, na Y osi pa vrednosti naklonov aglutinacijske krivulje. Naklone, pridobljene s pomočjo računalniškega programa, narišemo na Y os nasproti ustreznim odstotkom ristocetinskega kofaktorja (vWF:Rco). Med dobljenimi točkami potegnemo premico. (Slika 21)

3.2.3 Končne vrednosti aktivnosti von Willebrandovega faktorja

Če ponovno uporabimo primer iz poglavja 3.2.2 in je vrednost dobljenega nakona 46, lahko to vrednost na podlagi prej narisane standardne premice pretvorimo v vWF:Rco za bolnika. Spodnja slika prikazuje sicer avtomatsko (računalniško) narisano premico, vendar je princip prvega in drugega načina izrisa premice popolnoma enak. Vrednosti naklona, ki jih dobimo za vzorec nanesimo na Y os (v danem primeru je to 46) in glede na abscisno os odčitamo ustrezní odstotek aktivnosti, ki je 90. To pomeni, da je vWF:RCo v bolnikovi plazmi 90%. (Slika 22)



Slika 22: Odčitavanje rezultatov na podlagi umeritvene krivulje (povzeto po viru 30)

3.3 APARATI IN PRIBOR

- inkubator GFL 7601,
- agregometer CHRONO – LOG corporation 490-4D,
- centrifuga Multifuge Heraeus 3S-R,
- pipete Eppendorf Reference, modri (50-1000 μ L) in rumeni (2-100 μ L) nastavki,
- steklene kivete (kataloška št.; 411608),
- magnetna mešala,
- plastične epruvete – nesterilne, velikosti 12 x 75 mm (polistirenska epruveta s kataloško št.; T400-3, proizvajalca Simport in zamaškom PVC epruvete 12 x 70, proizvajalca Golia),
- hlajeno stojalo Eppendorf Reference.

3.4 PREISKOVANCI

V preiskavo smo vključili 5 bolnic. Vzorce smo dobili od sodelavcev iz kliničnega oddelka za hematologijo. Uporabili smo kri bolnikov, kjer so bile naročene preiskave za oceno vWB. Razpon starosti je bil od 19 do 37 let, povprečna vrednost pa 27,8.

Od preiskovancev smo dobili ustni pristanek pred pričami. Rezultati raziskave niso vplivali na zdravljenje bolnikov.

Izvedeni postopki so bili v skladu z načeli Helsinške deklaracije o biomedicinskih raziskavah na človeku (1975).

3.5 ODVZEM VZORCEV

Vzorci so bili odvzeti v 4,5 mL epruvete, ki so vsebovale 0,105 M natrijev (Na) citrat. Razmerje med krvjo in antikoagulantom (Na-cit.) je bilo 9:1. Za preiskavo smo potrebovali 3 epruvete po 4,5 mL krvi. Odvzeta kri je bila v Specializiran hematološki laboratorij dostavljena pri sobni temperaturi.

4 DELO

4.1 RAVNANJE Z VZORCI PO ODVZEMU

Vzorci odvzete v epruvete z 0,105 M Na-cit. smo centrifugirali 15 minut na 3000 obratih/min oziroma 1942 x g v avtomatsko hlajeni centrifugi Multifuge 3S/ 3S-R Heraeus pri 4 °C.

Dobljeno plazmo smo nato odpipetirali in pri tem pazili, da nismo odpipetirali trombocitov, ter jo do preiskave shranili v 4 nesterilne, plastične epruvete velikosti 12 x 75 mm in zamrznili na -20 °C. Zamrznjene plazme smo pred preiskovanjem v 5-ih minutah odmrznili v inkubatorju pri 37 °C.

4.2 REAGENTI ZA AGLUTINACIJO TROMBOCITOV Z RISTOCETINOM

Uporabljali smo reagenčni komplet *Helena BioSciences, Europe* (kataloška št.: 10818568), ki je vseboval:

- raztopino TRIS pufra 1 x 35 mL (kataloška št.: 10774120)
- referenčno plazmo 2 x 1 mL (kataloška št.: 10783624)
- liofilizirane trombocite 4 x 5 mL (kataloška št.: 10818568)
- kontrolno plazmo v referenčnem območju 2 x 0,5 mL (kataloška št.:10714976)
- ristocetin 2 x 1,5 mL (kataloška št.:10818568)

* TRIS – spojina tris (hidroksimetil) amino-metana

* referenčna plazma – SARP kalibrator

* kontrolna plazma v referenčnem območju – ristocetin kofaktor abnormalna kontrola

4.2.1 Priprava ter shranjevanje reagentov in kontrol

Najprej smo raztopili potrebne reagente iz reagenčnega kompleta, ki so bili v liofilizirani obliki, razen že pripravljenih raztopin oziroma pufrov. Nato smo po ustreznih shemah pipetiranja pripravili redčitve referenčne plazme, kontrolne plazme v referenčnem območju in plazme bolnikov.

Priprava in shranjevanje reagentov in kontrol:

Reagenti	Raztapljamo z	Priprava	Čas	Stabilnost	Hranjenje
TRIS pufer	/	<i>Premešamo z rahlim obračanjem</i>	/	<i>na 2-6 °C</i>	<i>na 2-6 °C</i>
Referenčna plazma	<i>1 mL dest. H₂O</i>		<i>10 min.</i>	<i>2 uri na 2-6 °C</i>	<i>30 dni na -20 °C</i>
Liofilizirani trombociti	<i>5 mL TRIS pufra</i>		<i>20 min</i>	<i>1 dan na 2-6 °C</i>	<i>30 dni na -20 °C</i>
Kontrolna plazma	<i>0,5 mL dest. H₂O</i>		<i>10 min</i>	<i>8 ur na 2-6 °C</i>	<i>ni primeren za zamrzovanje</i>
Ristocetin	<i>1,5 mL dest. H₂O</i>				

* *Kontrolna plazma – kontrolna plazma v referenčnem območju*

* *Čas – čas, ki je potreben, da se reagenti in kontrole raztopijo*

* *Stabilnost – opredeljuje pri kateri temperaturi in koliko časa so reagenti in kontrole še stabilni, torej primerni za uporabo po tem, ko so že raztopljeni*

* *Hranjenje – opredeljuje koliko časa in pri kateri temperaturi lahko hranimo že raztopljene reagente in kontrole po tem, ko smo končali s preiskavo*

4.2.2 Sheme pipetiranja reagentov, kontrol in preiskovanih vzorcev

Pred pričetkom meritev smo pripravili ustrezne redčitve referenčne plazme, s katerimi smo pripravili umeritveno krivuljo. Nato smo pripravili kontrolno plazmo v referenčnem območju in nenazadnje plazme pacientov, ki smo jih želeli analizirati.

4.2.2.1 Serijsko redčenje referenčne plazme

Preden smo pričeli s testiranjem vzorcev smo pripravili umeritveno krivuljo. Pripravili smo štiri plastične epruvete in jih označili s števili od 1-4. V vsako smo odpipetirali 200 μ L TRIS pufra. Nato smo v epruveto z oznako 1 odpipetirali 200 μ L referenčne plazme in vsebino dobro premešali. Iz te epruvete, v kateri smo v razmerju 1:2 pripravili raztopino TRIS pufra in referenčne plazme, smo prenesli 200 μ L vsebine v epruveto z oznako 2. Vsebinsko smo dobro premešali in postopek ponovili še za tretjo in četrto epruveto. Na tak način smo s serijskim redčenjem referenčne plazme s TRIS pufrom v razmerjih 1:2 (epruveta 1), 1:4 (epruveta 2); 1:8 (epruveta 3), 1:16 (epruveta 4) pridobili ustrezno aktivnost referenčne plazme. Aktivnost referenčne plazme pripravljene v prvi epruveti je znašala 100%, v drugi 50%, v tretji 25% in v četrti epruveti 12,5%. (*Shema 5*)

<i>Epruvete</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>TRIS pufer</i>	0,2	0,2	0,2	0,2
<i>Referenčna plazma</i>	0,2 →	0,2	0,2	0,2
<i>Redčitev</i>	(1:2)	(1:4)	(1:8)	(1:16)
<i>Aktivnost</i>	100%	50%	25%	12,5%

Shema 5: Serijsko redčenje referenčne plazme za pripravo umeritvene krivulje

* skupni volumen (naveden v mL) raztopin po redčenjih je znašal 0,4 mL

4.2.2.2 Priprava kontrolne plazme v referenčnem območju

Pripravili smo dve plastični epruveti, ter ju označili; prvo s številom 1 in drugo z 2. V obe smo odpipetirali 200 μ L TRIS pufra. Nato smo v epruveto označeno s številom 1 odpipetirali 200 μ L kontrolne plazme v referenčnem območju in vsebino dobro premešali. Iz te epruvete smo prenesli 200 μ L vsebine v epruveto označeno s številom 2. Na tak način smo s serijskim redčenjem kontrolne plazme v referenčnem območju s TRIS pufrom v razmerjih 1:2 (epruveta 1), 1:4 (epruveta 2) pridobili 100% v epruveti 1 in 50% aktivnost v epruveti 2. (*Shema 6*)

<i>Epruvete</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
<i>TRIS pufer</i>	0,2	0,2
<i>Kontrolna plazma v referenčnem območju</i>	0,2 →	0,2
<i>Redčitev</i>	(1:2)	(1:4)
<i>Aktivnost</i>	100%	50%

Shema 6: Serijsko redčenje kontrolne plazme v referenčnem območju

* skupni volumen (naveden v mL) raztopin po redčenjih je znašal 0,4 mL

4.2.2.3 Priprava vzorca bolnika

Postopek priprave vzorca plazme je bil praktično enak pripravi kontrolne plazme v referenčnem območju, le da smo vzorec redčili v razmerju 1:2. Pripravili smo eno plastično epruveto ter nanjo napisali ID bolnika (primer: ID 21). Tako je bila epruveta ustrezno označena in ni prihajalo do napak zaradi zamenjave vzorcev. V epruveto smo napipetirali 200 μ L TRIS pufra in 200 μ L vzorca bolnikove plazme ter vsebino dobro premešali. (*Shema 7*)

<i>Epruveta</i>	<i>I</i>
<i>TRIS pufer</i>	0,2
<i>Plazma bolnika</i>	0,2
<i>Redčitev</i>	(1:2)

Shema 7: Redčenje vzorca bolnikove plazme

* skupni volumen (naveden v mL) raztopine po redčenju je znašal 0,4 mL

4.2.3 Testiranje

Pri testnem sistemu smo pri celotnem postopku meritev uporabljali računalniški program Aggro/Link. V testnem oknu programa smo upravljali z agregometrom. Tovrstni program je spadal med ročne programe oziroma metode, saj smo vsak ukaz pri preiskavi izvedli ročno, možnosti vnaprejšnjega programiranja časa trajanja inkubacije, meritve in ostalih parametrov ni bilo. Pomemben kriterij, ki to metodo opredeljuje kot ročno, je tudi izris umeritvene krivulje, ki je bil pri tem programu ročni na dvojno logaritemsko skalo.

Postopek pridobivanja točk standardne premice:

1. S pritiskom na funkcijo **RUN NEW**, se je odprlo okno v katerem smo opredelili željeno preiskavo. S pritiskom funkcije **OK** smo prišli do naslednje stopnje.
2. V štiri kivete, v katere smo najprej vstavili magnetna mešala smo napipetirali 50 µL ristocetina in 400 µL liofiliziranih trombocitov. Pazili smo, da med pipetiranjem nismo povzročili nastanka zračnih mehurčkov, ki bi lahko motili preiskavo. Oba reagenta smo tik pred pipetiranjem premešali z obračanjem.
3. V peti kiveti smo pripravili raztopino slepega vzorca – referenčne raztopine, s katero smo uravnavali osnovno linijo. Referenčno raztopino smo pripravili tako, da smo v kiveto pipetirali 250 µL liofiliziranih trombocitov ter 250 µL TRIS pufru.

4. Pripravljene kivete smo pred postavitvijo v agregometer obrisali. Tisto s slepo raztopino smo postavili v kanal z oznako PPP, ostale štiri pripravljene kivete pa na mesta 1, 2, 3, 4 z oznako PRP. (Slika 16) Na agregometru smo pod vsakim kanalom posebej pritisnili gumb **SET BASE LINE** – začeli smo z nastavitvijo osnovne linije, ki je trajala 3 minute.

5. Ko so se krivulje vseh štirih kanalov po treh minutah umirile, smo pritisnili v programskem oknu funkcije **STOP**, **RE RUN** in nato **RUN NEW**. Na tak način so se podatki o slepih raztopinah shranili v programu, aparat pa je zaznal spremembe v naslednji stopnji testiranja, ko smo kivetam dodajali redčine referenčne plazme.

6. V vsako kiveto smo pipetirali 50 μ L referenčne plazme, ki je bila redčena v različnih razmerjih. Tako smo v prvo kiveto napipetirali referenčno plazmo s 100% aktivnostjo (1:2), v drugo s 50% aktivnostjo (1:4) itd. Meritve smo izvajali nadaljnje 3 minute.

7. Po tem času smo meritve ustavili s pritiskom funkcije **STOP**. Program nam je podal izmerjene vrednosti, vrednosti naklonov, katere smo ročno vnesli na dvojno logaritemsko skalo.

* liofilizirani trombociti so bili v času priprave v hlajenem stojalu.

Ko je bila umeritvena krivulja ustrezna (čimbolj linearna), smo na podoben način izvedli meritve kontrolne plazme v referenčnem območju. Vrednosti meritev kontrolne plazme v referenčnem območju, ki smo jih dobili, smo preverili z vrednostmi podanimi s strani proizvajalca. Po pridobitvi umeritvene krivulje in njenem preverjanju s kontrolno plazmo smo nadaljevali s testiranjem vzorcev. Testiranje vzorcev je bilo izvedeno po enakem principu kot meritev (testiranje) s katero smo pridobili podatke o umeritveni krivulji, le da je bila v tem primeru uporabljena plazma redčena v razmerju 1:2. Aparat nam je podal vrednosti naklonov. Vrednosti smo nanegli na y os in glede na umeritveno krivuljo odčitali odstotek vWF:Rco.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

Določitev vWF:RCo – aktivnost von Willebrandovega faktorja, je pomembna pri opredelitvi von Willebrandove bolezni, vendar je po podatkih iz literature metoda visoko variabilna (50).

Natančnost oziroma ponovljivost načina smo določili v seriji in med serijami meritev. Ponovljivost v seriji in med serijami meritev za vWF:RCo smo opredelili z uporabo vzorcev plazme bolnikov. Za opredelitev ponovljivosti v seriji smo uporabili dva vzorca, za opredelitev ponovljivosti med serijami pa tri vzorce.

Začetna stopnja testiranja je bila priprava umeritvenega diagrama – umeritvene krivulje, pri kateri nas je zanimalo območje linearnosti. Po izdelavi dovolj linearne umeritvene krivulje smo izvedli testiranja za vsak vzorec in sicer za oceno ponovljivosti v seriji osemkrat, za oceno ponovljivosti med serijami meritev pa zaradi pomanjkanja vzorcev trikrat.

Sledilo je statistično vrednotenje pridobljenih podatkov s statističnim programom Windows Excel, s katerim smo pri vsakem vzorcu v vsaki seriji opredelili povprečno vrednost, standardno deviacijo (SD) in koeficient variacije (KV).

- \bar{X} – povprečna vrednost

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i$$

* n – število podatkov * X_i – seštevek vseh vrednosti

- **SD** – standardna deviacija/standardni odklon

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

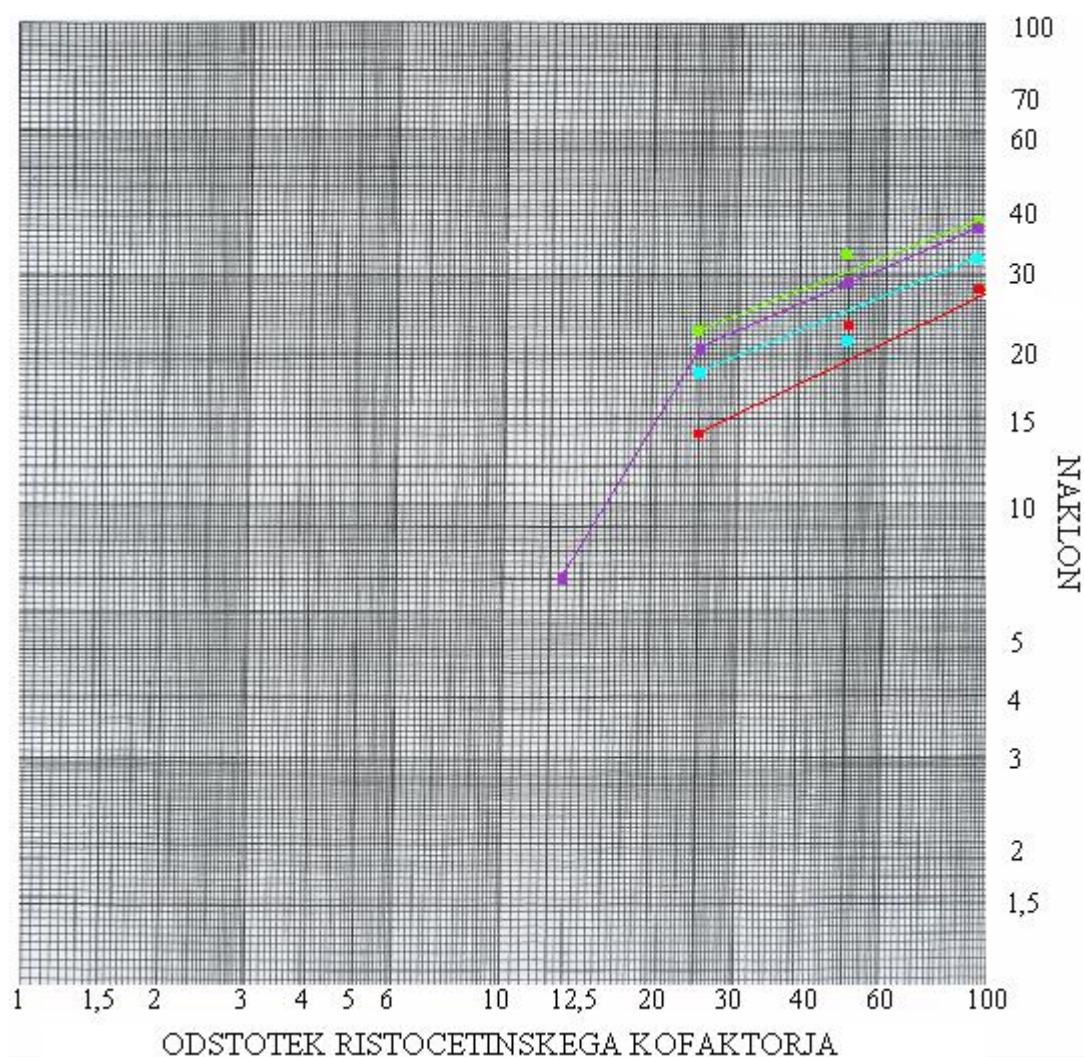
* X_i – seštevek vseh vrednosti * \bar{x} – povprečna vrednost * N – število podatkov

- **KV** – koeficient variacije

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

5.1 UMERITVENI DIAGRAMI

Slika 23 prikazuje umeritveni diagram – umeritvene krivulje (premice). Premice so narisane na dvojno logaritemsko skalo, pri kateri vrednosti abscisne osi predstavljajo aktivnosti vWF:RCo, vrednosti ordinatne osi pa vrednosti naklonov. Umeritveno krivuljo, namenjeno pridobivanju podatkov o ponovljivosti v seriji, smo pripravljali petkrat. Označuje jo vijolična barva. Sestavljajo jo 4 točke z različno aktivnostjo vWF:RCo in sicer 100%, 50%, 25% in 12,5%.



Slika 23: Umeritvene krivulje: ponovljivost v seriji – vijolična barva, ponovljivost med serijami – rdeča barva (1. serija meritev), modra barva (2. serija meritev), zelena barva (3. serija meritev)

Ugotavljamo, da je točka pri aktivnosti 12,5% izven linearnega območja ostalih treh točk. Zaradi ugotovljenega dejstva in po priporočilih proizvajalca pri nadaljnjih umeritvenih krivuljah za oceno ponovljivosti med serijami 4. točke z aktivnostjo 12,5% nismo upoštevali.

Na umeritvenem diagramu so prikazane umeritvene krivulje za posamezno serijo meritev za ocenjevanje ponovljivosti med serijami z rdečo, modro in zeleno barvo. Ustrezno linearno umeritveno krivuljo za 1. serijo meritev smo dobili po prvi meritvi referenčne plazme. Na diagramu je krivulja označena z rdečo barvo. Z modro barvo je označena umeritvena krivulja za 2. serijo meritev. Umeritvena krivulja pridobljena po petkratnem merjenju referenčne plazme za 3. serijo meritev je zelene barve.

5.2 IZSLEDKI TESTIRANJ

○ Ponovljivost v seriji

Tabela 2 prikazuje izsledke testiranja za opredelitev ponovljivosti vWF:RCo za dva vzorca v seriji, katerih testiranje plazme smo izvedli osemkrat. Pri prvem vzorcu so označene najbolj izstopajoče vrednosti. Povprečna vrednost vseh osmih meritev za prvi vzorec je znašala 50,9%, za drugega pa 45,6%. KV na podlagi izračunanega standardnega odklona za prvi vzorec je znašal 50% in 33% za drugega.

Vzorec	Vzorec 1								Vzorec 2							
Meritev	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Izmerjen naklon	14	27	27	18	42	33	29	31	23	31	18	29	23	31	27	33
Odčitani rezultat (%)	18	46	46	23	100	66	50	58	32	58	23	50	32	58	46	66
Povprečje (%)	50,9								45,6							
SD (%)	25,6								15,2							
KV (%)	50								33							

Tabela 2: Izsledki testiranja za opredelitev ponovljivosti za dva vzorca v seriji

* povprečje: povprečna vrednost * SD: standardni odklon * KV: koeficient variacije

Tabela 3 prikazuje podatke z odstranjenimi izstopajočimi vrednostmi t.i. »ubežniki« pri prvem vzorcu. Najbolj sta izstopali 1. in 5. meritev, ki smo ju iz statistične analize izločili in na podlagi ohranjenih podatkov ponovno izračunali povprečno vrednost, ki je znašala 48%, SD z vrednostjo 14,6% in KV, ki je bil v primerjavi s prvotno uporabljenimi meritvami nižji, 30%.

<i>Vzorec</i>	<i>Vzorec 1</i>					
<i>Meritev</i>	1	2	3	4	5	6
<i>Izmerjen naklon</i>	27	27	18	33	29	31
<i>Odčitani rezultat (%)</i>	46	46	23	66	50	58
<i>Povprečje (%)</i>	48					
<i>SD (%)</i>	14,6					
<i>KV (%)</i>	30					

Tabela 3: Izsledki testiranja za opredelitev ponovljivosti pri vzorcu 1 po izločitvi najbolj izstopajočih meritev

* *povprečje*: povprečna vrednost * *SD*: standardni odklon * *KV*: koeficient variacije

○ Ponovljivost med serijami – vzorec 1

Tabela 4 prikazuje izsledke testiranja za opredelitev ponovljivosti med serijami za vzorec 1 v vseh treh serijah meritev. Povprečna vrednost vseh treh meritev je v 1. seriji znašala 19,3%, SD 5,1% in KV 27%. V 2. seriji meritev je znašala povprečna vrednost 18,6%, SD 0,6% in KV 3%. V 3. seriji meritev je znašala povprečna vrednost 19,6%, SD 3,8% in KV 19%. Povprečni koeficient variacije za vzorec 1 v vseh treh serijah meritev je znašal 16%

<i>Vzorec</i>	<i>Vzorec 1</i>								
<i>Serija</i>	<i>S1</i>			<i>S2</i>			<i>S3</i>		
<i>Meritev</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
<i>Izmerjen Naklon</i>	11	16	14	16	16	14	16	23	18
<i>Odčitani rezultat (%)</i>	15	25	18	19	19	18	17	24	18
<i>Povprečje (%)</i>	19,3			18,6			19,6		
<i>SD (%)</i>	5,1			0,6			3,8		
<i>KV (%)</i>	27			3			19		
<i>KV v serijah (%)</i>	16								

Tabela 4: Izsledki testiranja za opredelitev ponovljivosti med serijami pri vzorcu 1 v vseh treh serijah meritev

* povprečje: povprečna vrednost * SD: standardni odklon * KV: koeficient variacije

○ Ponovljivost med serijami – vzorec 2

Tabela 5 prikazuje izsledke testiranja za opredelitev ponovljivosti med serijami za vzorec 2 v vseh treh serijah meritev. Pri vzorcih so označene najbolj izstopajoče vrednosti. Povprečna vrednost vseh treh meritev je v 1. seriji znašala 59%, SD 37,3% in KV 63%. V 2. seriji meritev je znašala povprečna vrednost 73,3%, SD 23,1% in KV 32%. V 3. seriji meritev je znašala povprečna vrednost 49,6%, SD 46,9% in KV 95%. Povprečni koeficient variacije za vzorec 2 v vseh treh serijah meritev je znašal 63%

<i>Vzorec</i>	<i>Vzorec 2</i>								
<i>Serija</i>	<i>S1</i>			<i>S2</i>			<i>S3</i>		
<i>Meritev</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
<i>Izmerjen Naklon</i>	22	36	23	27	34	27	29	36	5
<i>Odčitani Rezultat (%)</i>	27	100	50	60	100	60	42	100	7
<i>Povprečje (%)</i>	59			73,3			49,6		
<i>SD (%)</i>	37,3			23,1			46,9		
<i>KV (%)</i>	63			32			95		
<i>KV v serijah (%)</i>	63								

Tabela 5: Izsledki testiranja za opredelitev ponovljivosti med serijami pri vzorcu 2 v vseh treh serijah meritev

* povprečje: povprečna vrednost * SD: standardni odklon * KV: koeficient variacije

Tabela 6 prikazuje podatke z odstranjenimi izstopajočimi vrednostmi t.i. »ubežniki« pri vzorcu 2 v vseh treh serijah meritev. V 1. in 2. seriji sta najbolj odstopali drugi meritvi, v 3. seriji pa druga in tretja meritev. Vse našteje meritve smo iz statistične analize izločili in na podlagi ohranjenih podatkov ponovno izračunali povprečno vrednost, ki je znašala v 1. seriji meritev 38,5% SD 16,3% in KV 42%. V 2. seriji meritev smo ohranili dve meritvi, ki sta bili enaki, zato je bila vrednost SD in KV 0, podobno je bilo v 3. seriji meritev, kjer smo ohranili samo prvo meritev. Povprečni koeficient variacije za vzorec 2 v vseh treh serijah po odstranitvi najbolj izstopajočih vrednosti je znašal 42%.

<i>Vzorec</i>	<i>Vzorec 2</i>				
<i>Serijska</i>	<i>S1</i>		<i>S2</i>		<i>S3</i>
<i>Meritve</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>1</i>
<i>Izmerjen naklon</i>	22	23	27	27	29
<i>Odčitani rezultat (%)</i>	27	50	60	60	42
<i>Povprečje (%)</i>	38,5		60		42
<i>SD (%)</i>	16,3		0		0
<i>KV (%)</i>	42		0		0
<i>KV v serijah (%)</i>	42				

Tabela 6: Izsledki testiranja pri vzorcu 2 v vseh treh serijah meritev po izločitvi najbolj izstopajočih meritev

* povprečje: povprečna vrednost * SD: standardni odklon * KV: koeficient variacije

○ Ponovljivost med serijami – vzorec 3

Tabela 7 prikazuje izsledke testiranja za opredelitev ponovljivosti med serijami za vzorec 3 v vseh treh serijah meritev. Pri vzorcih so označene najbolj izstopajoče vrednosti. Povprečna vrednost vseh treh meritev je v 1. seriji znašala 26%, SD 8,5% in KV 33%. V 2. seriji meritev je znašala povprečna vrednost 45,3%, SD 6,5% in KV 14%. V 3. seriji meritev je znašala povprečna vrednost 79,3% SD 35,8% in KV 45%. Povprečni koeficient variacije za vzorec 3 v vseh treh serijah meritev je znašal 31%.

<i>Vzorec</i>	<i>Vzorec 3</i>								
<i>Serija</i>	<i>S1</i>			<i>S2</i>			<i>S3</i>		
<i>Meritev</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
<i>Izmerjen naklon</i>	14	25	16	20	23	22	36	27	45
<i>Odčitani rezultat (%)</i>	18	35	25	38	50	48	100	38	100
<i>Povprečje (%)</i>	26			45,3			79,3		
<i>SD (%)</i>	8,5			6,5			35,8		
<i>KV (%)</i>	33			14			45		
<i>KV v serijah (%)</i>	31								

Tabela 7: Izsledki testiranja za opredelitev ponovljivosti med serijami pri vzorcu 3 v vseh treh serijah meritev

* *povprečje*: povprečna vrednost * *SD*: standardni odklon * *KV*: koeficient variacije

Tabela 8 prikazuje podatke z odstranjenimi izstopajočimi vrednostmi t.i. »ubežniki« pri vzorcu 3 v vseh treh serijah meritev. V 1. in 2. seriji meritev nismo izločili nobenega podatka. V 3. seriji meritev pa smo iz statistične analize izločili prvo in tretjo meritev. Ker smo v tretji seriji meritev ohranili samo en podatek sta bila SD in KV 0.

Skupni KV za vzorec 3 v vseh treh serijah meritev je po odstranitvi najbolj izstopajočih vrednosti znašal 23%.

<i>Vzorec</i>	<i>Vzorec 3</i>						
<i>Serija</i>	<i>S1</i>			<i>S2</i>			<i>S3</i>
<i>Meritev</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>1</i>
<i>Izmerjen naklon</i>	14	25	16	20	23	22	27
<i>Odčitani rezultat (%)</i>	18	35	25	38	50	48	38
<i>Povprečje (%)</i>	26			45,3			38
<i>SD (%)</i>	8,5			6,5			0
<i>KV (%)</i>	33			14			0
<i>KV v serijah (%)</i>	23						

Tabela 8: Izsledki testiranja pri vzorcu 3 v vseh treh serijah meritev po izločitvi najbolj izstopajočih meritev

* *povprečje*: povprečna vrednost * *SD*: standardni odklon * *KV*: koeficient variacije

Po navodilih proizvajalca smo pripravili reagente in kontrole. Raztopili smo jih z ustreznimi količinami pufru oziroma destilirane vode ter pustili, da so se raztopili. Nato smo se lotili priprave redčitev referenčne plazme za določitev umeritvene krivulje. Z redčitvami 1:2, 1:4, 1:8 in 1:16 smo dobili 100%, 50%, 25, in 12,5% aktivnost vWF:RCo. Standardna premica bi torej imela 4 točke aktivnosti, s katerimi bi opredelili aktivnost von Willebrandovega faktorja za vse tipe in podtipe bolezni. Težava, ki se je pojavila takoj na začetku meritev za umeritveno krivuljo, je bila njena linearnost. Z zadnjo, 4. točko (aktivnost 12,5%) nismo v nobenem primeru meritev dosegli ustrezne linearnosti, kar smo dokazali pri meritvah za umeritveno krivuljo namenjeno oceni ponovljivosti v seriji. Na podlagi teh spoznanj in z ozirom priporočil drugih proizvajalcev smo opravljali nadaljnje meritve za standardne premice samo s tremi aktivnostmi vWF:RCo (100%, 50% in 25%). Tako smo dobili tritočkovno premico, ki smo jo ročno narisali na dvojno logaritemsko skalo. Zaradi neustrezne linearnosti je bilo potrebno meritve za posamezno premico ponavljati tudi 5-krat.

Po določitvi ustrezno linearne umeritvene krivulje smo testirali vzorce. Za opredelitev ponovljivosti v seriji smo osemkrat testirali plazmo dveh bolnikov. Dobljena KV za prvega in drugega sta bila 50% in 33%.

Iz statistične analize smo izključili najbolj izstopajoče vrednosti t.i. »ubežnike«, ki so botrovali tako visokemu koeficientu variacije in ohranjene rezultate še enkrat preračunali. Takega načina »popravljanja« rezultatov se velikokrat poslužujemo pri vpeljavi novih metod. Najbolj izstopajoče rezultate izločimo in analizo ponovimo.

Z izločitvijo odstopajočih rezultatov »ubežnikov« pri vzorcu 1, ki so botrovali tako visokem koeficientu variacije, smo dobili bolj primerne rezultate – KV 30%.

K opredelitvi ponovljivosti med serijami smo pristopili s testiranjem treh vzorcev. Vsak vzorec smo v tripletu testirali trikrat v treh različnih dnevih. Povprečen KV pri prvem bolniku v treh serijah je bil 16%; pri drugem bolniku 63% in pri tretjem 31%. Tudi v tem primeru smo izločili najbolj odstopajoče meritve in na ta način pridobili bolj ustrezne podatke. To smo storili pri 2. in 3. vzorcu. Nova vrednosti KV za 2. bolnika je bila 42%, za tretjega pa 23%.

Iz navedenih podatkov je moč sklepati, da je ponovljivost metode tako v seriji kot med serijami slaba. To v praksi pomeni, da mora biti testiranje za bolnika s sumom na von Willebrandovo bolezen ponovljeno večkrat. Najbolj problematične pri bolniku so nizke ravni aktivnosti vWF:RCo (pod 20%). Tako nizkih ravni vWF s to metodo ne moremo zanesljivo detektirati, ker s četrto točko premice s katero je opredeljena najnižja aktivnost, ne moremo doseči linearnosti (50).

Glede na to, da nam je uspelo z izločanjem najbolj ekstremnih rezultatov izboljšati koeficiente variacije, tak način obdelave podatkov v vsakdanji laboratorijski praksi ne predstavlja dolgotrajne rešitve in se uporablja izključno pri postavitvi nove metode.

Zaradi zgoraj omenjenih omejitev testa za določanje aktivnosti von Willebrandovega faktorja in zaradi pogostosti izvajanja preiskav v laboratorijih, so se razvile številne alternativne metode, ki ne vsebujejo ristocetina (ELISA, LIA). K takojšnjemu izboljšanju obsoječe metode bi privedla njena optimizacija na podlagi priporočil drugih proizvajalcev podobnih reagenčnih kompletov in vpeljava novega računalniškega programa, ki avtomatsko izriše standardno premico in je tako narisana premica bolj točna.

6 SKLEP

- Z reagenčnim kompletom proizvajalca Helena BioSciences ne dosegamo ustrezne linearnosti standardne krivulje.
- Pri meritvah vzorcev pacientov opazamo visoko variabilne rezultate. Ponovljivost v seriji za dva vzorca je 50% in 33%; med tremi različni serijami za prvega bolnika 16%, za drugega 63% in za tretjega bolnika 31%.
- Smiselno bi bilo preučiti postopke dela in ravnanje z reagenti pri drugih proizvajalcih podobnih reagenčnih kompletov in obstoječo metodo na tak način optimizirati.
- V rutinsko delo bi bila smotrna vpeljava metod, ki ne vključujejo dodajanja ristocetina in ki imajo možnost avtomatiziranega izvajanja metode.
- Začasno in za klinično bolj uporabne rezultate je potrebno pri bolniku zaradi omenjene variabilnosti rezultatov v krajših časovnih intervalih testiranje za vWF:RCo večkrat ponoviti.

7 VIRI

1. Rabinowitz I, Tuley A, Mancuso D, Randi A, Firkin B, Howard M, Sadler. Von Willebrand disease type B: A missense mutation selectively abolishes ristocetin-induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib. Proc. Natl. Acad. SCI. USA oktober 1992; 89: 9846-9
2. Andoljšek D, Preložnik Zupan I: Hemostaza. Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. izd., Littera picta, 2005: 1286-301
3. Stecher A: Testi hemostaze. Dostopano dne 25.05. 2010:
<http://www.ztm.si/res/publication/1042.pdf>
4. Glaser M: Bolezni krvi in krvotvornih organov. Bombek M, Čokolič M, Dajčman D, Hojs R, Hren J, Kamenik B, Kanič V: Interna medicina za visoko zdravstveno šolo, Visoka zdravstvena šola Maribor, 2000: 301-69
5. Stergar M: Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami, Littera picta, 2005: 35-9
6. Andoljšek D: Pomen spreminjanja faktorja VIII/ von Willebrandovega faktorja v poteku svežega miokardnega infarkta, Disertacija, Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani; Ljubljana 1988: 2-10
7. Lunder M, Kuhar P, Drevenšek G: Preprečevanje in zdravljenje ateroskleroze. Medicinski mesečnik, 2007; sept.: 294-8
8. Salobir B, Šabovič M, Praprotnik: Pomen endotelijske disfunkcije za razvoj pljučne arterijske hipertenzije in nove možnosti zdravljenja. Zdrav. Vest 2003; 72; 381-5
9. Urlep Šalinović V: Hemostatske motnje. Strokovno srečanje ob 30-letnici hemostaziološke dejavnosti v Splošni bolnišnici Maribor 26. maj 2005: 23-6
10. Pajič T, Podgornik H, Černelč P: Nekatere zahtevnejše laboratorijske preiskave v klinični hematologiji, 51. Tavčarjevi dnevi 5.-7. november 2009: 175-78
11. Federici A: Treatment options in inherited von Willebrand disease 2009. Medican group LTD 2009; 4: 3-7
12. Vincetelli A, Susen S, Le Tourneaut: Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. N. Engl. J. Med 2003; 4: 343-9
13. Von Willebrand EA: Hereditary pseudo-haemophilia. Fin Läkanesällsk Handl 1999; 68: 87-112

- 14.** Benedik-Dolničar M: Von Willebrandova bolezen: prepoznavanje in zdravljenje. Zdrav. Vest 2004; 73: 147-54
- 15.** Sadler JE: Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. Annu. Rev. Biochem 1998; 67: 395-424
- 16.** Andoljšek D, Preložnik Zupan I: Motnje koagulacije krvi. Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. izd., Littera picta, 2005: 1302-14
- 17.** Manucci P.M, Federici A.B: Von Willebrand disease. Hematology, EHA Educ Program 2006; 2: 224-30
- 18.** Benedik-Dolničar M: Urgentna stanja pri hemofiliji in von Willebrandovi bolezni. Zdrav Obzornik 1991; 25: 155-60
- 19.** Gao W, Anderson PJ, Sadler JE: Factors influencing the cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS – 13. V: Cao V, Krishnaswamy S, Carmine RM, Lenting PJ, Zheng XL: Blood, 21. izd, USA, 2008: 1713-19
- 20.** Metcraft D, Nightingale T, Zenner H, Lui-Roberts W, Cutler D: Formation and function of Weibel-Palade bodies. Journal of cell Science 2008; 121: 19-27
- 21.** Porter S, Clark I, Kevorkian L, Edwards D: The ADAMTS metalloproteinases. Biochem J 2005; 1: 15-27
- 22.** Pruss CM, Notley CR, Negadorn CA, O' Brien LA, Lilicrap D: Adamts 13 cleavage efficiency is altered by mutagenic and, to a lesser extend, polymorphic sequence changes in the A1 and A2 domains of VWF. Br J Haematology 2008; 4: 552-8
- 23.** Modic M, Zver S: Zdravljenje kronične idiopatične trombotične trombocitopenične purpore s splenektomijo. Zdrav. Vest 2002; 71: 453-5
- 24.** Sever M: Zdravljenje trombotične trombocitopenične purpore – naše izkušnje. Zdrav. Vest 2008; 77: 105-9
- 25.** Gallinaro L, Cattini MG, Sztukowska M, Padrini R, Sartorello F, Pontara E, Bertomoro A, Daidone V, Pagnan A, Casonato a: Linkage of von Willebrand factor half-life and the AB0 blood group. Blood 2008; 7: 3540-45
- 26.** Andoljšek D, Pajič T: Odziv na dezmopresin (DDAVP) pri von Willebrandovi bolezni: preoperativno preverjanje. Zdrav. Vest 2008; 77: 121-4
- 27.** Stanič R: Motnje strjevanja krvi pri bolnikih z operativnimi posegi na jetrih (resekcije, transplantacije). Dostopano dne 21.06. 2010: <http://www.ztm.si/res/publication/1035.pdf>
- 28.** Preložnik Zupan I: Klinična uporaba osnovnih preiskav hemostaze. Zbornik predavanj 16.-17. april 2010; 21: 24-7

- 29.** Navodila proizvajalca Helena Biosciences za uporabo in ravnanje z reagenčnim kompletom za agregacijo trombocitov z ristocetinom (kataloška št.: 10818568)
- 30.** Aglutinacijska krivulja. Dostopano dne 03.08. 2010:
http://www.biodatacorp.com/library/products/103023vW_Factor_Assay_English_Insert_Rev.N.pdf
- 31.** Nastanek fibrinske mreže. Dostopano dne 20. 07. 2010:
http://1.bp.blogspot.com/_Y16tX3TY2e4/SqDY_uT0IBI/AAAAAAAAACw/AyjaOrnE9g/s320/BLOOD+COAGULATION.jpeg
- 32.** Delovanje kovinske proteinaze ADAMTS 13. Dostopano dne 12.06.2010:
<http://hematology.wustl.edu/faculty/sadler/vwf.gif>
- 33.** Molekularna zgradba monomerne enote vWF. Dostopano 05.05. 2010
<http://www.picb.ac.cn/shear/pic.jpg>
- 34.** Mehanizem vezave z GPIb in GPIIb/IIIa. Dostopano dne: 05.05. 2010:
http://www.orthosupersite.com/images/content/obj/0803/kroonen_fig1.gif
- 35.** Kivete z aglutinati. Dostopano dne 05.05. 2010: <http://en.wikipedia.org/wiki/Platelets>
- 36.** Receptorji na površini trombocitov: Dostopano dne 21.06. 2010:
<http://veterinarycalendar.com>
- 37.** Cotran SR, Kumar V, Collins T: Pathologic basis of disease, 6 izd., W. B., Saunders Company, Philadelphia, 1999: 118
- 38.** Weibel-Paladijevo telesce. Dostopano dne 26.6:
http://www.google.si/imgres?imgurl=http://www.lumc.nl/rep/1050/ima/812170847122537/812170908082537.jpg&imgrefurl=http://www.lumc.nl/con/1050/85468/812100259232537/812160410062537/%3Fsetlanguage%3DEnglish%26setcountry%3Den&usq=__am5vgEtqkazRpFPxu2Ns_fciIhs=&h=688&w=469&sz=189&hl=sl&start=28&um=1&itbs=1&tbnid=vFeO6IsahIo5M:&tbnh=139&tbnw=95&prev=/images%3Fq%3Dweibel%2Bpalade%2Bbodies%26start%3D20%26um%3D1%26hl%3Dsl%26sa%3DN%26ndsp%3D20%26tbs%3Disch:1
- 39.** Struktura von Willebrandovega faktorja. Dostopano dne 29.04. 2010 :
http://en.wikipedia.org/wiki/Von_Willebrand_factor
- 40.** Adhezija in agregacija trombocitov. Dostopano dne 11.06. 2010:
<http://www.platelets.se/resource/Coagulation.jpg>
- 41.** Batlle J, Perez-Rodriguez A, Lopez-Fernandez M: The Classification of von Willebrand Disease: Is Type 2M Redundant?. *Medican group LTD* 2009; 4: 9-11

42. Morfologija trombocita. Dostopano dne 04.03. 2010:

[http://www.chelationtherapyonline.com/GarryGordon/images/Copy%20\(3\)%20of%20Slide1.GIF](http://www.chelationtherapyonline.com/GarryGordon/images/Copy%20(3)%20of%20Slide1.GIF)

43. Molekulska struktura ADAMTS 13. Dostopano dne 03.04. 2010:

http://www.google.si/imgres?imgurl=http://www.lerner.ccf.org/bme/apte/adamts/images/adamts_family.gif&imgrefurl=http://www.lerner.ccf.org/bme/apte/adamts/domain_organization.php&usq=__DDFNwYqZHVAVqYOE7TlbYs9XVe0=&h=343&w=470&sz=9&hl=sl&start=0&zoom=1&tbnid=vAY2NtotTl8fQM:&tbnh=133&tbnw=180&prev=/images%3Fq%3DADAMTS%2B13%2BKEY%2BDOMAINS%26um%3D1%26hl%3Dsl%26sa%3DN%26biw%3D1024%26bih%3D576%26tbs%3Disch:1&um=1&itbs=1&iact=hc&vpx=196&vpy=78&dur=3&hovh=192&hovw=263&tx=143&ty=102&ei=5ORuTIOhCJa6jAfO-K37CA&oei=nRuTIzyOYLq4Aax6fDzDA&esq=22&page=1&ndsp=15&ved=1t:429,r:1,s:0

44. Ca Lee, Berntorp EE, Hoots WK: Textbook of Hemophilia, Blackwell Publising, 2006

45. Turbidimetry-nephelometry-model. Dostopano dne 29.08. 2010:

<http://www.wmtc.org.uk/wp-content/uploads/2010/04/Turbidimetry-nephelometry-model-answer-2010.pdf>

46..Spektroskopija. Dostopano dne 11.09. 2010:

http://www.farmadrustvo.si/gradivo_p/Instrumentalna%20farmacevtska%20analiza/VAJE/05-UV-VIS.pdf

47..Optični spektrofotometer. Dostopano dne 11.09.2010:

http://www.google.si/imgres?imgurl=http://www.scientific-equipment.com/equipment/Cronolog_490.jpg&imgrefurl=http://www.labx.com/v2/spiderdealer2/vistaSearchDetails.cfm%3FLVid%3D6993597&usq=__N1Is61bx5uH40Ki3Sij809k6tLs=&h=284&w=324&sz=17&hl=sl&start=0&zoom=0&tbnid=UclbtDpkvubOM:&tbnh=103&tbnw=118&prev=/images%3Fq%3Dchronolog%2Bcorporation%26um%3D1%26hl%3Dsl%26biw%3D1024%26bih%3D576%26tbs%3Disch:1&um=1&itbs=1&iact=hc&vpx=654&vpy=165&dur=4228&hovh=103&hovw=118&tx=109&ty=78&ei=_8uCTKjBMcjOswb9yqTmCA&oei=28uCTNmQO4GDswbd7MXsCA&esq=13&page=1&ndsp=15&ved=1t:429,r:3,s:0

48. SOP navodila za uporabo in ravnanje z agregometrom Chrono-log corporation 490-4D

49. Turbidimetrija. Dostopano dne 15.09. 2010: <http://supa.pharmacy.bg.ac.rs/assets/1580>

- 50.** Kitchen S, Olson D.J, Preston F.E: International standards in hemostasis. Quality in laboratory hemostasis and trombosis. 1. Izd, Blachwell publising, 2009: 125-34
- 51.** Parramon Editorial Team: Anatomski atlas: vodnik po človeškem telesu, 1.izd., Tehniška založna slovenije, 1997: 52
- 52.** Budavari S: the Merck index, an encyklopedia of chemicals, drugs and biologicals. 2. Izd, Whitehouse Station (New Jersey), 1997
- 53.** Platelet Function Testing. Dostopano dne 13.09. 2010:
<http://diapharma.com/asp/productdetails.asp?ID=100670>