

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**VILEBRANDO LIGOS DIAGNOSTIKOS GAIRIŲ PRAKTINIS TAIKYMAS
DIEGIANT NAUJUS ŽYMENIS**

Magistrantė DOVILĖ PETRONYTĖ _____

(parašas)

Darbo vadovas dr. VALDAS BANYS _____

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir

laboratorinės medicinos katedros vedėja

hab.dr., prof. Z. A. Kučinskienė leidžiama ginti _____

(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

2017 m., Vilnius

TURINYS

SANTRUMPOS	5
1. ĮVADAS	8
1.1. Darbo tikslas.....	9
1.2. Darbo uždaviniai	9
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	10
2.1. Von Vilebrando ligos epidemiologija	10
2.2. vWF geno raiška ir baltymo brendimas	10
2.3. vWF išskyrimas ir fragmentacija	12
2.4. vWF sintezė, saugojimas, sekrecija	12
2.5. Trobocitų ir endotelio ląstelių vWF potransliacinių modifikacijų skirtumai	14
2.6. Kraujo grupės sąsajos su vWF koncentracija	14
2.7. vWF funkcijos.....	15
2.8. vWF ir ADAMTS13.....	17
2.9. vWF domenų funkcijos ir vWL tipai	18
2.10. vWL diagnostika	20
2.10.1. Kraujavimo klinikinis vertinimas.....	20
2.10.2. Atrankiniai laboratoriniai tyrimai	21
2.10.3. Pirminiai vWL diagnostiniai laboratoriniai tyrimai	21

2.10.4. vWL patvirtinimo ir ligos potipių nustatymo tyrimai	23
3. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODAI	28
3.1. Imties tūris tiriamųjų atranka	28
3.2. Tyrimo metodai	28
3.2.1. Koaguliometriniai tyrimai	28
3.2.2. Trombocitų agregacijos tyrimai	29
3.2.3. vWF:Ag tyrimas	30
3.2.4. vWF:CB tyrimas.....	30
3.2.5. vWF aktyvumo tyrimai	31
3.3. Statistinė duomenų analizė.....	32
3.4. Kokybės tikslai pagal biologinės variacijos koncepciją	33
4. REZULTATAI.....	35
4.1. vWF:RCo metodo įdiegimas.....	35
4.2. vWF:CB metodo įdiegimas.....	36
4.3. Aprašomosios statistinės analizės rezultatai	37
4.3.1. vWF:Ag rezultatų analizė	37
4.3.2. vWF:Ac rezultatų analizė.....	37
4.3.3. vWF:RCo rezultatų analizė	41
4.3.4. vWF:CB rezultatų analizė	43

4.4.	vWF:Ac ir vWF:RCo metodų atitikimas	46
4.5.	vWF:RCo metodo poslinkio vertinimas pagal biologinės variacijos koncepciją	48
4.6.	vWF:CB metodo pakartojamumas	49
4.7.	vWF:Ac ir vWF:CB metodų atitikimas	51
4.8.	vWF:CB metodo poslinkio vertinimas pagal biologinės variacijos koncepciją	52
4.9.	Išvestinių rodiklių analizės rezultatai	53
5.	REZULTATŲ APTARIMAS	56
5.1.	Aprašomosios statistinės analizės aptarimas.....	56
5.2.	Rekomendacijų metodo įdiegimui pritaikymas.....	56
5.3.	vWF:RCo metodo vertinimas	58
5.4.	vWF:CB metodo vertinimas	61
5.5.	vWF:RCo ir vWF:CB metodų tinkamumo įvertinimas.....	62
5.6.	Pacientų sergančių vWL ar įtariama vWL atvejų analizė.....	64
5.7.	Pacientų atvejų analizės aptarimas	68
6.	IŠVADOS	69
7.	SUMMARY	70
	PRIEDAI	76

SANTRUMPOS

ADAMTS13 – disintegrinas ir metaloproteazė su 1 tipo trombospondino motyvu, 13 narys (angl. *a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13*) dar žinoma kaip von Vilebrando faktorių skaldanti proteazė

ADP – adenozino difosfatas

ADTL – aktyvuoto dalinio tromboplastino laikas

ASP – arachidono rūgšties sukelta trombocitų agregacija

BAT – priemonė kraujavimui įvertinti (angl. *Bleeding Assessment Tool*)

BS – kraujavimo įvertis (angl. *Bleeding score*)

CK – cisteino mazgas (angl. *cysteine knot*)

CLIA – chemiliuminescentinė latekso dalelių imunoanalizė (angl. *Chemiluminescent Immunoassay*)

CRB – C reaktyvus baltymas

CV – variacijos koeficientas

CV_{anal} – analizės variacijos koeficientas

CV_{BS} – biologinės variacijos koeficientas tarp individų

CV_I – vieno sveiko individo matuojamo laboratorinio rodiklio biologinė variacija

CV_{max} – didžiausias leistinas analizės neglaudumas

DMM – didelės molekulinės masės multimerai

ECAT – organizacija, teikianti tarptautinę išorinio kokybės vertinimo programą laboratorijoms, dirbančioms hemostazės ir trombozės srityje (angl. *the European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Foundation (The ECAT Foundation)*)

ELISA – fermentinė imunoanalizė (angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

FVIII – VIII kraujo krešėjimo sistemos faktorius

FVIII:C – VIII kraujo krešėjimo faktoriaus koncentracija TV/dl arba (%)

ISTH – Tarptautinė trombozių ir hemostazės draugija (angl. *International Society on Thrombosis and Haemostasis*)

LDMM-vWF – labai didelės molekulinės masės von Willebrando veiksnys (angl. *ultra large von Willebrand factor*)

LIA – latekso dalelių imunoanalizė (angl. *Latex Immunoassay*)

NRNDS-AGE – neredukuojanti natrio dodecylsulfato agarozės gelio elektroforezė

OT – optinis tankis

PI – pasikliautinis intervalas

PLT – trombocitų skaičius

PM – pamatinė membrana

Poslinkis_{anal} – analizės poslinkis

Poslinkis_{max} – didžiausias leidžiamas matavimo poslinkis

PT – protrombino laikas

RGD – receptoriaus G prisijungimo domenai (angl. *Receptor G domain*).

RISTO-H – didelės ristocetino koncentracijos sukelta trombocitų agregacija

RISTO-L – mažos ristocetino koncentracijos sukelta trombocitų agregacija

TNS – tarptautinis normalizuotas santykis

TRAP – peptido-6 sukelta trombocitų agregacija

TT vWL – trombocitų tipo von Vilebrando liga

VUL SK – Vilniaus universiteto Santaros klinikos

VUL SK LMC – Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centras

vWF – von Vilebrando faktorius (angl. *von Willebrand factor*)

vWF:Ac – von Vilebrando faktoriaus aktyvumas

vWF:Ag – von Vilebrando faktoriaus antigenas

vWF:Ag – von Vilebrando faktoriaus antigenas

vWF:CB – von Vilebrando faktoriaus geba prisijungti kolageną

vWF:FVIIIIB – von Vilebrando faktoriaus jungimosi geba su VIII krešėjimo faktoriumi (%)

vWF:RCo – von Vilebrando faktoriaus ristocetino kofaktoriaus aktyvumas

vWL – von Vilebrando liga (angl. *von Willebrand disease*)

1. ĮVADAS

Von Vilebrando liga (vWL) – retas paveldimas kraujo krešėjimo sutrikimas. Pirmą kartą aprašytas 1926 m. suomių gydytojo Eriko von Wilebrando (*Erik von Willebrand*), kaip liga pasireiškianti kraujavimais, tačiau besiskirianti nuo hemofilijos. Liga susidomėta dar 1924 m., kai į vieną iš Helsinkio ligoninių pateko kraujuojanti 5 metų mergaitė. Siekiant nustatyti nežinomą kraujavimo priežastį, gydytojas Vilebrandas tyrė pacientę ir 66 jos giminės atstovus. Nustatyta, kad liga dažniau pasireiškia vaikams ir vaisingo amžiaus moterims kraujavimu bei pailgėjusiu kraujo krešėjimo laiku. Taip pat pastebėta, kad kraujo perpylimas padeda ne tik gydant išsivysčiusią anemiją, bet ir mažinant kraujavimus. 1950 metais nustatyta, kad kraujavimų priežastis yra sumažėjusi VIII krešėjimo (FVIII – antihemofilinio baltymo) ir von Vilebrando faktoriaus (vWF) koncentracija. Šie pirmieji radiniai paskatino tolesnius tyrimus. Ilgainiui išsiaiškinti tikslūs vWF struktūriniai pokyčiai ir jų įtaka kraujo krešėjimo procesui. Nustatytos vWF pokyčių sąsajos su vWL tipais. Taip pat tobulintos laboratorinės vWL diagnostikos galimybės. Paaikškėjo, jog tik įvairių tyrimo metodų visuma gali užtikrinti patikimą vWL diagnozę. Šiuo metu Lietuvoje von Vilebrando ligos diagnostiką apsunkina siauras taikomų tyrimų spektras. Tai nesuderinama su tikslia vWL diagnostika. Tiksliai diferencinei diagnostikai būtini metodai galintys įvertinti kiekybinius ir kokybinius vWF pokyčius. Baigiamajame darbe tiriamos naujų von Vilebrando faktoriaus ristocetino kofaktoriaus (vWF:RCo) ir von Vilebrando faktoriaus kolageno jungiamosios gebos (vWF:CB) metodų pritaikymo galimybės.

1.1. Darbo tikslas

Įvertinti von Vilebrando faktoriaus ristocetino kofaktoriaus aktyvumo (VWF:RCo) ir von Vilebrando faktoriaus kolageno jungiamosios gebos tyrimo (VWF:CB) metodų tinkamumą von Vilebrando ligos gairių praktiniam pritaikymui.

1.2. Darbo uždaviniai

1. Įdiegti, išbandyti von Vilebrando faktoriaus ristocetino kofaktoriaus aktyvumo (VWF:RCo) nustatymo metodą ir įvertinti jo charakteristikas.
2. Įdiegti, išbandyti von Vilebrando faktoriaus kolageno jungiamosios gebos (VWF:CB) metodą ir įvertinti jo charakteristikas.
3. Įvertinti von Vilebrando faktoriaus ristocetino kofaktoriaus (VWF:RCo) ir von Vilebrando faktoriaus kolageno jungiamosios gebos (VWF:CB) metodais nustatyto aktyvumo reikšmių naudojimą surogatiniams von Vilebrando ligos žymenims skaičiuoti ir von Vilebrando faktoriaus funkcijoms įvertinti.
4. Atlikti sergančių von Vilebrando liga ir asmenų su įtariama von Vilebrando liga atvejų analizę ir įvertinti naujai įdiegtų metodų (VWF:RCo ir VWF:CB) tinkamumą von Vilebrando ligos diagnostikai.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Von Vilebrando ligos epidemiologija

Von Vilebrando liga – dažniausia paveldima kraujo krešėjimo liga. Sergantys vWL sudaro 1 – 2 % visoje žmonių populiacijoje. Asmens gyvenamoji vieta, kilmė ir rasė neturi įtakos ligos paveldėjimui. Vyrams ir moterims tikimybė paveldėti ligą yra ta pati, tačiau sergančių moterų yra 2 kartus daugiau [1]. Tai siejama su dažnesniu požymių pasireiškimu vaisingame moterų amžiuje. vWL tipų pasiskirstymas sergančiųjų tarpe yra: 1 tipo vWL – 65–80 %, 2 tipo vWL – 20–35 %, 3 tipo vWL – itin reta (1 iš 10⁶ sveikų) [2].

Šiuo metu Lietuvoje von Vilebrando liga yra nustatyta 120 žmonių, iš jų – 12 vaikų. Manoma, kad tokių ligonių galėtų būti apie 300.

Kita vertus, vis dažniau pasigirsta svarstymų, jog vWL derėtų laikyti ne dažniausia paveldima kraujo krešėjimo liga, o reta paveldima kraujo krešėjimo liga. Šiuos siūlymus skatina ligos genetinis heterogeniškumas. Pokyčiai ar jų deriniai lemia įvairų klinikinį pasireiškimą, kuris nebūtinai sukelia žymų sveikatos sutrikdymą. Dalis atvejų lieka nedideliu, todėl sergančiųjų skaičius dažnai nesiekia numanomos 1–2 % paplitimo ribos [3].

2.2. vWF geno raiška ir baltymo brendimas

Von Vilebrando faktorius – didelės molekulinės masės glikoproteinas aptinkamas kraujyje, subendoteliniame užpilde, endotelio ląstelių *Weibel–Paladie* kūneliuose ir trombocitų α granulėse. vWF raiška vyksta nuo 178 kb ilgio geno, esančio 12p13.3. chromosomos srityje. Gene nustatyti 52 egzoni. Egzistuoja dalinė, nefunkcionalinė vWF geno dublikacija 22q11.13 – vWF pseudogenas. Apie 3,1% vWF geno ir vWF pseudogeno DNR sekų yra tapačios, tai apsunkina genetinius vWL tyrimus.

vWF geno raiška vykdoma kraujagyslių endotelio ląstelėse ir megakariocituose. Ląstelės branduolyje sintetinamas pirminis vWF geno produktas iš 2813 amino rūgščių liekanų. Tai – pre-pro-vWF molekulė. Joje iki 22 a. r. liekanų sudaro signalinį polipeptidą, 23–764 a. r. liekanos yra liekamojo propetido dalis, 765–2813 a. r. liekanos sudaro pagrindinį vWF subvienetą (1 priedas. A). Signalinis polipeptidas pre-pro-vWF molekulėje pašalinamas išnašos iš branduolio į endoplazminį tinklą metu. Propetidas ir pagrindinis vWF subvienetas sudaro pro-vWF molekulę, kurioje

struktūriniai domenai išsidėstę šia tvarka: NH₂-D1-D2-D[']-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2 - CK-COOH. Tokia amino rūgščių seka yra mažiausias funkciškai aktyvus vWF vienetas – monomeras (M_r=24 000 g/mol) (1 priedas. B).

Į endoplazminį tinklą (ET) patekusi pro-vWF molekulė, su pašalintu signaliniu peptidu, modifikuojama. Vykdomas N atomų glikozilinimas. N-glikozilinti pro-vWF monomerai jungiasi į dimerus sudarydami tarpmolekulinius disulfidinius tiltelius polipeptidinės grandinės C2 domeno regionuose, kur gausu cisteino liekanų. Ši molekulės vieta dažnai vadinama cisteino mazgu (CK). Dimerizacija prasideda endoplazminiame tinkle dviems pro-vWF molekulėms jungiantis „uodega-uodega“ būdu, polipeptidinės grandinės CK srityse (2 priedas. A). Toliau, pro-vWF dimerai pernešami į Goldžio kompleksą. Čia pro-vWF dimerų molekulės glikozilinamos, jungiant polisacharidines glikanų liekanas prie molekulės O atomų. Trans-Goldžio aparate O-glikozilinta dimero molekulė jungiasi sudarydama disulfidinius ryšius NH₂ galo molekulės srityse, „galva-galva“ būdu (2 priedas. B). Aprašytoje sąveikoje dalyvauja D1 ir D2 domenai. Be to, dimeras įgauna savitą vidinę struktūrą, kai dviejų pro-vWF molekulių A2, A3, D4 subvienetai jungiasi atitinkamomis dalimis. Aprašytą sąveiką ir dimero erdvinę konformaciją lemia joninės aplinkos pasikeitimas. Dimero molekulei judant iš ET, kuriame pH=7,4, į Goldžio aparatą pH vertė nukrenta iki pH=6,2 [4]. Toliau vykdoma dimerų multimerizacija, kai dimerai jungiami į itin didelės molekulinės masės vWF multimerų spiralę (M_r=50·10⁶ g/mol). Multimerizacijos procesas vykdomas endotelio ląstelių *Wabell-Paladie* kūneliuose. *Wabell-Paladie* kūneliuose suformuojami ilgi multimerų kompleksai, kurių forma primena spiralę aplink tuščiaavidurį kanalą. Dimerai į multimerus jungiami sąveikaujant gretimų dimerų D3 domenams. Tarpusavyje susijungę dimerai dėstomi statmenai menamos spiralės ašiai. Erdvėje dimero polipeptidinės grandinės amino galas yra viename lygmenyje su dimero polipeptidinės grandinės karboksi galu, tačiau pastarasis nutolęs, per dimero molekulės ilgį, toliau nuo spiralės centro (2 priedas. C). Formavimo į multimerų spiralę metu, monomerinis struktūros vienetas vis dar pro-vWF molekulė. Pro-vWF molekulėje yra liekamojo propeptido dalis iš D1 ir D2 domenu. Dviems pro-vWF monomerams sąveikaujant atitinkamai D1-D1 ir D2-D2 domenais, palaikoma dimero struktūra. Multimerų spiralėje dimerinė struktūros palaikymas neprasmingas, nes monomerai tarpusavyje jungiasi D3 domenais. Dėl šios priežasties pro-peptidinis D1-D2 domenu fragmentas nuo D3 atskeliamas žinduolių endoproteazės – furino (2 priedas. D). D1-D2 domenu komplekso fragmentas prie multimerų spiralės palaikomas elektrostatiinių glikanų grandinių krūvių dėka. Multimerų spiralės struktūroje tarp skirtingų

funkcinių domenų sudaroma daug vidumolekulinių elektrostatiinių ar disulfidinių ryšių, todėl molekulė kompaktiška ir neaktyvi. Spiralinės pavidalo multimeras sudarytas iš 3500–3700 dimero molekulių. Sekretijos metu multimeras spiralinė išvyniojama. Vidumolekulinė domenų sąveika saugoma. Ryšiai dimere nutrūksta, D1-D2 domenų fragmentai atskyla ir disocijuoja, o ilga linijinė multimeras molekulė išskiriama į kraują ar endotelio nelastelinį užpildą.

Kraujyje, po sekretijos išvyniota multimeras molekulė skaldoma į fragmentus veikiant kraujo plazmos proteazei ADAMTS13 (angl. *a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13*) [4]. Kraujyje cirkuliuojančios VWF molekulės sudarytos iš 30–250 dimero molekulių.

2.3. vWF išskyrimas ir fragmentacija

Endotelio ląstelėse susintetintos LDMM-vWF spiralinės pavidalo multimerai yra itin reaktyvios molekulės. Patekusios į kraują spontaniškai sukelia aktyvią trombocitų agregaciją. Šią reakciją lemia didelė aktyviųjų sąveikos centrų koncentracija molekulėje. Įprastai kraujyje cirkuliuoja mažesnės molekulinės masės multimerai. Jie susidaro sekretijos metu skaldant išvyniojamą multimerų spiralinę trumpesniais fragmentais. Globulinės pavidalo kompaktizuota multimeras spiralinė kraujo srovės poveikyje ištiesiama ir linijizuojama. Šiam procesui itin svarbus A2 domenas. vWF A2 domeno struktūrai nebūdingos sieros turinčios amino rūgštys. Todėl erdvinė vidumolekulinė struktūra ir sąveika su kitais funkciniais domenais palaikoma šoninių a. r. radikalų elektrochemine sąveika. Šis ryšys nėra tvirtas. Kraujo srovės poveikyje A2 domeno amino rūgščių grandinė tiesinama, ilginama. Averiama ADAMTS13 proteazės skėlimo taikinių sekos. Veikiant šiai proteazei multimeras molekulė skaldoma į mažesnius fragmentus. Trumpesnėse vWF multimerų molekulėse yra optimalus skaičius funkcinų aktyvių sąveikos centrų. Trombų susidarymo metu jie sukelia adekvačią reakciją. Be to, sąveikos centrai išsidėstę linijos pavidalo molekulėje yra lengviau prieinami reakcijos veiksniams [5].

2.4. vWF sintezė, saugojimas, sekretija

Dar viena vWF sintezės vieta – kraujagyslių endotelio ląstelės. Šiose ląstelėse susintetinta vWF dalis atlieka reikšmingiausią vaidmenį kraujo krešėjimo ir trombų susidarymo procese. Endotelio ląstelių sintetinas vWF išskiriamas į kraują, nelastelinį užpildą arba saugomas

citoplazmos granulėse – *Weibel–Paladie* kūneliuose [6]. 95% viso endotelio ląstelėse susintetinto vWF išskiriama į kraują. Kraujyje cirkuliuojantis vWF sintetinamas tik kraujagyslių endotelio ląstelėse. Susintetintos vWF molekulės išskiriamos konstitutyvos egzocitozės būdu. vWF sekrecija vyksta neveikiant išoriniam stimuliuojančiam poveikiui [7]. Endotelio ląstelės, be vWF, sintetina ir neląstelinio užpildo komponentus: kolagenus, laminus, fibronektinus, heparinsulfato proteoglikanus, entaktinus (nidogenus) [8]. Endotelio ląstelių susintetintos ir išskirtos neląstelinio užpildo baltymų molekulės formuoja bazinę membraną, ant kurios išsidėsčiusios ir pačios endotelio ląstelės. vWF molekulių aptinkama ir BM, nors didžioji dalis cirkuliuoja kraujo plazmoje. Likusi endotelio ląstelių sintetinamų struktūrinių baltymų ir vWF atsargų dalys saugomos *Weibel–Paladie* kūneliuose. Citoplazmos granulėse saugomas vWF sudaro LDMM-vWF multimerus. Taip pat aptinkama ir nesubrendusio vWF pirmtako pro-vWF molekulių [9]. Citoplazmos granuliu sekreciją skatina uždegimo mediatoriai histaminas ir trombinas. Jų poveikis vykdomas per fosfolipazės C sistemą atveriant Ca^{2+} jonų kanalus. Ca^{2+} jonų koncentracijos pokyčiai endotelio ląstelių citoplazmoje skatina vWF atsargų išskyrimą. Kiti biologiškai aktyvūs baltymai, tokie kaip vazopresinas ir epinefrinas, veikdami per adenilatciklazės sistemą ir didindami Ca^{2+} jonų koncentraciją endotelio ląstelių citoplazmoje, taip pat skatina *Wabell–Paladie* kūnelių degranuliaciją [10].

Dar vienas vWF šaltinis – megakariocitai. Megakariocituose susintetintas Vwf saugomas membraninėse pūslelėse. Kaulų čiulpuose iš megakariocitų citoplazmos fragmentų formuojami trombocitai. Trombocitų vWF sudaro 10–25% viso organizme esančio vWF [11]. Į trombocitų α granulės vWF patenka 2 būdais: po sintezės megakariocituose ir trombocituose ar pinocitozės ir endocitozės būdu, kai vWF pasisavinamas iš kraujo plazmos [12]. Kraujo plokštelių α granulėse saugomi ne tik vWF multimerai, bet ir hemostazės bei uždegimo veiksniai: adhezijos baltymai, citokinai, proteazių inhibitoriai, fibrinogenas, fibronektinas ir trombospondinas. Trombocitų α granulės yra sekrecinės organelės, kurios savo turinį išskiria egzocitozės būdu, tik aktyvius trombocitus. Trombocitų agonistai (pvz. trombinas, epinefrinas, seratoninas, vazopresinas) veikdami per fosfolipazės C sistemą lemia Ca^{2+} jonų koncentracijos padidėjimą trombocitų citoplazmoje. Tai išprovokuoja α granuliu judėjimą link trombocitų išorinės membranos ir turinio sekreciją [13]. Trombocituose saugomo vWF molekulės yra LDMM-vWF multimerų pavidale.

2.5. Trombocitų ir endotelio ląstelių vWF potransliacinių modifikacijų skirtumai

Trombocitų α granulių vWF ir endotelio ląstelių vWF struktūrinė domenų kompozicija yra vienoda. Nepaisant to, endotelio ir trombocitų vWF baltymai skiriasi savo savybėmis ir funkcijomis. To priežastis – skirtingos potransliacinės modifikacijos, priklausančios nuo vWF sintezės vietos. Endotelio ląstelėse sintetinamo vWF multimerai sekretuojami nuolat, o α granulių vWF tik aktyvius trombocitus. Todėl kraujo plazmoje vyrauja vWF susintetinti endotelio ląstelėse. Trombocitų vWF multimerų molekulės efektyviau sąveikauja su integrinu α IIb β 3 ir heparinu, tačiau stebima mažiau gimininga sąveika su GPIIb α . Trombocitų ir endotelio ląstelių vWF asociacijos geba su kolagenu yra vienoda. Šiuos skirtumus lemia skirtingas vWF molekulių glikozilinimo laipsnis. Trombocitų vWF prijungta mažiau sialo rūgšties oligosacharidinių liekanų N-glikozilinimo būdu. Plazmos vWF molekulės N glikozilinamos 50 % daugiau. O glikozilinimas, jungiant mono-, di-, trisialų ar mišraus tipo oligosacharidų grandines yra panašus [14].

2.6. Kraujo grupės sąsajos su vWF koncentracija

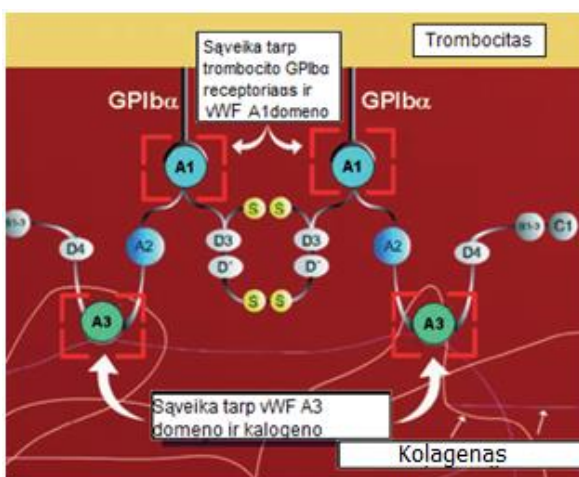
Didžioji dalis kraujo baltymų yra glikozilinti. vWF kaip ir baltymai lemiantys kraujo grupes yra glikoproteinai. Tyrimų metu pastebėtos sąsajos tarp ABO kraujo grupių ir vWF faktoriaus koncentracijos kraujo plazmoje. vWF molekulės su šoninėmis N tipo oligosacharidinėmis grandinėmis pasižymi A ir B grupių antigeninėmis savybėmis. Manoma, jog A ir B tipo antigenai apsaugo vWF nuo degradavimo, todėl ne O grupės (A, B ar AB) asmenų kraujyje nustatytas 25 % didesnis vWF:Ag lygis, nei O grupės individų kraujyje [15].

Įprastai, visoms vWF multimerų molekulėms būdinga H tipo antigeninės savybės lemianti oligosacharidinė grandinė. Endotelio ląstelių Goldžio komplekse aptinkami aktyvūs ABO glikoziltransferazių fermentai. A ir B ar AB tipo asmenų organizme aptiktos A ir B glikoziltransferazės. Šie fermentai vWF multimerų sintezės metu vykdo papildomų A ir B antigeninių oligosacharidinių grandinių prijungimo reakcijas prie jau esančios H tipo oligosacharidinės grandinės. O kraujo grupės asmenų organizme prie H tipo modifikacijos papildoma oligosacharidinė grandinė nejungiama. Manoma, jog papildomu angliavandenilinių grandinių prijungimas lemia vWF atsparumą degraduojančiam ADAMTS13 proteazės poveikiui [16].

2.7. vWF funkcijos

vWF – kraujo plazmos glikoproteinas dalyvaujantis hemostazės procese. VWF atlieka dvi funkcijas: dalyvauja pirminėje trombocitų adhezijoje ir skatina trombocitų sukibimą kraujagyslių pažeidimų vietose, taip pat suriša, stabilizuoja ir perneša VIII krešėjimo sistemos faktorių (FVIII). Pusiausvyra tarp hemostazės ir trombozės palaikomas adekvačia trombocitų sąveika su endotelium ir kitais krešėjimo kaskados elementais. vWF struktūros ir apykaitos pokyčiai lemia kraujo krešėjimo sutrikimus atsiradusius dėl sumažėjusios trombocitų adhezijos ir/arba VIII krešėjimo faktoriaus koncentracijos.

vWF vaidina pagrindinį vaidmenį pirminės hemostazės procese, kuomet pažeidus kraujagyslę kraujo plokštelės sukimba su kraujagyslės endotelium ir nelastelinio užpildo komponentais suformuodami trombocitų kamštį. Įprastoje būsenoje, nepažeistas kraujagyslių endotelis nėra aktyvus. Trombocitų adhezija nevyksta. Pažeidus kraujagyslę, aktyvintos endotelio ląstelės išskiria vWF multimerus. Taip pat pažeidimo metu atidengiamas gilesnis kraujagyslės struktūros sluoksnis – pamatinė membrana, kurios nelasteliniame užpilde saugoma dalis vWF multimerų. Kraujagyslės pažeidimo metu aktyvinama ADAMTS13 proteazė, skaldanti vWF multimerus į mažesnius fragmentus. Kraujagyslės pažeidimo metu kraujo srovės tėkmės krypties pokyčiai veikia vWF struktūrą. Lemiami konformacijos persitvarkymai A1, A2, A3 vWF domenuose, didina jų giminingumą ADAMTS13 proteazei. ADAMTS13 taikiny – vWF multimerų A2 domenas. Tik suskaldyti vWF multimerų fragmentai gali jungtis su pamatinės membranos užpildo struktūriniais baltymais. vWF A3 domenu sąveikaudamas su kolageniniais baltymais įtvirtinamas kraujagyslių endotelio paviršiuje. Toliau vWF veikia kaip trombocitą prijungiantis tarpininkas. Endotelyje įtvirtintas vWF, kitu A1 domenu jungiasi prie trombocitų membranos receptorių komplekso GPIb-IX-V. GPIb-IX-V kompleksas sudarytas iš GPIb α , GPIb β , GPIX, and GPV receptorių. GPIb α – pagrindinis komponentas sąveikoje su endotelio paviršiuje įtvirtintu vWF. GPIb α veiksnio giminingumas vWF didėja stiprėjant kraujo srovės tėkmei.



1 pav. vWF sąveika su trombocitų receptoriais ir neląstelinio užpildo kolagenu

Be to, GPIIb sąveikauja ir su trombinu, kininogenu, krešėjimo faktoriais XI ir XII, trombospondinu 1, integriniais ir P-selektinu, taip skatinama krešėjimo kaskada. Kitas elementas, svarbus kraujo plokštelių adhezijai prie endotelio – trombocitų integrinas α Ib β 3 (arba GPIIb/IIIa). Šis trombocitų membranos baltymas jungiasi su endotelio paviršiuje įtvirtinto vWF veiksnio C galo domenais. Su arba GPIIb/IIIa besijungianti sritis vWF molekulėje vadinama RGD. Pirminė tiesioginė trombocitų adhezija tęsiama trombocitams sudarant trombocitų kamštį. Trombocitų kamštis formuojamas kraujo plokštelėms sąveikaujant tarpusavyje per α Ib β 3 integrinus. Trombocitų adhezija vykdomas tik aktyvius α Ib β 3. Aktyvinimo metu skatinamas α Ib β 3 raiška. Padidėjęs α Ib β 3 skaičius lemia efektyvesnę trombocitų tarpusavio adheziją. α Ib β 3 aktyvinantys ligandai yra vWF asociacija su trombocitų trombinu, ADP ir tromboksanu. Šių krešėjimo kaskados elementų poveikyje susidarantis fibrinas jungiasi su trombocitų α Ib β 3 suformuodamas krešulį. Taip kraujo plokštelės sukimba su kraujagyslės endotelium ir formuoja trombocitų kamštį, kuris užkemša kraujagyslės sienelės defektą [17].

Kraujo plazmoje cirkuliuojantis vWF atlieka kraujo krešėjimo faktoriaus FVIII nešiklio ir stabilizatoriaus funkciją. FVIII yra pagrindinis kraujo krešėjimo kaskados aktyviklis – kofaktorius lemiantis trombocitų adheziją prie endotelio ar koheziją tarpusavyje. Nors FVIII sintetinamas daugelyje žmogaus organizmo ląstelių pagrindinis sintezės šaltinis – kepenys. Kepenyse susintetintas natyvinis FVIII cirkuliuoja kraujyje nekovalentiškai susijungęs su vWF. vWF D' ir D3 domenai yra FVIII prisijungimo sritys. vWF D' ir D3 domenai su FVIII gali sąveikauti tik pašalinus

D1-D2 propetidą. vWF-FVIII kompleksas yra neaktyvus. Jis nesąveikauja su trombocitais ar endotelio ląstelėmis. vWF-FVIII aktyvuojamas trombinui atskeliant FVIII. Be to, laisvas kraujo plazmoje cirkuliuojantis vWF trombiną veikia kaip kofaktorius. Atsiskilęs FVIII verčiamas aktyvia forma FVIIIa. FVIIIa yra krešėjimo kaskados fermentų kofaktorius. Aktyvinto FVIIIa veikla stabdoma veikiant kraujo plazmos baltymui C. Baltymas C veikia kaip antikoaguliantas ir geba proteolitiškai skaldyti FVIIIa, panaikindamas jo koaguliacines funkcijas. Priešingai, vWF pasižymi FVIII stabilizuojančiu ir nuo baltymo C ardančio poveikio apsaugančiu veikimu. Be to, vWF stabdo FVIII sąveiką su lipoproteiniais receptoriais FVIII katabolizuojančiuose baltymuose. Išlaikant balansą tarp prokoaguliacinio ir antikoaguliacinio FVIII poveikio užtikrinamas efektyvus kraujo krešėjimo procesas [18].

2.8. vWF ir ADAMTS13

Žmogaus organizme vWF atsargos saugomos endotelio ląstelėse ir kraujo plokštelėse. Tiek *Wabell–Paladie*, tiek trombocitų α granulėse esantys vWF multimerai pasižymi itin didele molekuline mase. LDMM-vWF multimerams būdingas aukštas polimerizacijos laipsnis. Tačiau įprastai kraujo plazmoje cirkuliuoja ir krešėjimo procese dalyvauja tik endotelio ląstelių susintetintos LDMM-vWF multimerų molekulės. Itin didelės molekulinės masės multimerai yra hiperaktyvios molekulės, lengvai ir greitai aktyvinančios trombų susidarymą. Įvykus ūmiam kraujagyslės endotelio pažeidimui vWF atsargos iš endotelio *Wabell–Paladie* kūnelių, LDMM-vWF multimerų pavidalu, išskiriamos į kraują. Sukeliama spontaniinė stipri ir greita trombocitų agregacija. LDMM-vWF multimerai suskaidomi kraujo plazmos proteazės ADAMTS13. Taip apsaugant organizmą nuo neigiamų padidinto kraujo krešėjimo aktyvumo pasekmių. Itin didelės molekulinės masės vWF multimerai, įprastomis sąlygomis, sveikų žmonių kraujyje neaptinkami. Vos tik išsiskybę suskaidomi kraujo plazmos metaloproteazės ADAMTS13. Šis proteolitinis fermentas skaido vWF multimerą A2 domene, padalindamas LDMM-vWF multimerus į mažesnes molekules. Mažesnės molekulinės masės vWF molekulės atlieka įprastas funkcijas kraujo krešėjimo procese. vWF gene A2 domene metaloproteazės taikinyje įvykusios mutacijos keičia vWF baltymo struktūrą ir padidina ADAMTS13 giminingumą vWF. Suaktyvėjus ADAMTS13 poveikiui fermentas ardo ne tik LDMM-vWF, bet ir įprastos molekulinės masės vWF multimerus. vWF multimerai suskaidyti iki monomerų negali efektyviai dalyvauti krešėjimo procese, todėl kraujo

krešėjimas sutrinka. Pastaroji etiologija būdinga 2A tipo vWL [19]. Kita vertus, ADAMTS13 deficitas ar funkcijos sumažėjimo pokyčiai gali sukelti trombotinę trombocitopeninę purpurą ir kitas ligas susijusias su padidėjusiu kraujo krešėjimu ir trombų formavimusi.

2.9. vWF domenų funkcijos ir vWL tipai

Mutacijos VWF gene lemia, kiekybinius ar kokybinius vWF baltymo struktūros pokyčius ir sutrikusias funkcijas. VWF pakitimai pasireiškia kraujo krešėjimo sutrikimais: menoragija, echimozėmis, kraujavimu iš nosies, dantenu, virškinimo trakto, kraujavimu po dantų traukimo, chirurginių operacijų, nedidelių pjautinių ar brėžtinių žaizdų kraujavimu, kraujavimu į sąnarius arba raumenis. vWL klasifikuojama į 3 tipus: 1 vWL, 2 vWL, 3 vWL. 2 tipo vWL išskiriama į 4 potipius: 2A vWL, 2B vWL, 2N vWL, 2M vWL. 2 tipo vWL potipių skirstymas paremtas vWF kokybinės disfunkcijos etiologija.

1 tipo vWL labiausiai paplitusi vWL forma. Šis ligos tipas paveldima autosominiu dominantiniu būdu. 1 tipo vWD sukelia mutacijos lemiančios sukirpimo klaidas. Taip pat stabdančiosios mutacijos, mažos insercijos ir delecijos. Pokyčiai 5' ne transliuojamoje regione paveikia transkripciją, todėl negaunamas geno raiškos produktas. 1 vWL sukeliančios mutacijos sutrikdo vWF pirmtako dimerų transportavimą ir brendimą. Taip pat paveikiamos struktūros palaikančios vWF multimerų stabilumą. Tai lemia greitą vWF multimerų degradavimą ir mažą funkcionalaus baltymo koncentraciją kraujo plazmoje. 1vWL pasižymi pakitusiais laboratoriniais tyrimų rodikliais. Pokyčiai viename iš dviejų vWF geno variantų lemia sumažėjusią vWF geno produkto koncentraciją kraujyje, kai tinkamos struktūros vWF sintetinamas tik nuo vienos VWF geno kopijos. Ši haplonepakankumo būseną lemia, jog ligonių kraujyje esančių vWF molekulių struktūra yra normali, tačiau koncentracija sumažėjusi. Esantis vWF tinkamai atlieka funkcijas, tačiau įtaka kraujo krešėjimui nepakankama. Dažniausiai liga pasireiškia švelnia forma ir yra lengvai koreguojama. Diagnozės nustatymą apsunkina paveldėjimo tipui būdingas ne visiškasis pasireiškimas ir pasireiškimo kaita šeimos istorijoje. Stebimi FVIII/vWF komplekso komponentų santykio pokyčiai: sumažėję vWF:Ag, vWF:RCo, vWF:Ac ir FVIII:C, nors FVIII:C aktyvumas kraujo plazmoje didesnis nei vWF. FVIII/vWF santykis siekia 1,5–2 [20].

Sergantiems 2 tipo vWD būdingi specifiniai įprastos vWF struktūros pokyčiai, pagal kuriuos 2 vWL skirstoma į A, B, M, N potipius. Sergantiems 2A vWL būdingi kokybiniai vWF

baltymo struktūros pakitimai, lemiantys trombocitų adhezijos sumažėjimą. 2A tipo mutacijos lemia sumažėjusią vWF sąveikos gebą su trombocitų GPIb α . Didžioji dalis pokyčių sukeliančių 2A vWL įvyksta A2, A1, D3 ir CK domenuose. Būdinga didelės ir vidutinės molekulinės masės multimerų stoka, kai įvykusios mutacijos lemia netinkamą vWF multimerizaciją ir padidina ADAMTS13 proteazės poveikį. Stebimi pokyčiai: vWF:Ag ir FVIII išlieka normos ribose ar nežymiai sumažėję, tačiau vWF funkcija nenormali. Tai atspindi sumažėjus vWF:RCo ar vWF:Ac. Sergančių 2B vWL vWF A1 domene įvykusi mutacija padidinanti vWF molekulės gebą jungtis prie trombocitų GPIb α receptoriaus. 2B tipo vWF molekulė be priežasties jungiasi prie cirkuliuojančių trombocitų. Taip pat susidaro reaktyvūs didesnės nei įprasta molekulinės masės plazmos vWF multimerai. Susidaręs kompleksas pašalinamas fibrinolizės sistemos veiksniais, o tai gali sukelti švelnios formos trombocitopeniją. 2M vWL sukelia mutacija A1 vWF domene ir (ar) A3 vWF domene. Pokytis A1 domene lemia sumažėjusią asociaciją su trombocitų receptoriu GPIb α gebą. A3 domeno mutacija riboja sąveiką su kolagenu. Sergantiems 2N vWL būdinga normali cirkuliuojančio vWF ir sumažėjusi FVIII koncentracija. Ligą sukelia keičiančiosios mutacijos D` domene ar propeptido skaidymo taikinyje D3 domene. Jos sumažina vWF ir FVIII jungimosi gebą. Ligos požymiai primena hemofilijos A simptomus, tik čia priežastis ne FVIII, o vWF.

3 tipo vWL būdinga tai, jog kraujo plazmoje yra visiškai vWF deficitas. 3 vWL paveldima autosominiu recesyviniu būdu. Susirgimas itin retas. Sergančiojo abu tėvai serga švelnia vWL forma. Dažniausia, 3 vWL sukelia stabdančios ir skaitymo rėmelio poslinkio mutacijos, tačiau nustatyta ir didelių delecijų, sukirpimo taikinio klaidų ar keičiančiųjų mutacijų. Mutacijos pasiskirsčiusios visame gene. Dažniausiai unikalios kiekvienai sergančiai šeimai. 2,6–9,5 % visų sergančiųjų 3 vWL sudaro tie, kurių organizme gaminami autoantikūnai prieš vWF. Sergančiųjų 3 vWL tipo liga dėl vWF deficito trombocitai negali būti aktyvinami. 3 vWL pasižymi pakitusiais laboratorinių tyrimų rodikliais. Stebimi vWF kiekiai kraujo plazmoje yra labai maži arba visai nenustatomi, itin sumažėjusi ir FVIII koncentracija. [21].

Egzistuoja dar vienas retas krešėjimo sutrikimas primenantis vWL. Tai – tromboctų tipo vWL (TT vWL), dar vadinama pseudo-vWL. Liga paveldima autosominiu dominatiniu būdu. Pasaulyje aprašyta mažiau nei 50 ligos pasireiškimo atvejų [22]. TT vWL sukelia struktūriniai trombocitų glikoproteino GPIb pokyčiai. Šis membraninis baltymas yra vWF receptorius. Pakitus pastarojo struktūrai vWF negali jungtis prie trombocitų ir dalyvauti krešulio susidaryme. Kliniškai pasireiškiantys kraujavimo simptomai primena vWL, tačiau čia priežastis ne vWF, o trombocitų

GPIb. Diagnozuojant TT vWL svarbu ligą diferencijuoti nuo 2B vWL. Šiems krešėjimo sutrikimams būdinga trombocitopenija, sumažėję vWF ir FVIII aktyvumai, padidėjęs jautrumas ristocetinui trombocitų agregacijos tyrime (RIPA-H ir RIPA-L), sumažėjęs vWF aktyvumas vWF:RCo, sumažėjusi vWF kolageno jungiamoji geba ir didelės molekulinės masės multimerų stygius. Siekiant atskirti 2B vWL nuo TT vWL siūloma atlikti genetinius tyrimus [23].

2.10. vWL diagnostika

Pacientai, kuriems pasireiškia kraujavimas ir įtariama vWL, įvertinami kliniškai ir tiriama laboratoriniais metodais. Dažnu atveju ligos diagnozavimas nėra lengva užduotis. vWF – daugiafunkcinis krešėjimo procese dalyvaujantis elementas. Už kiekvienos funkcijos vykdymą atsakingi skirtingi struktūriniai elementai. Esant bet kuriam vWF multimerų defektui kliniškai tai pasireiškia vienu simptomu – kraujo krešėjimo sutrikimu. Ligos kompleksiskumas lemia platų diagnostinių metodų spektrą, kuriame dalis metodų geriausiai atspindi tik savitą baltymo pokytį ir vWL formą.

2.10.1. Kraujavimo kliniškas vertinimas

Parengtos ISTH (Tarptautinė trombozių ir hemostazės draugija, angl. *International Society on Thrombosis and Haemostasis*) rekomendacijos padedančios surinkti anamnezę ir kraujavimo klinikinį pasireiškimą. Remiantis jomis patogu įvertinti buvusį ar užsitęsusį odos ar gleivinių kraujavimą, išsiaiškinti simptomų ar ligos pasireiškimą šeimoje. Naudojant 2010 m. ISTH parengtą BAT (priemonė kraujavimui įvertinti, angl. *Bleeding Assessment Tool*) klausimyną kiekybiškai nustatomas kraujavimo įvertis (BS, angl. *Bleeding score*). Manoma, jog BS > 3 suaugusiems vyrams ir BS > 5 suaugusioms moterims nurodo apie galimą vWL, su 64,2 % jautrumu ir 99,1 % specifiškumu. Jaunesnio amžiaus pacientams taikomas pediatrinis klausimynas. Manoma, jog esant BS > 2 tikėtina vWL, esant 83 % jautrumui ir 79 % specifiškumui ir 0,14 teigiamai ir 0,99 neigiamai prognostinei vertei [24]. Atlikti tyrimai rodo stiprią priklausomybę tarp kraujavimo įverčio ir laboratorinių diagnostinių testų verčių. BS galima laikyti patikima pirmine, atrankine priemone aptikti sergančius vWL ar įvertinti gydymo taktikos tinkamumą sergantiems [25].

2.10.2. Atrankiniai laboratoriniai tyrimai

Pradinio įvertinimo metu (anamnezė ir fizinio ištyrimo) nustatytus galimą vWL taikomas pirminis–atrankinis laboratorinis vertinimas. Visų pirma, pasitelkiami bendraklinikiniai ir bendriniai hemostazės tyrimai: bendras kraujo tyrimas, kraujavimo laiko nustatymas, trombocitų funkcijų tyrimai, aktyvuoto dalinio tromboplastino laiko (ADTL) ir protrombino (PT) laiko nustatymas.

Pirminės hemostazės sistema, kurioje svarbiausią vaidmenį atlieka trombocitai įvertinama atlikus bendrą kraujo tyrimą ir trombocitų funkcijų tyrimus (pavyzdžiui, „PFA-100“ (*Siemens Healthcare Diagnostics*) analizatoriumi). Šie tyrimai nepasižymi informatyvumu ir aukšta vWL diferencine geba. Bendro kraujo tyrimo rezultatai su trombocitopenija nustatomi tik tiriant pacientus sergančius retomis 2B vWL ir TT vWL formomis [26]. Nors trombocitų funkcijų tyrimai buvo laikomi daug žadančiu metodu, reikšmingai pasitarnausiančiu atrenkant sergančius vWL, ilgainiui paaiškėjo, jog metodui stinga jautrumo (jis siekia tik 30–80 %). Tiesa, šie tyrimai gali praversti vWL diferencijuojant nuo kitų paveldimų kraujo krešėjimo ligų, tokių kaip Glanzman'o trombastenijos ir Bernard–Soulier sindromo [27].

Vystantis ir tobulėjant laboratorinės diagnostikos sričiai kraujavimo laiko nustatymas, kaip invazinė procedūra, nėra rekomenduojamas tyrimais. Juo labiau, šis metodas stokoja specifiškumo, ir jautrumo (tesiekia 30 %) [28].

Antrinės hemostazės tyrimai PT, ADTL gali būti viena iš atrankinių priemonių, tačiau jų diagnostinė vertė maža. Ženkliai pailgėjęs ADTL nustatomas esant sunkiai vWL formai – 3vWL arba 2N vWL. Sergantiems šių tipų vWL ADTL prailgėjimą lemia sumažėjusi FVIII koncentracija. FVIII koncentracijos sumažėjimas gali būti tik minėtų formų vWL atveju, tačiau būtina diferencijuoti su hemofilijos. Dažnu atveju ADTL yra normalus ar pailgėjęs neženkliai. PT tyrimas atspindi išorinio ir bendrojo krešėjimo kelio veikimą, todėl vWL ligos atveju PT prailgėjimas nestebimas. Aukšta diagnostine galia nepasižymi ir fibrinogeno koncentracijos nustatymas. Jis vWL ligos atveju nekinta. PT ir fibrinogeno koncentracijos tyrimai pasitarnauja kaip priemonė atmesti kitas kraujavimo priežastis [29].

2.10.3. Pirminiai vWL diagnostiniai laboratoriniai tyrimai

Įvertinus klinikinį kraujavimo pasireiškimą, bendrinius krešėjimo sistemos rodiklius ir pastebėjus reikšmingus nukrypimus taikomi specifiniai vWL tyrimai: von Vilebrando faktoriaus

antigeno (vWF:Ag), von Vilebrando faktoriaus ristocetino kofaktoriaus (vWF:RCo) ir/ar von Vilebrando faktoriaus aktyvumo (vWF:Ac) tyrimai.

Taikant vWF:Ag metodą vWF aktyvumas įvertinamas kiekybiškai (% arba U/dl). Ne veltui tyrimo objektas – vWF įvardinamas kaip antigenas. Nustatant vWF vykdoma imunologinė reakcija, kurioje tikslinis vWF baltymas atpažįstamas monokloninių ar polikloninių antikūnų pagalba, fermentinė imunoanalizės (ELISA, angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) ar latekso dalelių imunoanalizės (LIA, angl. *Latex Immunoassay*) metodikomis. Pastarieji antigeno nustatymo principai, dažniausiai naudojami ir vWL diagnostikoje. Jie abu pasižymi dideliu jautrumu ir pakartojamumu. Nors ir metodų tikslumas panašus, dažniau naudojama LIA metodika. To priežastys – lengvesnis pritaikymas daugiafunkciniuose krešėjimo analizatoriuose, trumpesnė ir mažiau stadijų turinti reakcijos eiga. Kaip bebūtų, pasitaiko atvejų kai LIA tipo reakcijose pacientų kraujyje esantis reumatoidinis faktorius ar heterofiliniai antikūnai sukelia nespecifines reakcijas. Tokiu atveju nustatomos klaidingai didelės vWF koncentracijos. Taikant ELISA principus panašūs atvejai neaprašyti. Manoma, jog to priežastimi gali būti papildomi plovimai, pašalinantys nespecifines sąveikas sukeliančius veiksnius. Šiuo metu egzistuoja ir sėkmingai taikoma kita ELISA ir LIA variacija – chemiliuminescentinė latekso dalelių imunoanalizė (CLIA, angl. *Chemiluminescent Immunoassay*). Manoma, jog metodas pasižymi žemiausia galima variacija ir didžiausiu jautrumu [30]. Ne tik techniniai parametrai gali lemti vWF koncentracijos kitimus. Jai įtakos turi paciento kraujo grupė (O kraujo grupės pacientams nustatoma 20–30 %), amžius, rasė, stresas, nėštumas, uždegiminiai procesai [29]. vWF:Ag tyrimas yra palankus metodas įvertinti kiekybinius vWF pokyčius, todėl gali turėti reikšmingą diagnostinę vertę 1vWL ir 3vWL atvejais. Tiesa, lengvos 1 tipo vWL atveju antigeno koncentracija tik gali būti nesumažėjusi. Siekiant įrodyti 1 tipo vWF būtina atsižvelgti į minėtus metodinius ar fiziologinius aspektus. Esant kokybiniais vWF pokyčiams – 2 tipo vWL atveju, vWF:Ag normalus arba neženkliai sumažėjęs, todėl šis metodas tik iš dalies tinkamas 2 vWL tipo potipių diferencijavimui.

vWF funkcija ir geba sąveikauti su trombocitais gali būti įvertinama keletu metodų. vWF:RCo yra vienas iš būdų nustatyti vWF jungimosi prie trombocitų gebą. Ankščiau metodas laikytas „aukso standartu“, tačiau šiuo metu metodo svarba mažėja. Ristocetino inicijuota trombocitų agregacija pagrįstiems tyrimams būdinga aukštas pakartojamumo ir atkuriamumo variacijos koeficientas siekiantis iki 40 %, žemas jautrumas ir glaudumas. Taip pat aukšta detekcijos riba (10–20 %). Siekiant sumažinti minėtus trūkumus sukurta nauja alternatyvi vWF:RCo metodika.

Kai su vWF sąveikauja su rekombinantinis ant standartinių trombocitų imobilizuotais GPIb receptoriais, kuriuose įvykdytos mutacijos lemia vWF jungimąsi prie trombocitų be ristocetino poveikio (tiriamojame darbo dalyje šia metodika pagrįstas tyrimas laikytas etaloniniu, sutrumpintai žymimas vWF:Ac). Atsisiūsi antibiotiko išvengiama anksčiau minėtų metodo trūkumų [31].

2.10.4. vWL patvirtinimo ir ligos potipių nustatymo tyrimai

vWL ligos potipiams nustatyti taikomi specialūs tyrimai: FVIII:C, vWF:FVIIIIB, vWF:CB, trombocitų agregacijos tyrimai su cheminiais agonistais, molekuliniai–genetiniai tyrimai, vWF multimerų tyrimas. FVIII:C, vWF:CB ir trombocitų agregacijos tyrimai gerai atspindi kiekybinius vWF pokyčius, todėl gali būti taikomi ir kaip pirminiai vWL diagnostiniai tyrimai, vWF funkcijai įvertinti.

Kraujyje vWF cirkuliuoja susijungęs su FVIII. vWF stabilizuoja FVIII ir prailgina FVIII cirkuliacijos laiką. FVIII tyrimai skirti kiekybiniam ir funkciniam veiksnio įvertinimui. FVIII:C tyrimas atspindi FVIII aktyvumą tiesiogiai proporcingą FVIII koncentracijai kraujyje. vWF:FVIIIIB tyrimas skirtas vWF funkcijoms nustatyti, kai įvertinama vWF jungimosi su FVIII geba. Pastarieji tyrimai taikomi 2N potipio vWL nustatymui ir hemofilijos diferencinei diagnostikai. Hemofiliją atskleidžia tik FVIII rodiklių pokyčiai, kai vWL išlieka normalus. Ženkliai sumažėjęs FVIII aktyvumas ar jungimosi su vWF geba gali būti vienintelis rodiklis atspindintis vWL, kuomet vWF:Ag, vWF:Ac, vWF:RCo išlieka normalūs. Be to, FVIII tyrimų rezultatų pokyčiai ne visada proporcingi vWF tyrimų rezultatų pokyčiams. Todėl laboratoriniais tyrimais įvertinus tik vWF, vWL diagnozė gali būti klaidingai atmeta. Tiek FVIII:C tiek ir vWF:FVIIIIB tyrimų metodikos pagrįstos ELISA reakcijų principu, todėl galimas rezultatus iškreipiantis gretutinių veiksnių poveikis neaktualus, kai išlaikytos tinkamos reakcijos sąlygos [32]. vWF:FVIIIIB tyrimai įgavo reikšmingą diagnostinę vertę tik 2011 metais, sukūrus ir pristačius komercinį produktą skirtą vWF jungimosi su FVIII gebai nustatyti [33].

vWF:CB tyrimas suteikia galimybę įvertinti vWF faktoriaus gebą jungtis su kolagenu. Šiuo tyrimu gali būti įvertinti ne tik izoliuoti vWF:CB gebos pakitimai, bet ir bendras vWF funkcinis aktyvumas. Tyrimo universalumas pagrįstas vWF geba sąveikauti su įvairių rūšių kolagenu. DMM-vWF jungiasi prie I ir III tipo kolageno A3 vWF domenu, IV ir VI tipo kolagenas taip pat sąveikauja su vWF, bet A1 vWF domenu. Sąveikoje su kolagenu reikšminga įtaką hemostazei turi tik DMM-

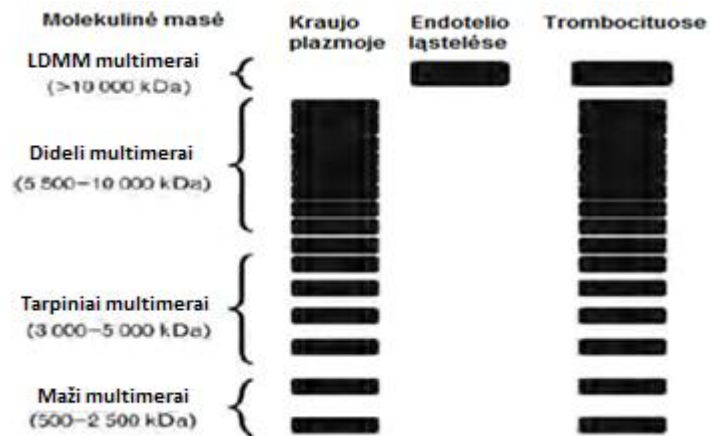
vWF. Įprastos ar mažos molekulinės masės multimerai gali sąveikauti su vWF, bet poveikis kraujo krešėjimui minimalus. 2A ir 2B vWL potipiams būdingas DMM-vWF deficitas, todėl stebimas ženklus vWF:CB aktyvumo sumažėjimas. 1 ir 3 tipo vWL vWF:CB aktyvumas pakitęs, dėl visos multimerų kompozicijos dalinio ar visiško deficito. vWF:CB tyrimo metodas pagrįstas ELISA reakcija. Šiuo metu egzistuoja, tačiau klinikinėje laboratorinėje diagnostikoje netaikoma, CLIA reakcija pagrįstas vWF:CB. Esminis vWF:CB metodo trūkumas yra ribota kolageno tipų kompozicija reakcijos mišinyje [34]. Įprastai reakcijos šulinėliai padengti tik vieno ar dviejų kolageno tipų mišiniu. Idealiu atveju reakcijoje turėtų dalyvauti visi keturi vWL diagnostikai aktualūs kolageno tipai. Priešingu atveju, nustačius tinkamą vWF:CB aktyvumą sąveikoje su vieno tipo kolagenu, nepaneigiama galimybė, jog įvykę pokyčiai išryškės tik sąveikoje su kito tipo kolagenu. Šiuo metu rinkoje populiariausi vWF:CB reakcijų rinkiniai su pavieniais I ar III tipo kolagenais ar jų mišiniu. Išskirtinis vWF:CB metodo privalumas – aukštas pakartojamumas ir atkuriamumas. Dėl šios priežasties, vWF gali būti alternatyva vWF:RCo tyrimui [35]. Kita vertus sukūrus geromis metodinėmis charakteristikomis pasižymintį vWF:Ac metodą (vWF:RCo atitikmenį), nebelieka poreikio jį pakeisti vWF:CB, kuris nors ir patikimai vertina kiekybines ir kokybines funkcija, tačiau yra specializuotas jungimosi su kolagenu gebai nustatyti. Be to, vWF:CB kritikuojamas dėl standartizacijos stokos. Įvairiuose laboratorinės diagnostikos centruose naudojami metodai besiskiriantys, kolagenų kompozicija ir automatizacijos galimybėmis [36].

Trombocitų agregacijos tyrimai taikomi vWF potipio nustatymui ir kitų trombocitopatijų ekskliudavimui. Šie tyrimai skiriasi nuo aptartų metodų, tuo jog reakcijos mišinyje dalyvauja ne tik tiriamojo vWF, bet ir trombocitai. Tai lemia, kad tiriamuoju objektu tampa ir kraujo plokštelės. Agregacijos tyrimai su didelės ir mažos koncentracijos ristocetinu (RIPA–H ir RIPA–L) specializuoti vWF ir trombocitų GPIb sąveikai nustatyti, kai ristocetinas inicijuoja vWF konformacijos pokyčius lemiančius priverstinę sąveiką su GPIb ir trombocitų agregaciją. vWF kiekybinių ar kokybinių pokyčių atveju ristocetino įtakos agregacijai nepakanka ir krešulys nesusidaro. Išskyrus 2B vWL atveju, kai funkcijos įgavimo mutacija sukelia neadekvatų (padidėjusį) agregacijos aktyvumą. Šio vWL potipio atveju pakanka net mažų ristocetino dozių (RIPA-L), kad vyktų trombocitų telkimasis į sankaupas, kai įprastai žema antibiotiko koncentracija negali sukelti agregacijos. Vadinasi, jei stebimas mažos ristocetino dozės sukulto trombocitų agregacijos aktyvumo padidėjimas, įtariama 2B vWL arba TT vWL. Šių sutrikimų diferencinei diagnostikai RIPA-L tyrimas nepakankamai informatyvus. Tyrimas neatskleidžia, kuris tarp sąveikaujančių

objektų (trombocito GPIb ar vWF domenas sąveikaujantis su GPIb) yra pakitęs. Tiksliai diagnostikai būtini genetiniai tyrimai. Tuo tarpu, įprastos koncentracijos RIPA 2B vWL ir TT vWL atveju išlieka normos ribose ar padidėjęs. 1 ir 3 tipo vWL atveju RIPA-H ir LRIPA-L aktyvumai sumažėję ar nedetektuojami, o 2A, 2N ir 2M vWL atveju sumažėję ar normos ribose. Visais atvejais sumažėjęs RIPA-L aktyvumas diagnostinės vertės neturi, nes maža ristocetino koncentracija negali inicijuoti trombocitų agregacijos [37]. Agregacijos tyrimai su epinefrino, ADP, arachidono rūgšties, peptido-6 agonistais skirti nustatyti paveldimoms (Glansmann'o trombastenija, Bernard-Soulier sindromui, trombocitų granulių kaupimo liga) ar įgytoms trombocitopatijoms [38].

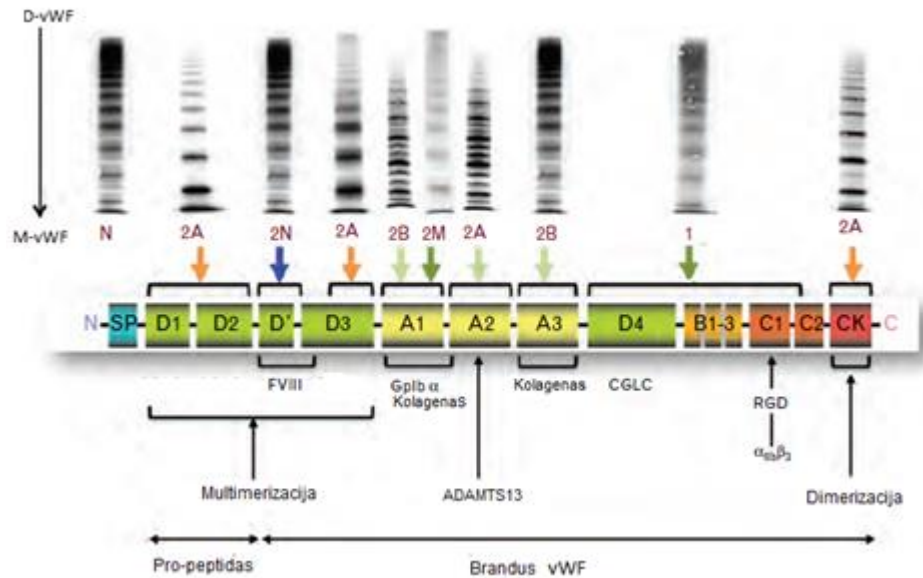
Iki šiol aptarti fenotipiniai vWL tyrimai suteikia plačias galimybes patikimai vWL diagnostikai, tačiau vWL – paveldima liga. Tikslią etiologiją įvardinti gali tik genetiniai tyrimai. vWF genas užima sąlyginai didelę 178 kb seką žmogaus genome. Ilgų sekų nustatymas ir analizė reikalauja didelių finansinių, techninių ir laiko išteklių, todėl dažnai sunkiai suderinamas su rutinine laboratorine diagnostika. Siekiant optimalaus varianto genetiniai tyrimai vWL diagnostikai nerekomenduojami [39].

Kraujo plazmoje cirkuliuojantys vWF multimerai – didelės molekulinės masės polimerai. Molekulių polimerizacijos laipsnis siekia 60–250 [4], t. y. vienoje polimero molekulėje vWF dimeras (mažiausias struktūros vienetas) pasikartoja nuo 60 iki 250 kartų. Cirkuliuojančių įvairaus polimerizacijos laipsnio vWF multimerų molekulinė masė 800–20 000 kDa. Ne patologinėje žmogaus organizmo būsenoje skirtingos molekulinės masės multimerų molekulių kompozicija yra pastovi. Sudaryta iš mažos, tarpinės, didelės ir labai didelės molekulinės masės multimerų. Mažus vWF multimerus (500–2500 kDa) sudaro 1–5 dimerų molekulės. Šie multimerai, dėl itin mažo skaičiaus jungimosi centrų, hemostazėje nedalyvauja. Jie atlieka FVIII nešiklio funkciją. Tarpinius vWF multimerus (3000–5000 kDa) sudaro 6–10 dimerų molekulės. Šie multimerai, dėl nedidelio skaičiaus trombocitų jungimosi centrų, hemostazėje dalyvauja retai. Svarbiausia funkcija yra dalyvauti FVIII transporte ir stabilumo palaikyme. Didelius vWF multimerus (5500–10 000 kDa) sudaro 11–20 dimerų molekulių. Šie multimerai, dėl didelio skaičiaus trombocitų jungimosi centrų, aktyviai dalyvauja hemostazėje ir vykdo FVIII nešiklio funkciją. Labai didelius vWF multimerus (>10 000 kDa) sudaro >20 dimerų molekulių. Šie multimerai neaptinkami cirkuliuojantys kraujyje. Jie saugomi trombocitų α granulėse ar endotelio ląstelių *Wabell-Paladie* kūneliuose. Jie saugomi atsargose ir išskiriami į kraujotaką tik aktyvius krešėjimo procesus [40]. Elektroforezės profilio skirtumus tarp skirtingų multimerų šaltinių vaizduoja 2 paveikslas.



2 pav. Multimerų elektroforezės profiliai kraujo plazmoje, endotelio ląstelėse ir trombocituose.

Sveikų asmenų multimerų elektroforezės profilis pastovus, pasižymintis būdinga kompozicija. Patologijos atveju stebimi kraujo plazmos VWF multimerų molekulių rinkinio pasikeitimai. Sergančių 1 tipo vWL kraujo plazmoje sumažėjusi vWF koncentracija. Stebimos mažesnio intensyvumo vWF multimerus atitinkančios juostos. Tai atspindi mažesnę vWF koncentraciją tiriamoje kraujo plazmoje. Sergančių 2A vWL kraujo plazmoje aptinkama didelės, tarpinės molekulinės masės multimerų stoka ir didesnė mažos molekulinės masės padidėjimas. Taip pat elektroforezės gelyje matomos tarpinės juostelės nepriklausančios standartinio dydžio multimerams. Sergančių 2B vWL kraujo plazmoje nustatoma tik didelės molekulinės masės multimerų stoka, todėl elektroforezės gelyje nėra šių molekulinę masę atitinkančių juostelių. Sergančių 2N vWL ir 2M vWL kraujo plazmoje aptinkami normalaus dydžio ir koncentracijos multimerų kompozicija, tačiau šių multimerų funkcijos pakitusios. Funkcijų defektų kraujo plazmos vWF multimerų elektroforezė neatspindi. 2N vWL ir 2M vWL asmenų tyrimo metu nustatomas tik multimerų pasiskirstymo profilis, todėl šis metodas nėra tinkamas pastarųjų vWL tipų nustatymui ir diferencijavimui. Būtina taikyti vWF:Ag, VWF:CB ir vWF:FVIII tyrimo metodus. Sergančių 3VWL kraujo plazmoje yra visiškai vWF deficitas, todėl stebimas visiškai tuščias multimerų pasiskirstymo profilis.



3 pav. Sergančių 1vWL, 2AvWL, 2BvWL, 2NvWL, 2MvWL ir 3vWL kraujo plazmos vWF multimerų NRNDS-AGE profiliai.

Apibendrinti laboratorinių rodiklių pokyčiai būdingi skirtingiems vWL tipams pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. vWL laboratorinių tyrimų rezultatų pokyčiai

Tyrimas	1 vWL	2A vWL	2B vWL	2M vWL	2N vWL	3 vWL	TT vWL
Kraujavimo laikas ar „PFA-100“	n/↑	↑	↑	↑	n	↑↑	↑
vWF:Ag	↓	n/↓	n/↓	n/↓	n	↓↓↓	n/↓
vWF:RCo ar vWF:Ac	↓	↓↓	↓↓	↓↓	n	↓↓↓	↓
FVIII:C	n/↓	n/↓	n/↓	n/↓	↓↓	↓↓	n/↓
vWF:RCo*/vWF:Ag	>0,6	<0,6	<0,6	<0,6	>0,6	Netaikoma	<0,6
RIPA-L	n/↓	↓↓	↑	↓↓	N	Nenustatoma	↑
Multimerų analizė	n	Stoka DMM	Stoka DMM	n	N	Nenustatoma	Stoka DMM
vWF:FVIII B	n	n	n	n	↓↓	Netaikoma	n
vWF:CB	↓	↓↓	↓↓	n/↓	n	↓↓↓	↓

3. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODAI

3.1. Imties tūris tiriamųjų atranka

Iš viso tirti 29 asmenys. Tiriamieji priklauso 2 grupėms: pirmą grupę sudaro 20 atsitiktinai atrinktų asmenų; antrą grupę sudaro 9 pacientai sergantys vWL arba nepatikslingais krešėjimo sutrikimais, arba įtariama vWL. Kadangi vWF – ūmios fazės baltymas, siekiant išvengti atrinkti tiriamuosius uždegiminėje būklėje, vykdyta pirmos grupės tiriamųjų atranka atsižvelgiant į fibrinogeno, CRB rodiklius. Taip pat vengiant pacientų su krešėjimo sistemos defektais atsižvelgta į PT, ADTL rodiklius. Atsitiktinai atrinktų asmenų grupę sudaro 10 vyrų (50 %) ir 10 moterų (50 %), kurių bendras amžiaus vidurkis yra 56 metai. Atsitiktinai atrinktų pacientų kraujo plazmoje nustatytos vWF:RCo, vWF:CB, vWF:Ag ir vWF:Ac vertės. Antrąją grupę sudarė tiriamieji su diagnozuota ar įtariama vWL iš Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų filialo, Vaikų ligoninės Onkohematologijos skyriaus.

3.2. Tyrimo metodai

Laboratoriniai tyrimai buvo atliekami Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros klinikinėje bazėje – Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro (VUL SK LMC) Biochemijos laboratorijoje. Taip pat Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų filiale vaikų ligoninėje. Sergantiems vWL pacientams atlikti šie tyrimai: koaguliograma (PT, ADTL, fibrinogenas); agregometrija visame kraujyje; specialūs vWL diagnostikai skirti tyrimai.

3.2.1. Koaguliometriniai tyrimai

Fibrinogeno, aktyvuoto dalinio tromboplastino laiko, protrombino laiko ir VIII faktoriaus tyrimai atlikti „STA Compact“ (Diagnostica Stago, Prancūzija) analizatoriumi tiriant kraujo plazmą su 3,8 % natrio citrato antikoagulantu. Prieš tyrimus plazma paruošiama kraujo ėminių centrifuguojant 10 min prie 2000 g inercinės jėgos sąlygomis. Tyrimai atlikti kraujo ėmimo dieną. Naudotame analizatoriuje įdiegta automatizuota elektromagnetinė-mechaninė krešulio susidarymo detekcijos sistema, kurioje matuojamas krešulio susidarymo laikas.

Fibrinogeno koncentracijos nustatymas paremtas krešulio susidarymo laiko nustatymu, kuris tiesiogiai proporcingas fibrinogeno koncentracijai. Fibrinogeno koncentracija kraujo plazmoje nustatyta Klausso metodu. Esant trombino pertekliui, aktyvinamas skiestoje paciento plazmoje esančio fibrinogeno virtimas fibrinu. Fibrinogeno pamatinių biologinių verčių intervalas 2–4 g/l.

Aktyvinto dalinio tromboplastino laikas nustatytas chronometriniu būdu skaičiuojant krešėjimo laiką, kai neskiesta pacientų plazma lygiomis dalimis sumaišoma su rekalcifikuotu kefalinu (trombocitų pakaitalu) ir silicio dalelių mišiniu. ADTL pamatinių biologinių verčių intervalas 28–40 s.

Protrombino laiko metodika pagrįsta Owreno metodu. PT pamatinių biologinių verčių intervalas 70–130 %, 21–29 s, TNS 0,9–1,19.

VIII faktoriaus aktyvumas nustatytas chronometriniu būdu matuojant skistos plazmos ir rekalcifikuoto kefalino ir kaolino mišinio krešėjimo laiką. VIII faktoriaus aktyvumas apskaičiuojamas naudojant priklausomybę $\log(c) = -(a \times \log(t)^2) + (b \times \log(t)) - d$, kur c – VIII faktoriaus aktyvumas (%); t – gauti krešėjimo rezultatai (s); a, b, d – koeficientai gauti kalibracijos metu. FVIII aktyvumo pamatinių biologinių verčių intervalas 60–150 %.

3.2.2. Trombocitų agregacijos tyrimai

Trombocitų agregacijos tyrimai atlikti „Multiplate analyzer“ (Roche Diagnostics, JAV) analizatoriumi. Analizatoriaus veikimas pagrįstas elektrinio impedanso (elektrinės varžos) pokyčių matavimu. Elektrinės varžos kitimus lemia cheminių medžiagų – agonistų inicijuota trombocitų agregacija viso kraujo ėminyje. Skirtingi agonistai aktyvina atitinkamas trombocitų struktūras ir sukelia jų sulipimą. Trombocitų sankaupos ant „Multiplate“ analizatoriaus elektrodų didina elektrinę varžą, kurios pokytis išreiškiamas agregacijos vienetais (AU) kintančiais laike. Trombocitų agregacijos priklausomybę laike vaizduojant grafiškai gaunamas plotas po kreive ($AUC = AU \times \min$) atspindintis bendrą trombocitų agregacijos aktyvumą. Kreivės aukštis (atspindintis agregaciją) ir nuolydis (atspindintis agregacijos greitį) – parametrai, kurie gali būti vertinami atskirai.

Trombocitų agregacija tirta naudojant adenozino difostato („ADPtest“), arachidono rūgšties („ASPItest“), trombino receptorių aktyvinančio peptido-6 (TRAP) („TRAPtest“), ristocetino („RISTOtest“) agonistus iš „Roche Diagnostics“ (Vokietija). Prieš tyrimą šie reagentai buvo ruošiami pagal gamintojo nurodymus.

Trombocitų agregacijos tyrimai atlikti iš viso veninio kraujo su ličio heparino antikoaguliantu. Tyrimai atliekami kraujo ėmimo dieną, nešaldomi. Reakcijos mišinį sudaro 37°C 300 µl 0,9 % NaCl tirpalo ir 300 µl heparinizuoto kraujo. Šis mišinys 3 min inkubuojamas 37°C temperatūroje. Vėliau įdedama 20 µl atitinkamo iki darbinės koncentracijos paruošto ADP, arahidono rūgšties ar TRAP agonisto. Tiriant ristocetino indukuotą trombocitų agregaciją įdedama 12 µl iki darbinės koncentracijos praskiesto ristocetino tirpalo, siekiant ištirti mažos ristocetino koncentracijos inicijuotą trombocitų agregaciją ir 50 µl iki darbinės koncentracijos praskiesto ristocetino tirpalo, siekiant ištirti didelės ristocetino koncentracijos inicijuotą trombocitų agregaciją. Trombocitų agregacijos intensyvumas matuojamas 6 min. Pamatinių biologinių verčių intervalas ADP 57–113 AU; ASP 71–115 AU; TRAP 84–125 AU; RIPA-H 98–180 AU; RIPA-L 13–69 AU.

3.2.3. vWF:Ag tyrimas

Atliekant von Vilebrando faktoriaus antigeno (vWF:Ag) tyrimą vWF aktyvumas įvertinamas kiekybiškai. vWF:Ag tyrimai atlikti „STA Compact“ (Diagnostica Stago, Prancūzija) analizatorimi ir „STA – Liatest VWF:Ag“ (Diagnostica Stago, Prancūzija) reagentų rinkiniu. Tiriami mėginiai paruošiami kaip aprašyta 3.2.1. skyriuje. Tyrimas pagrįstas imunoturbidimetrine LIA reakcija. Naudojamos latekso mikrodalelės, padengtos antikūnais prieš vWF. Dalelėms sąveikaujant su kraujo plazmos vWF vyksta jų agliutinacija. Įvykus agliutinacijai kinta reakcijos suspensijos optinės savybės. Pokyčiai fiksuojami imunoturbidimetriniu būdu esant 540 nm bangos ilgyje. Agliutinacijos intensyvumas tiesiogiai proporcingas vWF koncentracijai tiriamoje kraujo plazmoje. vWF:Ag pamatinių biologinių verčių intervalas 50–160 %.

3.2.4. vWF:CB tyrimas

Atliekant von Vilebrando faktoriaus gebos prisijungti kolageną (vWF:CB) tyrimą įvertinami vWF kokybiniai struktūros ar kiekybiniai vWF pokyčiai. Mutacijos vWF A3 domene neleidžia didelės molekulinės masės vWF multimerams jungtis prie neląstelinio užpildo kolagenų ir formuoti trombų. Dalinė stoka ar visiškas vWF sintezės sutrikimas atsispindi ir sumažėjusia geba jungtis su kolagenu. VWF:CB tyrimui naudotas „Asserachrom VWF:CB“ (Diagnostica Stago, Prancūzija) reagentų rinkinys pritaikytas „Gemini“ analizatoriui (STRATEC Biomedical AG, Vokietija). Prieš darbą reagentai buvo ruošiami pagal gamintojo instrukcijas. Tyrimui naudota

atšildyta tiriamųjų kraujo plazma, paruošta pagal 3.2.1. skirsnyje aprašytą metodiką, iki tyrimo saugota -70°C temperatūroje. Tyrimas pagrįstas ELISA reakcijos principu. Tirama vWF geba jungtis prie III tipo kolagenu padengtų reakcijos šulinėlio sienelių. Prisijungęs vWF veikiamas triušio anti-vWF antikūnais žymėtais peroksidaze. Su kolagenu susijungęs vWF kiekis tiesiogiai proporcingas peroksidazės katalizuojamo tetrametilbendzidino substrato oksidacijos produkto sugertie intensyvumui. Substrato oksidacija stebima kaip spalvinė reakcija. Absorbicija registruojama 450 nm ir 620 nm šviesos bangos ilgiuose. Reakcijos tirpalo spalvos pokyčio intensyvumas tiesiogiai proporcingas vWF gebai prisijungti kolageną. vWF:CB pamatinių biologinių verčių intervalas asmenims su A/B/AB kraujo grupe 86–160 % ir 62–138 % asmenims su O kraujo grupe.

3.2.5. vWF aktyvumo tyrimai

vWF aktyvumo tyrimai atlikti dviem, skirtingų gamintojų, metodais. Tyrimui naudota atšildyta tiriamųjų kraujo plazma, iki tyrimo saugota -70°C temperatūroje. Tyrimai skirtingais metodais atlikti tą pačią, plazmos atšildymo, dieną. Vilebrando faktoriaus ristocetino kofaktoriaus aktyvumo tyrimu (VWF:RCo) nustatoma vWF geba vykdyti trombocitų agregaciją veikiant kofaktoriui ristocetinui. Kitame metode vWF aktyvumas nustatomas nenaudojant egzogeninio trombocitų agregacijos iniciatoriaus.

VWF:RCo tyrimas atliktas „STA R MAX“ (Diagnostica Stago, Prancuzija) analizatoriumi naudojant „ABP VWF Ricof Assay“ (ABP, Jungtinė Karalystė) reagentų rinkinį. Visi rinkinio reagentai prieš tyrimą paruošti pagal gamintojo instrukcijas. Metodo esmę sudaro optinio tankio kitimų matvimas susidarant krešuliui. Koaguliaciją inicijuoja ristocetinas skatindamas tiriamoje pacientų plazmoje esančio vWF prisijungimą prie standartinių formaline fiksuotų trombocitų GPIIb receptoriaus. Sukeliama trombocitų agregacija ir krešulio susidarymas. Dėl šio proceso kinta reakcijos mišinio optinis tankis. Optinio tankio pokytis tiesiogiai proporcingas vWF reaktyvumui. Tik nepakitusios struktūros vWF geba pilnavertiškai agreguoti trombocitus. Ši priklausomybė vertinama kaip vWF aktyvumas (%). Tiriamosios plazmos vWF aktyvumas kiekybiškai įvertinamas naudojant standartinę plazmą, kurioje nustatyta normalaus vWF koncentracija prilyginta atitinkamam aktyvumui. Priklausomybė aprašoma tiesės lygtimi, kuria naudojantis apskaičiuojamas

ir tiriamosios plazmos vWF aktyvumas. VWF:RCo pamatinių biologinių verčių intervalas 50–150 %.

Kitas vWF aktyvumo tyrimas atliktas „Sysmex CA-1500 System“ (Siemens Healthcare Diagnostics, Vokietija) analizatoriumi naudojant „INNOVANCE VWF Ac Kit“ (Siemens Healthcare Diagnostics, Vokietija) reagentų rinkinį. Visi rinkinio reagentai prieš tyrimą paruošti pagal gamintojo instrukcijas. Metodo esmę sudaro tiriamoje paciento plazmoje esančio vWF aktyvumo nustatymas, kai pastarasis reaguoja su rekombinantiniu GPIb receptoriumi. Rekombinantiniai pokyčiai padidina GPIb receptoriaus aktyvumą. Rekombinantinio GPIb receptoriaus sąveikai su vWF ristocetinas kaip kofaktorius nereikalingas. Tyrimo metu turbidimetriškai registruojami optiniai tirpalo pokyčiai kai GPIb ir vWF kompleksas jungiasi prie polistireno dalelių padengtų anti-GPIb antikūnais. Dalelių agliutinacijos intensyvumas tiesiogiai proporcingas vWF aktyvumui ir gebai jungtis su GPIb. VWF:Ac pamatinių biologinių verčių intervalas asmenims su O kraujo grupe yra 46,3–145,6 % ir 61,4–179,1 % asmenims su A/B/AB kraujo grupe.

3.3. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant „SPSS“ (versija IBM SPSS Statistics 23, JAV), „Microsoft Office Excel 2007“ ir „Analyse-it for Microsoft Excel“ (*Analyse-it Software*, Jungtinė Karalystė) programinę įrangą.

Metodų atitikimui palyginti naudotas Passing–Bablok regresinės analizės metodas. Regresinės analizės grafike pateikiama lyginamų metodų išmatuotų mėginių verčių priklausomybė (y ašis) nuo etaloniniu metodu išmatuotų verčių (x ašis). Punktyrinė linija, einanti per koordinatinių ašių susikirtimo tašką, žymi idealią regresijos tiesę, kurios nuolinkis lygus 1,0, o atkirta lygi 0. Nuolinkio ir atkirtos komponentų visuma regresijos lygtyje apibūdina metodų sutapimą ir sisteminių poslinkį. Pagal lyginamų metodų rezultatus gauta tiesė pateikiama su ja aprašančia regresijos lygtimi, kur įvertinami nuolinkio (B) ir atkirtos (A) komponentai, bei jų 95 % pasiklovimo intervalai. Regresijos lygties nuolinkio ir atkirtos komponentai atspindi skirtumų pobūdį. Proporcinių skirtumą nurodo nuolinkis, kai stebimas skirtumas tarp metodų kinta proporcingai visame matavimo intervale. Nuolatinį skirtumą nurodo atkirta, kai vienodas skirtumas stebimas visame matavimo intervale. Pasiklovimo intervalai skirti įvertinti hipotezėms, kad regresijos modeliu nustatytos tiesės

$A=0$ ir $B=1$. Jei į A kintamajam apskaičiuotą 95 % pasiklovimo intervalą patenka 0 (teorinė ideali A vertė) ir į B kintamajam apskaičiuotą 95 % pasiklovimo intervalą patenka 1 (teorinė ideali B vertė), daroma išvada, kad hipotezės teisingos ir metodai statistiškai reikšmingai nesiskiria. Jei 95 % pasiklovimo intervaluose šių verčių nėra, vadinasi tarp metodų egzistuoja pastovus skirtumas, kai $A \neq 0$ ir proporcinis skirtumas, kai $B \neq 1$.

Metodo poslinkis įvertintas naudojantis neparametriniu ribų sutapimo kriterijumi (angl. *Nonparametric limits of agreement*). Šis kriterijus yra gerai žinomo Bland-Altman atitikmuo ir skirtas palyginti duomenų, pasiskirsčiusių ne pagal normalųjį skirstinį, tiriamo metodo rezultatų medianos poslinkį nuo etaloninio metodo duomenų medianos vertės. Lyginamo metodo poslinkis (%) įvertinimas kaip skirtingais metodais nustatytų tų pačių analizių verčių skirtumų santykinė mediana.

Koreliacijai tarp kintamųjų įvertinti naudotas Spirmeno koreliacijos koeficientas (r). Koreliacija vertinta kaip stipri (kai $r > 0,7$) ar vidutinio stiprumo (kai $0,4 \leq r \leq 0,69$). Tiesinės regresijos analizės modeliai buvo laikomi tinkamais, kai jų determinacijos koeficientas $r^2 \geq 0,25$.

Duomenų skirstinių palyginimui naudoti neparametriniai Mano–Vitnio U testo ir Kruskalio–Voliso kriterijai. Visiems statistinės analizės testams taikytas 0,05 reikšmingumo lygmuo (α). Visi statistinės analizės rezultatai buvo laikomi statistiškai reikšmingais, jei p vertė $< 0,05$.

3.4. Kokybės tikslai pagal biologinės variacijos koncepciją

Remiantis biologinės variacijos modeliu nustatyti kokybės tikslai, pagal Callum G Fraser [41].

Siekiamas didžiausias leistinas analizės neglaudumas (variacijos koeficientas, CV_{\max}) apskaičiuojamas pagal:

$$CV_{\max} = 0,5 \cdot CV_1,$$

kai CV_1 – vieno sveiko individo matuojamo laboratorinio rodiklio biologinė variacija.

Vadinasi, diegiamiems metodams keliama reikalavimai, kai analizės nauju metodu variacijos koeficientas (CV_{anal}) turi būti:

$$CV_{\text{anal}} < CV_{\max}.$$

Didžiausias leidžiamas matavimo poslinkis (Poslinkis_{\max}), kai neglaudumas yra nereikšmingas, apskaičiuojamas pagal:

$$\text{Poslinkis}_{\max} = 0,25 \times (CV_1^2 + CV_{BS}^2)^{1/2},$$

kai CV_I – vieno sveiko individo matuojamo laboratorinio rodiklio biologinė variacija, o CV_{BS} – biologinės variacijos koeficientas tarp individų.

Vadinasi, diegiamiems metodams keliami reikalavimai, kai naujo metodo poslinkis ($Poslinkis_{anal}$) turi būti:

$$Poslinkis_{anal} < Poslinkis_{max}$$

Baigiamajame darbe analzuotų metodų apskaičiuotos tikslios CV_{max} vertės pateiktos 9 lentelėje.

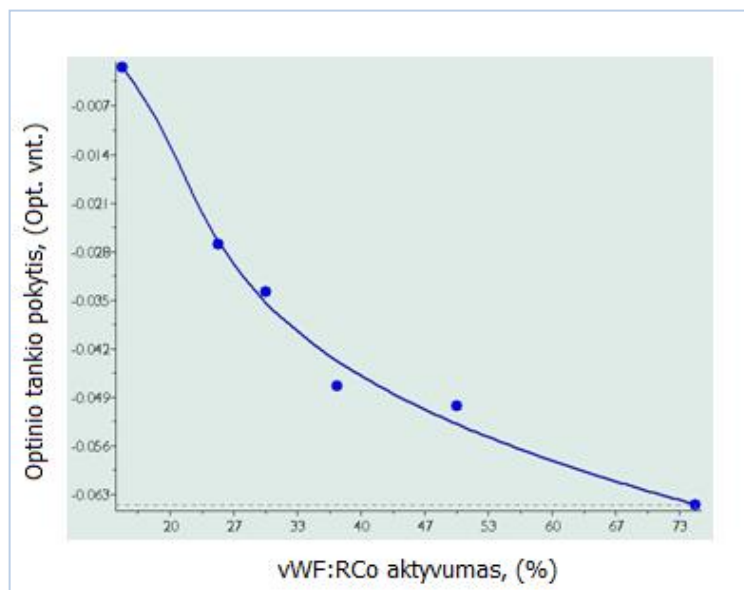
4. REZULTATAI

4.1. vWF:RCo metodo įdiegimas

Naudojant „ABP VWF:Ricof ASSAY“ (ABP, Jungtinė Karalystė) reagentų rinkinį „STA R MAX“ analizatoriuje įdiegtas vWF:RCo metodas. Diegiant vWF:RCo metodą sukurta 6 taškų kalibracinė kreivė aprašoma trečios eilės polinomine priklausomybė $c=(-343280d^3) - (16794d^2) - (618,56d) + 14,14$, kurios koreliacijos koeficientas $R=0,992$. Kalibracinė kreivė sukurta pagal duomenis pateiktus 2 lentelėje, kurie grafiškai pavaizduoti 4 paveiksle.

2 lentelė. Kalibracinės kreivės duomenys

Priskiriama kalibracinė standarto vertė, (%)	75	50	38	30	25	15
Išmatuota vertė, (%)	75	46	42	29	25	15
Optinio tankio pokytis, (Opt. vnt.)	0,064	0,05	0,027	0,034	0,027	0,001



4 pav. Įdiegto vWF:RCo metodo kalibracinė kreivė

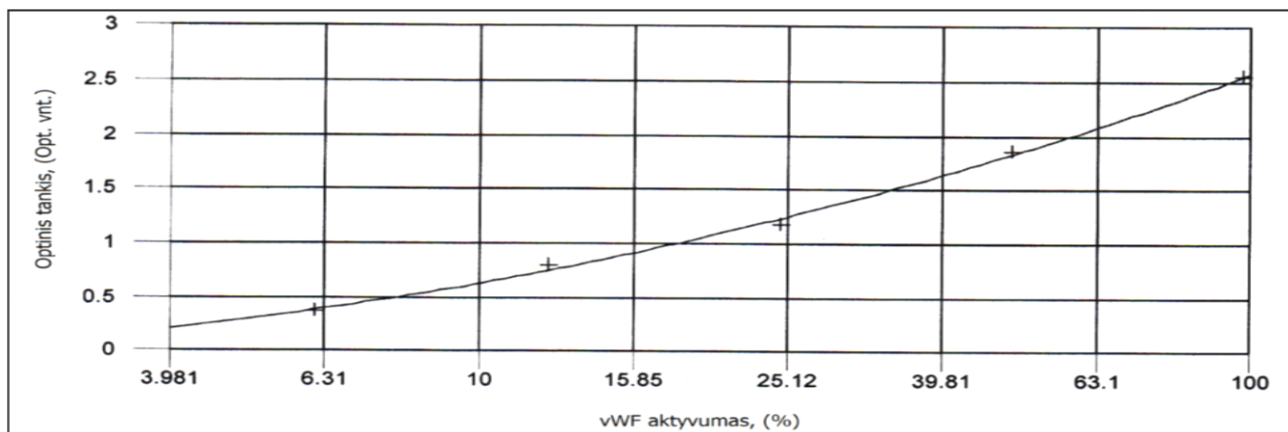
Sėkmingai įvykdžius kalibraciją alikta vidaus kokybės kontrolė. Išmatavus patologinių verčių komercinę kontrolinę plazmą gauta vertė vWF:RCo=25 %, kai gamintojo nurodytas patologinės kontrolės verčių intervalas yra 13–30 %, o vidutinė vertė – 21,5 %. Įgyvendinti vidaus kokybės kontrolės reikalavimai.

4.2. vWF:CB metodo įdiegimas

Naudojant „Asserachrom VWF:CB“ (Diagnostica Stago, Prancūzija) reagentų rinkinį įdiegtas vWF:CB metodas. Diegiant vWF:CB metodą sukurta 5 taškų kalibracinė kreivė aprašoma ketvirtos eilės polinomine priklausomybe $y=8,204 + \frac{-8,7419}{1+\left(\frac{x}{292,2}\right)^{0,5549}}$, kurios $R^2=0,994$. Kalibracinė kreivė sukurta pagal duomenis pateiktus 3 lentelėje, kurie grafiškai pavaizduoti 5 paveiksle.

3 lentelė. Įdiegto vWF:CB metodo skirto von Vilebrando faktoriaus jungimosi su kolagenu gebai nustatyti kalibracinės kreivės duomenys.

Priskiriama kalibracinė standarto vertė, %	98	49	24,5	12,25	6,3
Optinis tankis (Opt. vnt.)	2,572	1,881	1,205	8,21	0,391



5 pav. Įdiegto vWF:CB metodo skirto von Vilebrando faktoriaus jungimosi su kolagenu gebai nustatyti kalibracinės kreivės grafikas.

Įvykdžius kalibraciją alikta vidaus kokybės kontrolė. Išmatavus normalių verčių komercinę kontrolinę plazmą gauta vertė vWF:CB=75,89 %, kai gamintojo nurodytas normos kontrolės verčių intervalas yra 64–86 %, o vidutinė vertė – 75 %. Sėkmingai įgyvendinti kokybės kontrolės reikalavimai.

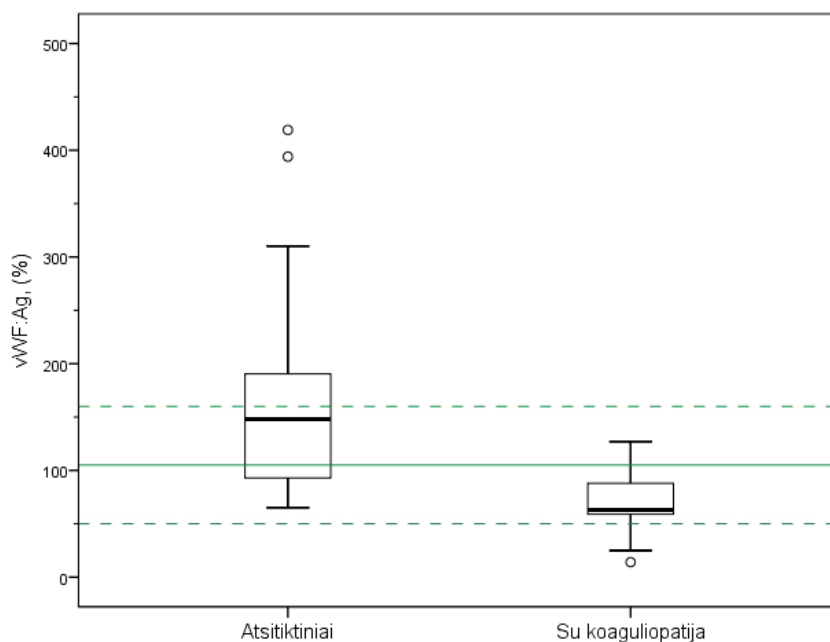
4.3. Aprašomosios statistinės analizės rezultatai

Patvirtintais ir naujai įdiegtais laboratorinės diagnostikos metodais, skirtais vWF kiekybiniais ir kokybiniais pokyčiams įvertinti, ištirti 29 asmenys. 20 (-iai) sąlyginai sveikų atsitiktinai atrinktų asmenų ir 9 (-iems) asmenims su diagnozuota ar įtariama vWL nustatytos vWF:Ag, vWF:Ac, vWF:RCo, vWF:CB aktyvumo vertės. Palyginti rezultatų duomenų skirstiniai tarp sergančiųjų ir sveikųjų grupių. Išanalizuotas bendras tiriamųjų rezultatų duomenų rinkinys. Bendro tiriamųjų grupių skirstinio analizė skirta įvertinti rezultatų išsidėstymą kliniškai reikšmingų sprendimų zonoje. Tyrimų rezultatai naudojami tolesnėje metodų palyginamojoje analizėje.

4.3.1. vWF:Ag rezultatų analizė

Ištirus 20 pacientų iš atsitiktinai atrinktų tiriamųjų grupės tikslus skaitinis vWF:Ag įvertis nustatytas 19 tiriamųjų, o 9 asmenų grupėje su diagnozuota ar įtariama vWL kiekybinis vWF:Ag aktyvumas nustatytas visiems 9 tiriamiesiems. vWF:Ag tyrimo kiekybinių kintamųjų imties centras, sklaida, simetriškumas, ekstremalios reikšmės pavaizduotos 6 paveiksle. Tikslios minėtų statistinių charakteristikų reikšmės pateiktos 4 lentelėje.

vWF:Ag rezultatai analizuoti tarp skirtingų tiriamųjų grupių. Atsitiktinių tiriamųjų grupėje vWF:Ag reikšmės išsidėsčiusios nuo minimalios 65 % iki maksimalios 419 % aktyvumo vertės. Tuo tarpu tiriamųjų su diagnozuota ar įtariama vWL vWF:Ag aktyvumo vertės pasklidusios siauresniame intervale nuo 14 % iki 127 %. Atsitiktinių tiriamųjų vWF:Ag rezultatų mediana lygi 148 % ir yra ženkliai didesnė nei tiriamųjų su koaguliopatijomis grupės vWF:Ag mediana – 63 %. Nustatyta atsitiktinių tiriamųjų grupės vWF:Ag rezultatų sklaida didesnė, kai interkvartilinis skirtumas siekia 101 %, o sergančių ar įtariamų vWL ligonių rezultatų tik 46,5 %. Nustatyti statistiškai reikšmingai ($p=0,001$) vWF:Ag aktyvumo skirtumai tarp atsitiktinai atrinktų asmenų grupės ir grupės asmenų su diagnozuota ar įtariama vWL.



6 pav. vWF antigeno aktyvumo tarp atsitiktinių ir su koagulopatija tiriamųjų grupių stačiakampės diagramos. (Atsitiktiniai – sąlyginai sveiki atsitiktiniai atrinkti asmenys; Su koagulopatija – asmenys su diagnozuota ar įtariama vWL; vWF:Ag – von Vilebrando faktoriaus antigenas.)

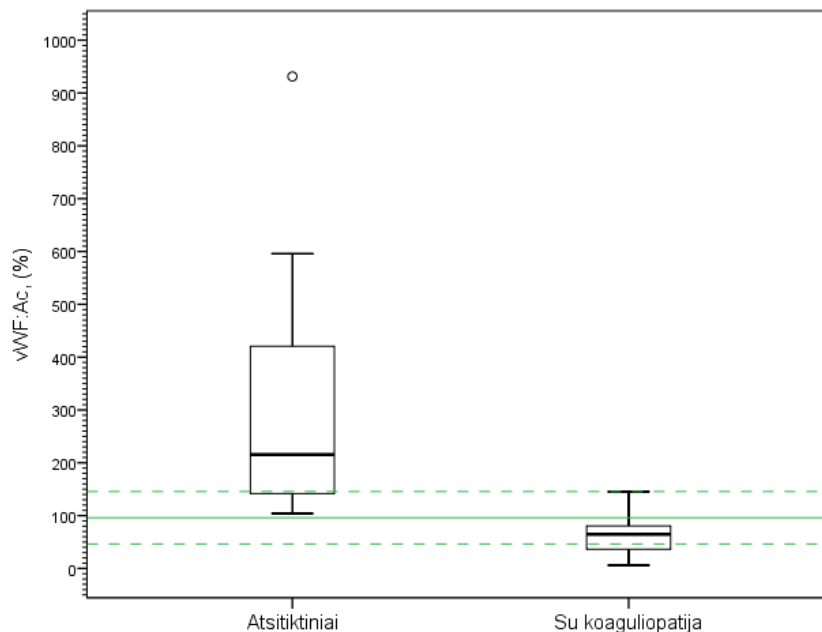
Siekiant įvertinti bendrą visų tiriamųjų rezultatų sklaidos charakteristiką ir pasiskirstymą kliniškai svarbių reikšmių intervale 6 paveiksle vaizduojama stačiakampė diagrama, kurioje žalios punktyrinės linijos vaizduoja vWF:Ag tyrimo pamatinių biologinių verčių intervalas 50–160 %, žalia ištisinė linija – normos verčių vidurkį – 105 %. Atsitiktinių tiriamųjų grupėje vWF:Ag mediana yra ženkliai didesnė už normos vidurkį. Taip pat stebima ženkli teigiama asimetrija normos vidurkio atžvilgiu. Kaip ir buvo galima tikėtis tiriamųjų su koagulopatijomis grupėje vWF:Ag aktyvumo mediana yra ženkliai mažesnė už normos vidurkį. Tačiau visas duomenų skirstinys pasiskirstęs ne tik patologinių verčių zonoje. Asmenų grupėje su diagnozuota arba įtariama vWL vWF:Ag aktyvumo vertės, esančios normos ribose nurodo apie kokybinius vWL pokyčius arba ne vWL atvejus, kai vWF antigeno aktyvumas normalus, bet pasireiškia koagulopatijoms būdinga klinika.

4 lentelė. 6 paveiksle paizduotų stačiakampių diagramų skaitinės charakteristikos vWF:Ag tyrimo rezultatų duomenų rinkiniui.

Grupė	Atsitiktiniai	Su koaguliopatija	Bendras
vWF:Ag rezultatų skirstinio charakteristika			
n (N)	19 (20)	9 (9)	28 (29)
Mediana, %	148	63	98
Mažiausia reikšmė, %	65	14	14
Didžiausia reikšmė, %	419	127	419
Q ₁	91	42	69,5
Q ₃	192	88,5	166,5
Interkvartilinis plotis (Q ₃ -Q ₁), %	101	46,5	97

4.3.2. vWF:Ac rezultatų analizė

Ištyrus 20 pacientų iš atsitiktinai atrinktų tiriamųjų grupės tikslus skaitinis vWF:Ac įvertis nustatytas 17 tiriamųjų, o 9 asmenų grupėje su diagnozuota ar įtariama vWL kiekybinis vWF:Ac aktyvumas nustatytas visiems 9 tiriamiesiems. vWF:Ac tyrimo kiekybinių kintamųjų imties charakteristikos pavaizduotos 7 paveiksle. Tikslios minėtų statistinių charakteristikų reikšmės pateiktos 5 lentelėje. Atsitiktinių tiriamųjų grupėje vWF:Ac reikšmės išsidėsčiusios nuo minimalios 104 % iki maksimalios itin aukštos 913 % aktyvumo vertės. Tiriamųjų su diagnozuota ar įtariama vWL vWF:Ac aktyvumo vertės išsidėsčiusios siauresniame intervale nuo 6 % iki 145 %. Atsitiktinių tiriamųjų vWF:Ac rezultatų mediana lygi 216 % ir yra ženkliai didesnė nei tiriamųjų su koaguliopatijomis grupės vWF:Ac mediana – 65 %. Nustatyta atsitiktinių tiriamųjų grupės vWF:Ac rezultatų sklaida didesnė, kai interkvartilinis skirumas siekia 314 %, o sergančių ar įtariamų vWL ligonių rezultatų tik 55 %. Nustatyta, kad statistiškai reikšmingai skyrėsi ($p=0,00016$) vWF:Ac aktyvumas tarp atsitiktinai atrinktų asmenų grupės ir grupės asmenų su diagnozuota ar įtariama vWL.



7 pav. vWF aktyvumo tarp atsitiktinių ir asmenų su koaguliopatija tiriamųjų grupių stačiakampės diagramos. (Atsitiktiniai – sąlyginai sveiki atsitiktiniai atrinkti asmenys; Su koaguliopatija – asmenys su diagnozuota ar įtariama vWL; vWF:Ac – von Vilebrando faktoriaus aktyvumas).

vWF:Ac pamatinių biologinių verčių intervalas yra 46,3–145,6 % su vidurkio verte 96 %. Atsitiktinių tiriamųjų grupėje vWF:Ac mediana yra ženkliai didesnė už normos vidurkį ir viršija viršutinę normos ribą. Taip pat stebima ženkli teigiama asimetrija normos vidurkio atžvilgiu. Tuo tarpu tiriamųjų su koaguliopatijomis grupėje vWF:Ac aktyvumo mediana yra mažesnė už normos vidurkį, tačiau didžioji dalis duomenų skirstinio yra normos verčių zonoje. Patologijos zonoje mažesnėje už apatinę normos ribą yra tik maža dalis pacientų su koaguliopatijomis verčių. Verta pastebėti, kad tai gali nurodyti apie kitą, nei vWL, koaguliopatijos priežastį, arba specifinius 2 tipo vWL potipiams būdingus vWF:Ac pakitimus.

5 lentelė. 7 pav. paizduotų stačiakampių diagramų skaitinės charakteristikos vWF:Ac tyrimo rezultatų duomenų rinkiniui.

Grupė	Atsitiktiniai	Su koagulopatija	Bendras
vWF:Ac rezultatų skirstinio charakteristika			
n (N)	17 (20)	9 (9)	26 (29)
Mediana, %	216	65	98
Mažiausia reikšmė, %	104	6	14
Didžiausia reikšmė, %	931	145	419
Q ₁	141	26	70
Q ₃	455	81	167
Interkvartilinis plotis (Q ₃ -Q ₁), %	314	55	97

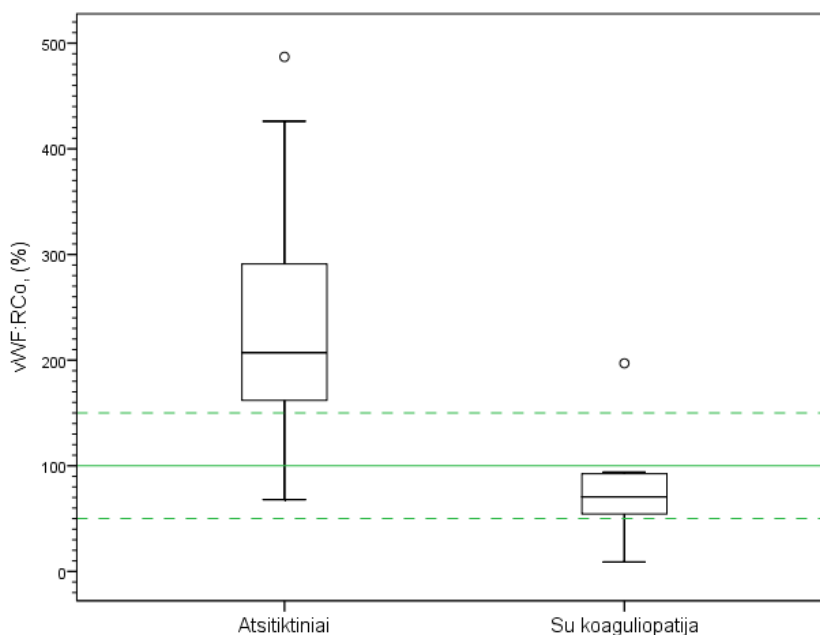
4.3.3. vWF:RCo rezultatų analizė

Ištyrus 20 pacientų iš atsitiktinai atrinktų tiriamųjų grupės tikslus skaitinis vWF:RCo tikslus kiekybinis įvertis nustatytas 17 tiriamųjų, o 9 asmenų grupėje su diagnozuota ar įtariama vWL kiekybinis vWF:Ac aktyvumas nustatytas 8 tiriamiesiems. vWF:Ag tyrimo kiekybinių kintamųjų imties centras, sklaida, simetriškumas, ekstremalios reikšmės pavaizduotos 8 paveiksle. Tikslios minėtų statistinių charakteristikų reikšmės pateiktos 6 lentelėje.

Atsitiktinių tiriamųjų grupėje vWF:RCo reikšmės išsidėsčiusios nuo minimalios 68 % iki maksimalios itin aukštos 487 % aktyvumo vertės. Tuo tarpu tiriamųjų su diagnozuota ar įtariama vWL vWF:RCo aktyvumo vertės išsidėsčiusios siauresniame intervale nuo 9 % iki 197 %. Atsitiktinių tiriamųjų vWF:RCo rezultatų mediana lygi 207 % ir yra ženkliai didesnė nei tiriamųjų su koagulopatijomis grupės vWF:RCo mediana – 71 %. Bendrai, tik maža atsitiktinių tiriamųjų rezultatų verčių dalis patenka į normos ribas. Vyrauja vWF:RCo vertės ženkliai didesnės už aukščiausią normos vertę. Nustatyta atsitiktinių tiriamųjų grupės vWF:RCo rezultatų sklaida didesnė, kai interkvartilinis skirumas siekia 153 %, o sergančių ar įtariamų vWL tyrimų rezultatų

sklaida – 41 %. Mažą rezultatų sklaidą sergančių ar su įtariama vWL tiriamųjų grupėje įrodo ir Q₃ kvartilio sutapimas su išoriniu stačiakampės diagramos barjeru (95 eilės percentiliu). Taip pat sergančiųjų koagulopatijomis duomenų skirstiniui būdinga neigiama asimetrija, kai vertės nukrypusios nuo vidurkio į žemų verčių pusę. Apibendrinant, nustatytas statistiškai reikšmingas vWF:RCo aktyvumo skirtumas (p=0,0001) tarp atsitiktinai atrinktų asmenų grupės ir grupės asmenų su diagnozuota ar įtariama vWL.

Lyginant atsitiktinių tiriamųjų grupės vWF:RCo aktyvumo rezultatus su normos ribomis stebimas žymus verčių poslinkis link aukštų verčių zonos, virš normos ribų. Lyginat tiriamųjų grupės su koagulopatijomis vWF:RCo aktyvumo rezultatus su normos ribomis stebimas verčių poslinkis link žemų verčių zonos, tačiau tik dalis rezultatų atspindi vWF:RCo sumažėjimą ir galimą vWL.



8 pav. vWF:RCo aktyvumo tarp atsitiktinių ir asmenų su koagulopatija tiriamųjų grupių stačiakampės diagramos. (Atsitiktiniai – sąlyginai sveiki atsitiktinai atrinkti asmenys; Su koagulopatija – asmenys su diagnozuota ar įtariama vWL; vWF:RCo – von Vilebrando faktoriaus aktyvumas ristocetino kofaktoriaus aktyvumas.)

6 lentelė. 8 pav. paizduotų stačiakampių diagramų skaitinės charakteristikos vWF:RCo tyrimo rezultatų duomenų rinkiniui.

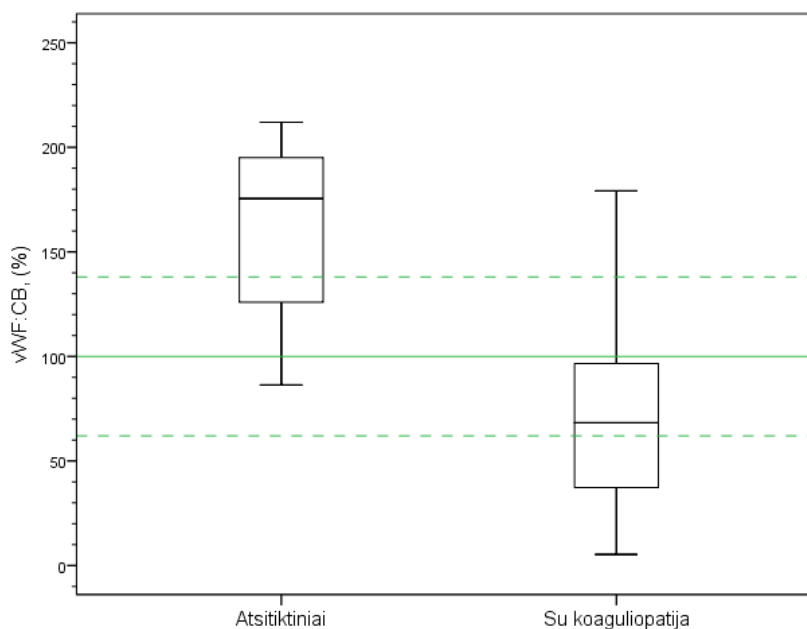
Grupė	Atsitiktiniai	Su koaguliopatija	Bendras
vWF:RCo rezultatų skirstinio charakteristika			
n (N)	17 (20)	8 (9)	26 (29)
Mediana, %	207	71	166
Mažiausia reikšmė, %	68	9	9
Didžiausia reikšmė, %	487	197	487
Q ₁	140	52	76
Q ₃	292	93	241
Interkvartilinis plotis (Q ₃ -Q ₁), %	153	41	165

4.3.4. vWF:CB rezultatų analizė

Ištyrus 20 pacientų iš atsitiktinai atrinktų tiriamųjų grupės tikslus skaitinis vWF:CB įvertis nustatytas 13 tiriamųjų, o 9 asmenų grupėje su diagnozuota ar įtariama vWL funkcinis vWF:CB aktyvumas nustatytas visiems 9 tiriamiesiems. vWF:CB tyrimo kiekybinių kintamųjų skirstinio charakteristikas atspindinti stačiakampė diagrama pateikta 9 paveiksle, o tikslūs jų įverčiai nurodyti 7 lentelėje.

Atsitiktinių tiriamųjų grupėje vWF:CB reikšmės išsidėsčiusios nuo minimalios 86 % iki maksimalios 212 % aktyvumo vertės. Tiriamųjų su diagnozuota ar įtariama vWL vWF:CB aktyvumo vertės išsidėsčiusios siauresniame intervale nuo 5 % iki 179 %. Atsitiktinių tiriamųjų vWF:CB rezultatų mediana lygi 176 % ir yra ženkliai didesnė nei tiriamųjų su koaguliopatijomis grupės vWF:CB mediana – 71%. Nustatyta atsitiktinių tiriamųjų grupės vWF:CB rezultatų sklaida mažesnė (interkvartilinis skirtumas siekia 76 %), nei sergančių ar įtariamų vWL ligonių rezultatų

sklaida (siekianti 82 %). Nustatytas statistiškai reikšmingai skirtumas ($p=0,002$) tarp vWF:CB aktyvumo rezultatų atsitiktinai atrinktų asmenų grupėje ir grupės asmenų su diagnozuota ar įtariama vWL.



9 pav. vWF:CB aktyvumo tarp atsitiktinių ir asmenų su koaguliopatija tiriamųjų grupių stačiakampės diagramos. (Atsitiktiniai – sąlyginai sveiki atsitiktinai atrinkti asmenys; Su koaguliopatija – asmenys su diagnozuota ar įtariama vWL; vWF:CB – von Vilebrando faktoriaus kolageno jungimosi geba.)

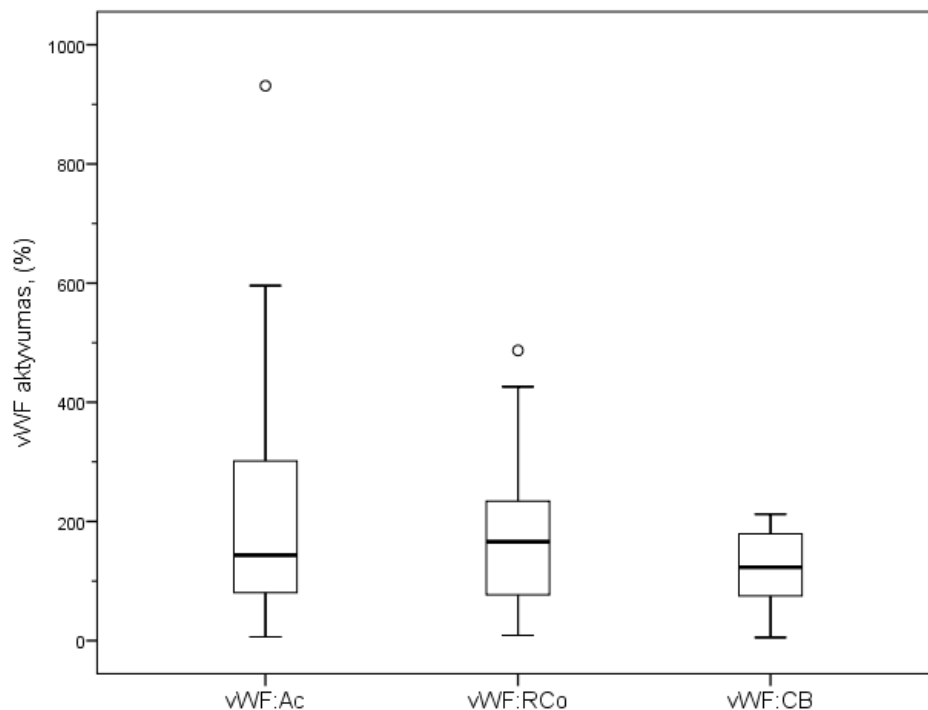
vWF:CB pamatinių biologinių verčių intervalas yra 62–138 % su vidurkio verte 100 %. Atsitiktinių tiriamųjų grupėje vWF:Ac mediana yra ženkliai didesnė už normos vidurkį. Taip pat stebima ženkli teigiama asimetrija normos vidurkio atžvilgiu. Tuo tarpu tiriamųjų su koaguliopatijomis grupėje vWF:CB aktyvumo mediana yra mažesnė už normos vidurkį ir artima žemesnei normos verčių ribai. Žemų verčių patologijos zonoje yra dalis pacientų su koaguliopatijomis vWF:CB aktyvumo verčių. Išskirtinė savybė, būdinga sergančių ar įtariamai sergančių vWL vWF:CB aktyvumo rezultatams, yra platus skirstiniodiapazonas, kai nustatytos vWF:CB aktyvumo vertės dėstosi visose 3 zonose (vWF:CB aktyvumo sumažėjimas, norma ir padidėjimas).

7 lentelė. 9 pav. paizduotų stačiakampių diagramų skaitinės charakteristikos vWF:CB tyrimo rezultatų duomenų rinkiniui.

Grupė vWF:CB rezultatų skirstinio charakteristika	Atsitiktiniai	Su koagulopatija	Bendras
n (N)	13 (20)	9 (9)	22 (29)
Mediana, %	176	71	123
Mažiausia reikšmė, %	86	5	5
Didžiausia reikšmė, %	212	179	212
Q ₁	123	25	73
Q ₃	199	106	180
Interkvartilinis plotis (Q ₃ -Q ₁), %	76	82	106

4.3.5. vWF funkcinio aktyvumo nustatymo metodų palyginimas

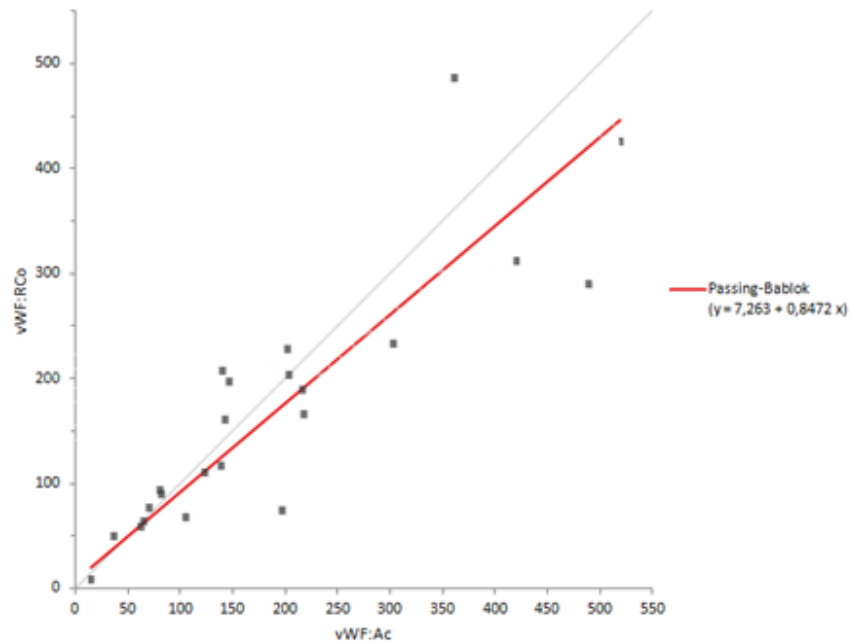
Siekiant išsiaiškinti vWF aktyvumo verčių skirtumus palyginti atsitiktinių tiriamųjų grupės vWF aktyvumo rezultatai gauti vWF:Ac, vWF:RCo ir vWF:CB metodais. Naudojant Kruskalio–Voliso kriterijų tikrinamas skirtingas vWF aktyvumo nustatymo metodais išmatuotų vWF aktyvumo verčių medianų lygumas (10 pav.). Atlikus analizę nustatyta, kad tarp vWF:Ac, vWF:RCo ir vWF:CB skirstinių medianų statistiškai reikšmingų skirtumų nėra ($p=0,27$).



10 pav. Sveikų atsitiktinių tiriamųjų, skirtingais metodais išmatuotų vWF aktyvumo skirstinių medianų palyginimas (vWF:Ac – von Vilebrando faktoriaus aktyvumas, (%); vWF:RCO – von Vilebrando faktoriaus ristocetino kofaktoriaus aktyvumas, (%); vWF:CB – von Vilebrando faktoriaus geba prisijungti kolageną, (%)).

4.4.vWF:Ac ir vWF:RCO metodų atitikimas

Įdiegus metodą, išmatuotas vWF:RCO aktyvumas atsitiktiniai atrinktų ir sergančių ar su įtariama vWL pacientų plazmose. Siekiant įsitikinti vWF:RCO metodo tinkamumu nustatytas vWF:RCO aktyvumas lygintas su tų pačių tiriamųjų vWF:Ac aktyvumu. Įvertinta tiesinė priklausomybė tarp vWF:RCO ir vWF:Ac kintamųjų. Taikant Spirmeno tiesinės priklausomybės vertinimo kriterijų nustatytas koreliacijos koeficientas $r=0,846$, kai $p=0,000069$. Tarp kintamųjų stebimas statistiškai reikšmingas stiprus tiesioginis tiesinis ryšys. Metodų palyginimui ir atitikimui įvertinti taikytas neparametrinis Passing–Bablok regresijos modelis.



11 pav. Passing–Bablok regresijos modelis vWF:RCo ir vWF:Ac metodų atitikimui palyginti. (Pilka linija – ideali teorinė tiesė su nuolinkiu 1 ir atkirta 0; raudona linija – nustatyta tiriamo modelio regresijos tiesė; vWF:Ac – von Vilebrando faktoriaus aktyvumas, (%); vWF:RCo – von Vilebrando faktoriaus ristocetino kofaktoriaus aktyvumas, (%)).

Regresinės analizės grafike (11 pav.) pateikiama lyginamū metodu (vWF:RCo) išmatuotų mėginių verčių priklausomybė nuo etaloniniu metodu (vWF:Ac) išmatuotų verčių. Raudona linija atspindi skirtingais metodais gautų rezultatų priklausomybę, kuri aprašoma tiesės lygtimi $y = 0,8472x + 7,263$ su determinacijos koeficientu $R^2=0,877$. Nustatyta, jog pastarajai tiesei būdingas nuolinkis lygus 0,847 (su 95 % pasikliautinoju intervalu 0,684–1,301) ir atkirta lygi 7,263 (su 95 % pasikliautinoju intervalu -19,24–31,01). Teorinės idealios regresijos tiesės nuolinkio vertė 1 patenka į lyginamo metodo PI verčių intervalą $0,684 < 1 < 1,301$, todėl galime teigti, jog lyginamo metodo nuolinkis nuo etaloninio metodo statistiškai nereikšmingas. Taip pat teorinės idealios regresijos tiesės atkirtos vertė 0 patenka į lyginamo metodo PI verčių intervalą $-19,24 < 0 < 31,01$, todėl galime teigti, jog lyginamo metodo atkirta nuo etaloninio metodo statistiškai reikšmingai nesiskiria. Metodų palyginamosios analizės rezultatai nerodo statistiškai reikšmingų skirtumų, tačiau statistiškai reikšmingų skirtumų nebuvimas negali būti prilyginamas kliniškai reikšmingų skirtumų nebuvimui.

4.5. vWF:RCo metodo poslinkio vertinimas pagal biologinės variacijos koncepciją

Išryškinti metodų nesutapimą, kuris gali turėti įtakos klinikiams sprendimams naudojamas neparametrinis ribų sutapimo įvertinimas. Naudojantis „Analyse-it“ programine įranga apskaičiuota, kad vWF:RCo metodo poslinkis lygus -10,58 % su PI nuo -29,58 % iki 11,05 %. Analizės rezultatai pateikiami 12 paveiksle. Siekiant įvertinti metodų klinikinį sutapimą remiamasi ECAT (angl. *European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities*) nurodytais biologinės variacijos duomenimis [42] (8 lentelė) pagal biologinės variacijos koncepciją apskaičiuotas maksimalus leidžiamas vWF:RCo metodo poslinkis lyginamas su nustatytu vWF:RCo poslinkiu. Apskaičiuotas didžiausias leidžiamas poslinkis lygus $\pm 9,4$ % (9 lentelė), kai nustatytas vWF:RCo poslinkis -10,58 % (12 pav.).

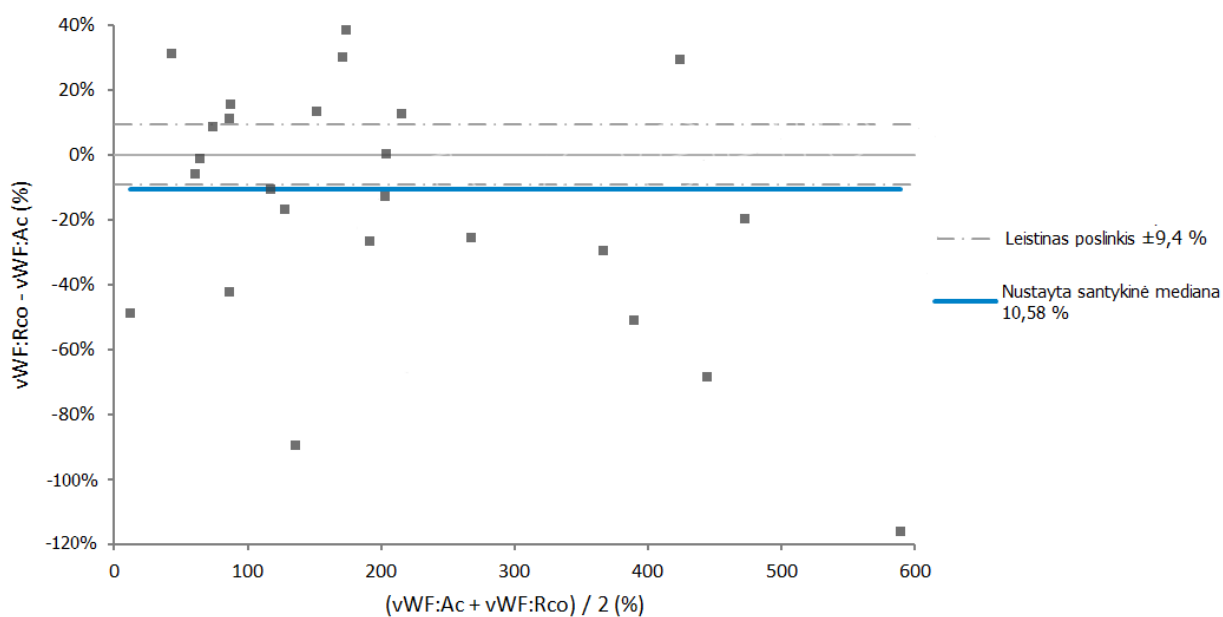
Nustatytas metodo poslinkis netenkina biologinės variacijos koncepcijos keliamų reikalavimų, kurie pateikti 9 lentelėje. vWF:RCo metodu išmatuotos vertės gali būti pasislinkusios nuo tikrosios vertės ir turėti neigiamos įtakos teisingam klinikių sprendimų priėmimui.

8 lentelė. Biologinės variacijos vertės pagal ECAT (angl. *European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities*) duomenų bazę. (CV_I – individo variacijos koeficientas, (%); CV_{BS} – variacijos koeficientas tarp individų, (%); vWF:RCo – von Vilebrando faktoriaus ristocetino kofaktoriaus aktyvumas, (%); vWF:CB – von Vilebrando faktoriaus geba prisijungti kolageną, (%)).

Metodas	CV_I , (%)	CV_{BS} , (%)	Siekiamas neglaudumas (%)	
			Diagnostinis	Stebėsnos
vWF:RCo	21,3	31,2	21,8	10,6
vWF:CB	25,6	28,0	35,5	12,8

9 lentelė. Peteikiamas apskaičiuotas (pagal 3.2.7. poskyrį) didžiausias leidžiamas analizės neglaudumas (CV_{max}) ir didžiausias leidžiamas matavimo poslinkis ($Poslinkis_{max}$). ((vWF:CB – von Vilebrando faktoriaus geba prisijungti kolageną, (%); vWF:RCo – von Vilebrando faktoriaus ristocetino kofaktoriaus aktyvumas, (%)).

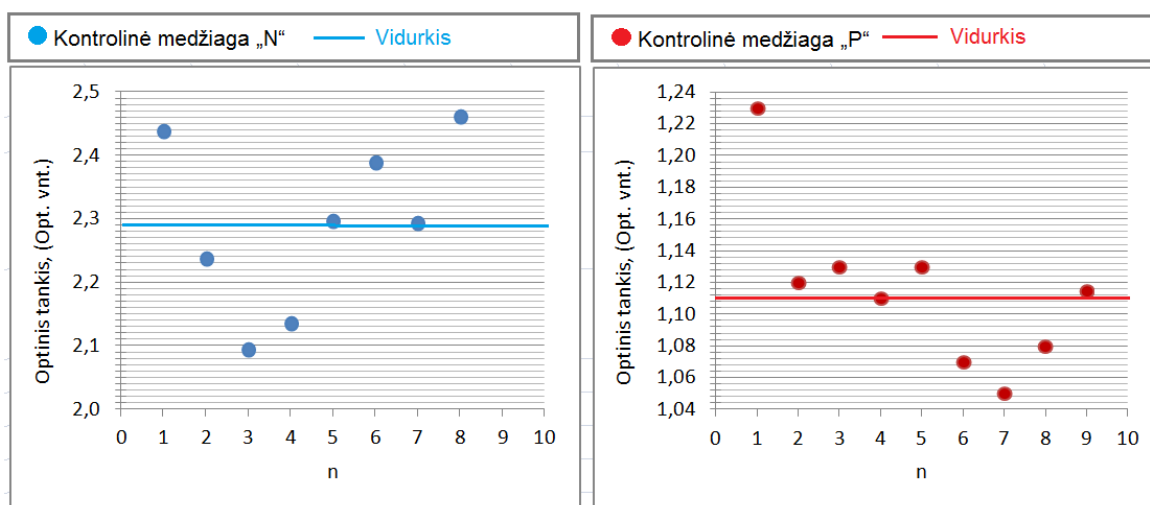
Metodas	CV_{max} , (%)	$Poslinkis_{max}$, (%)
vWF:RCo	10,7	9,4
vWF:CB	12,8	9,5



12 pav. Ribų sutapimo analizės grafikas. (vWF:Ac – von Vilebrando faktoriaus aktyvumas, (%); vWF:RCo – von Vilebrando faktoriaus ristocetino kofaktoriaus aktyvumas, (%)).

4.6.vWF:CB metodo pakartojamumas

Siekiant įvertinti metodą, nustatytas testo pakartojamumas (*angl.* Intra-Assay CV). Procedūra atlikta išmatavus normalių ir patologinių koncentracijų kontrolinės plazmos vWF:CB aktyvumą 8 pakartojimuose. Matavimų rezultatai pateikti 13 paveiksle.



13 pav. Optinio tankio kitimai tarp kontrolinių medžiagų pakartojimų. (n – pakartojimas; Kontrolinė medžiaga „N“ – kontrolinė medžiaga, krioje analitės koncentracija normos ribose; Kontrolinė medžiaga „P“ – kontrolinė medžiaga, kurioje analitė yra pataloginės, žemos koncentracijos).

Apskaičiuoti pakartojamumo variacijos koeficientai normalių vWF koncentracijos verčių plazmai yra $CV_N=5,85\%$, o pataloginių vWF koncentracijos verčių plazmai yra $CV_P=4,95\%$ (10 lentelė). Lyginant normos ir patalogijos vidaus kokybės kontrolių pakartojimų verčių išsibarstymą apie vidurkį nustatyta, kad kontrolinei medžiagai „N“, su aukštesne analitės koncentracija būdingas didesnis pakartojamumo variacijos koeficientas, t. y. didesnė rezultatų sklaida, nei normos verčių kontrolinėje medžiagoje.

10 lentelė. Vidaus kokybės kontrolių „N“ ir „P“ pakartojimų statistinės charakteristikos: vidurkis, SN – standartinis nuokrypis; pakartojamumo variacijos koeficientas (CV).

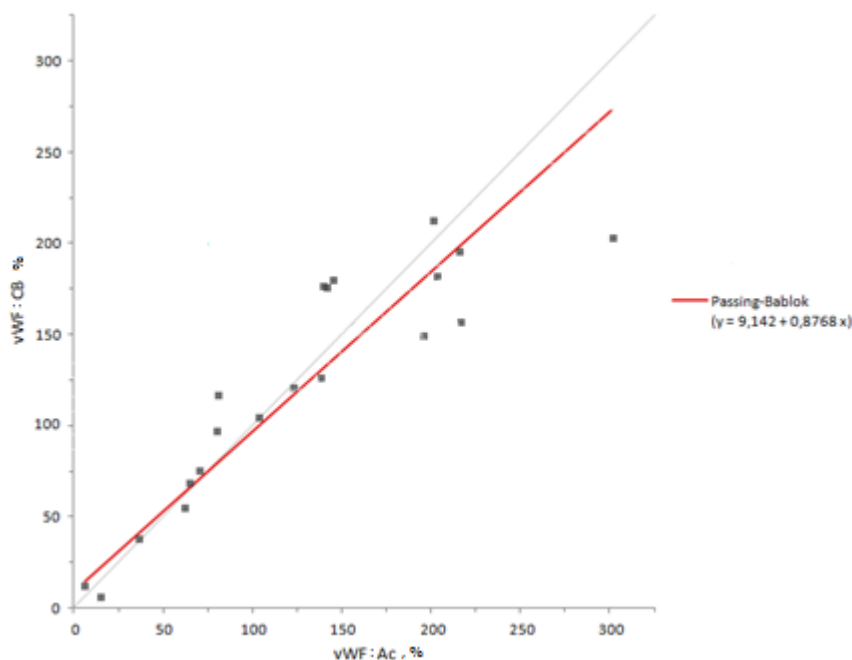
Kontrolinė medžiaga	n	Vidutinis OT (Opt. vnt.)	SN (Opt. vnt.)	Pakartojamumo CV (%)
Kontrolinė medžiaga „N“	8	2,29	0,13	5,85
Kontrolinė medžiaga „P“	8	1,115	0,06	4,94

Nustatyti CV rodikliai lyginti su nurodytais gamintojo metodikoje ir pateikiamais literatūros šaltiniuose. Gamintojas teigia, jog pakartojamumas testo viduje siekia 3,9 % ir 4,6 % patologinių ir normalių vWF koncentracijų kontrolinėms plazmoms atitinkamai. Metodo pakartojamumo įvertinimo metu nustatyti variacijos koeficientai yra didesni už nurodytus gamintojo rekomendacijose. Tačiau, pasak ECAT organizacijos rekomendacijų, vieno sveiko individo vWF:CB metodu nustatomo vWF aktyvumo CV siekia 25,6 % (8 lentelė). Tuomet, remiantis biologinės variacijos modeliu didžiausias leistinas analizatoriaus neglaudumas vWF:CB gali būti 12,8 % (9 lentelė). Kontrolinėms plazmoms nustatyti CV yra mažesni už apskaičiuotą didžiausią leistiną neglaudumą. Taigi, remiantis biologinės variacijos modeliu vWF:CB metodo pakartojamumas yra leistinose ribose.

4.7.vWF:Ac ir vWF:CB metodų atitikimas

Įdiegus metodą, išmatuotas vWF:CB aktyvumas atsitiktiniai atrinktų ir sergančių ar galimai sergančių vWF pacientų plazmose. Siekiant įsitikinti vWF:CB metodo atitikimu atsitiktinių tiriamųjų plazmose nustatytas vWF:CB aktyvumas lygintas su tų pačių tiriamųjų vWF:Ac aktyvumu. Literatūros šaltiniuose vWF:CB apibūdinamas kaip patikimas metodas vWF funkcionalumui įvertinti prilygstantis ir pranokstantis tradicinį vWF:RCo metodą, skirtą vWF funkcijoms vertinti [43]. Remiantis šia informacija, lyginamas vWF:CB atitikimas su etaloniniu vWF:Ac metodu. Įvertinta tiesinė priklausomybė tarp vWF:CB ir vWF:Ac kintamųjų. Taikant Spirmeno priklausomybės vertinimo kriterijų nustatytas koreliacijos koeficientas $r=0,908$, kai $p=2,16 \cdot 10^{-9}$. Tarp kintamųjų stebimas statistiškai reikšmingas stiprus tiesioginis tiesinis ryšys. Metodų palyginimui ir atitikimui įvertinti taikytas neparimetrinis Passing–Bablok regresijos modelis. Regresinės analizės grafike (14 paveikslas) pateikiama lyginamų metodų (vWF:CB) išmatuotų mėginių verčių priklausomybė nuo etaloniniu metodu (vWF:Ac) išmatuotų verčių. Nustatyta metodų priklausomybė, aprašoma tiesės lygtimi $y = 0,877x - 9,142$, su determinacijos koeficientu $R^2=0,904$. Pastarajai tiesei būdingas nuolinkis lygus 0,877 (su 95 % pasikliautinoju intervalu 0,615–1,109) ir atkirta lygi 9,142 (su 95 % pasikliautinoju intervalu -7,420–43,04). Teorinės idealios regresijos tiesės nuolinkio vertė 1 patenka į lyginamo metodo PI verčių intervalą $0,615 < 1 < 1,109$, todėl galime teigti, jog lyginamo metodo nuolinkis nuo etaloninio metodo statistiškai nereikšmingas. Taip pat teorinės idealios regresijos tiesės atkirtos vertė 0 patenka į

lyginamo metodo PI verčių intervalą $-7,420 < 0 < 43,04$, todėl galime teigti, jog lyginamo metodo atkirta nuo etaloninio metodo statistiškai reikšmingai nesiskiria. Metodų palyginamosios analizės rezultatai nerodo statistiškai reikšmingų skirtumų, tačiau būtina įsitikinti kliniškai reikšmingų skirtumų nebuvimu.

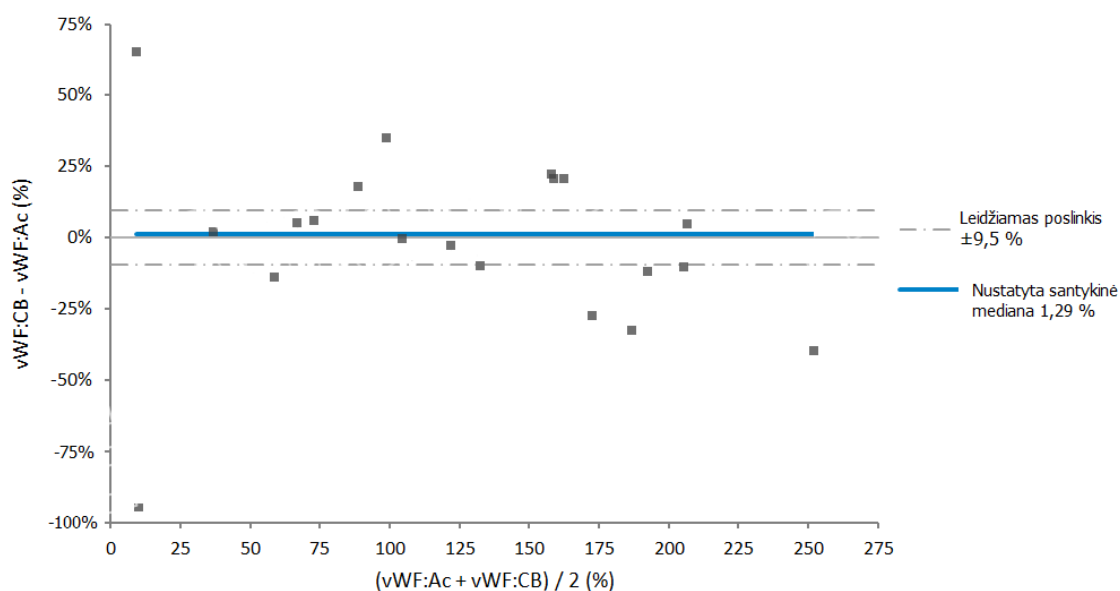


14 pav. Passing–Bablok regresijos modelis vWF:CB ir vWF:Ac metodų atitikimui palyginti. (Pilka linija – ideali teorinė tiesė su nuolinkiu 1 ir atkirta 0; raudona linija – nustatyta tiriamo modelio regresijos tiesė; vWF:Ac – von Vilebrando faktoriaus aktyvumas, (%); vWF:CB– von Vilebrando faktoriaus geba prijungti kolageną, (%)).

4.8.vWF:CB metodo poslinkio pagal biologinės variacijos koncepciją

Naudojantis „Analyse-it“ programine įranga apskaičiuota, kad vWF:CB metodo poslinkis lygus 1,29 % su PI nuo -11,45 % iki 18,30 %. Siekiant įvertinti metodų klinikinį sutapimą naudojamosi biologinės variacijos koncepcija. Nustatytas metodo poslinkis lyginamas su apskaičiuotu didžiausiu leidžiamu poslinkiu (9 lentelė) naudojant ECAT pateiktus biologinės variacijos duomenis vWF:CB metodui (8 lentelė). Taigi, anot šaltinių didžiausias leidžiamas poslinkis lygus 9,5 %, kai nustatytas vWF:CB santykinė mediana yra 1,29 % (15 paveikslas) ir

atitinka metodo poslinkį. Nustatytas metodo poslinkis pagal biologinės variacijos koncepciją tenkina ECAT keliamus reikalavimus vWF:CB poslinkiui.



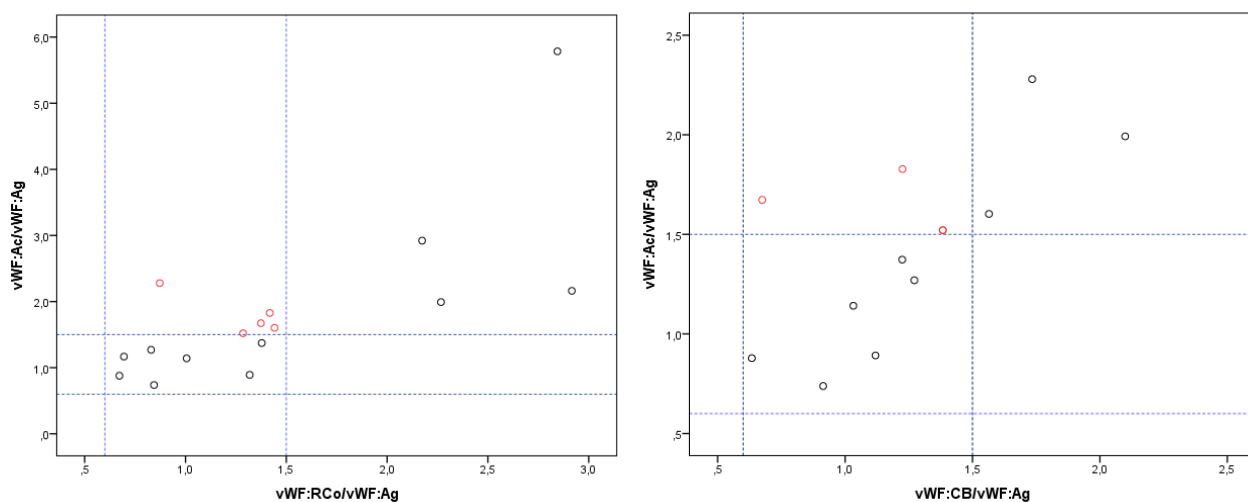
15 pav. Ribų sutapimo analizės grafikas. (vWF:Ac – von Vilebrando faktoriaus aktyvumas, (%); vWF:CB– von Vilebrando faktoriaus geba prisijungti kolageną (%)).

4.9. Išvestinių rodiklių analizės rezultatai

vWF ligos diagnostikai ir formos patikslinimui naudojami išvestiniai rodikliai atspindintys vWF funkcijos patikimus. Galimi funkcijos defektai įvertinami kaip vWF aktyvumo ir vWF kiekio santykis. Priimtas santykio normos verčių intervalas yra 0,6-1,5. Santykis mažesnis nei 0,6 liudija apie vWF struktūros pakitimus sutrikdančius funkciją. Apskaičiuoti ir palyginti skirtingais metodais įvertintų vWF aktyvumo santikai su antigenu: vWF:RCo/vWF:Ag, ir vWF:CB/vWF:Ag su vWF:Ac/vWF:Ag. Santykių skaičiavimui naudoti tik atsitiktinės grupės tiriamųjų rezultatai. Tokiu būdu stengiamasi atmesti galimus santykio verčių nukrypimus dėl iš tiesų esančių vWF defektų. Siekiant įsitikinti, kad naujai įdiegtais metodais nustatytų aktyvumo verčių santykis su vWF antigenu prilygsta etaloninio metodo vWF:Ac santykiui su vWF antigenu. Santykių priklausomybei nustatyti naudojamas Spirmeno koreliacijos kriterijus ir jo įvertis koreliacijos koeficientas. Nustatyta statistiškai reikšminga ($p=0,001$) stipri ($r=0,741$) tiesinė priklausomybė tarp vWF:RCo/vWF:Ag ir

vWF:Ac/vWF:Ag santykių. Taip pat nustatyta statistiškai reikšminga ($p=0,011$) vidutiniškai stipri ($r=0,699$) tiesinė priklausomybė tarp vWF:CB/vWF:Ag ir vWF:Ac/vWF:Ag santykių.

Siekiant įvertinti tiriamais metodais nustatytų vWF aktyvumo santykio su antigenu klinikinės reikšmės patikimumą, lyginama tiriamų metodų santykio verčių galima interpretacija su etaloninio metodo santykio verčių interpretacija. Rezultatai pateikiami taškiniu grafiku, kuriame santykių vertės vaizduojamos taškais, kaip vWF:RCo/vWF:Ag ar vWF:CB/vWF:Ag priklausomybė nuo vWF:Ac (16 paveikslas).



16 pav. Surogatiųjų žymenų priklausomybė tarp vWF:Ac/vWF:Ag ir vWF:RCo/vWF:Ag; vWF:Ac/vWF:Ag ir vWF:CB/vWF:Ag

Mėlynos spalvos punktyrinės linijos x ir y ašyse atspindi klinikinių sprendimų ribines vertes (normos ribas). Punktyrinių linijų formuojamas vidurinis kvadratas atspindi zoną, kurioje lyginamų metodų santykiai yra normos ribose ir klinikinė interpretacija nesiskiria. Kvadratai, kuriuos kerta menama įstrižinė einanti nuo koordinatų pradžios taško atspinti proporcingus santykių sumažėjimus (pvz. vWL atveju) arba santykių padidėjimą (pvz. ūmios fazės būklėje). Visi likę kvadratai atspindi zonas, į kurias patekusios vertės stokoja diagnostinės prasmės. Pastarosios vertės gali būti gautos dėl metodo trūkumų. Lyginant vWF:Ac/vWF:Ag santykio su vWF:RCo/vWF:Ag reikšmes nustatytos 5 (atitinkančios 31,25 %) nepatenkančios į zoną su aiškia diagnostine prasme. Visų jų vWF:RCo/vWF:Ag santykiai žemesni nei vWF:Ac/vWF:Ag. Vadinasi, vWF:RCo vertės yra žemesnės lyginant su etaloninio metodo vWF:Ac vertėmis. Tokia tendencija gali lemti klaidingai

žemesnius santykius vWF:RCo/vWF:Ag ir padidintą klaidingai diagnozuotos vWL riziką. Analogiška situacija nustatyta ir lyginant vWF:Ac/vWF:Ag santykio su vWF:CB/vWF:Ag reikšmes. Nustatytos 3 reikšmės (atitinkančios 25 %) nepatenkančios į zoną su aiškia diagnostine prasme. Tiek vWF:RCo ar vWF:CB santykio su antigenu atveju, į koreliacijos modelį neįtraukiant taškų, stokojančių diagnostinės prasmės, koreliacijos koeficientai nepadidėjo.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

5.1. Aprašomosios statistinės analizės aptarimas

Visiems tiriamiesiems, priklausantiems sveikų atsitiktinai atrinktų ir sergančių vWL ar kitomis nepatikslingomis koaguliopatijomis grupėms, atlikta vWF:Ag, vWF:Ac, vWF:RCo ir vWF:CB tyrimų rezultatų aprašomoji statistinė analizė. Pagrindinis, jos tikslas įvertinti duomenų sklaidą žemų, normos ir aukštų vWF verčių diapazone. Tai itin svarbu vWF:RCo ir vWF:CB atvejais ir palyginamosios metodų atitikimo Passing–Bablok analizės metu, kai korektiška analizė galima tik lyginant visų kliniškai svarbių verčių zonose.

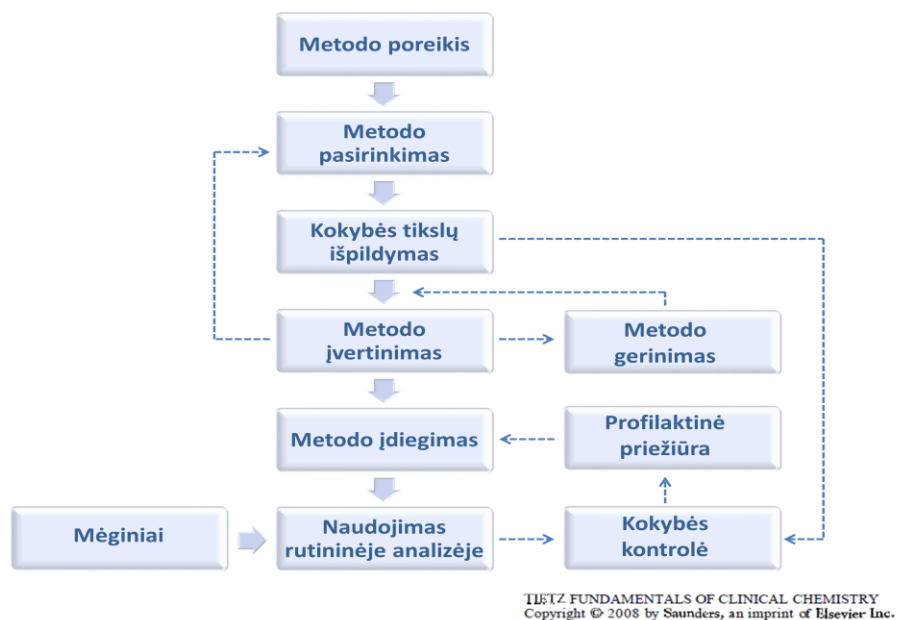
Statistinė aprašomoji analizė išryškino bendrą vWF kiekybinio ir funkcinio aktyvumo aukštų verčių tendenciją, sąlyginai sveikų tiriamųjų grupėje, nors pastarųjų atranka ir vykdyta atsižvelgiant į uždegiminius rodiklius (CRB ir fibrinogeną). Kaip paaiškėjo, šie rodikliai nėra informatyvūs žymuo galintis patikimai nurodyti uždegiminę būklę ir jos lemiamus vWF aktyvumo pokyčius.

Tiriamųjų grupių rezultatų rinkinių sklaida analizuota atskirai. Bendra tiriamųjų grupių rezultatų analizė iškreiptų duomenų centro (medianos) padėtį, kai grupes sudaro ne vienodas tiriamųjų narių skaičius. Sergančių vWL ar kitomis nepatikslingomis koaguliopatijomis grupė yra daugiau nei dvigubai mažesnė, tačiau Lietuvos mastu plėsti imtį tiriamaisiais sergančiais reta kraujo krešėjimo liga yra sudėtinga. Be to, didelės imties tyrimai nėra optimalus pasirinkimas apžvalginių naujų diagnostinių metodų įvertinimo atveju. Kai svarbius aspektus galima įvertinti mažiau išteklių reikalaujančioje mažoje imtyje.

5.2. Rekomendacijų metodo įdiegimui pritaikymas

Tiksliai vWL diferencinei diagnostikai ir būtinas platus laboratorinių metodų spektras galintis įvertinti kiekybinius ir kokybinius vWF defektus. Esančios vWL laboratorinės diagnostikos galimybės ribotos. Šiuo metu VUL SK LMC įdiegti ir naudojami vWF:Ag ir trombocitų agregacijos tyrimo metodai, tuo tarpu Vaikų ligonėje VUL SKF LMC – vWF:Ac. VUL SK LMC siekiama įdiegti metodą vWF funkcijoms nustatyti. Vienas iš galimų pasirinkimų, kurį rekomenduoja naudojamo analizatoriaus „STA R MAX“ (Diagnostica Stago, Prancūzija) gamintojai – vWF:RCo („ABP VWF Ricof Assay“, ABP, Didžioji Britanija). Net ir papildžius vWL diagnostikai skirtų

tyrimų spektrą vWF:RCo metodu, ne visi vWL atvejai gali būti išaiškinti. Užtikrintam vWL nustatymui ir potipio patikslinimui reikalingas specifines vWF funkcijas tiriantis metodas, toks kaip vWF:CB („Asserachrom VWF:CB“, Diagnostica Stago, Prancūzija).



17 pav. Naujo metodo įdiegimo schema

Prieš apsisprendžiant keisti ar įdiegti naują metodą būtina apsvarstyti ir palyginti metodo savybes taip pat įvertinti prielaidas sklandžiam metodo naudojimui. Atsiradus metodo poreikiui, apsisprendimo ir pasirinkimo eigoje rekomenduojama atlikti literatūros šaltinių apžvalgą ir jau aprašytus palyginamuosius tyrimus. Susipažinti su metodo savybėmis, galimybėmis, diagnostine reikšme. Taip pat apsvarstyti galimas alternatyvas. Remiantis visa sukaupta informacija pasirinkti potencialų metodą–kandidatą. Metodo–kandidato patvirtinimui rekomenduojama atlikti preliminarinius įvertinimo tyrimus. Pastarieji turi būtų palakūs kainos ir laiko atžvilgiu. Vertinat metodą atsižvelgiama į:

1. glaudumą,
2. tikslumą (poslinkį) ar lyginamų metodų atitikimą,
3. tiesiškumą matavimo intervale ir tinkamą matavimo intervalo plotį,
4. detekcijos ir kiekybinio vertinimo ribas,
5. interferenciją,

6. reagentų ir mėginių stabilumą,
7. normos ribas.

5.3. vWF:RCo metodo vertinimas

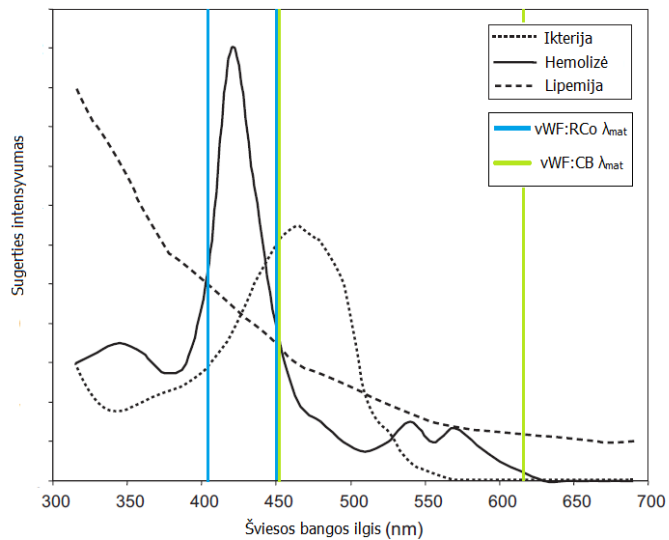
Nors šiuo metu vWF:RCo metodo, kaip priemonės vWF funkcijai įvertinti, reikšmė mažėja, tačiau vis dar išlieka aktuali, tiems laboratorinės diagnostikos centrams, kuriuose nėra galimybės palaikyti ar įdiegti alternatyvius funkcinio vWF tyrimo metodus. Lawrie AS et al. tik vienas iš daugybės šaltinių kritikuojančių vWF:RCo, kaip glaudumo, tikslumo ir jautrumo stokojantį metodą [44]. Pastarieji aspektai išryškėjo ir diegiant vWF:RCo metodą, aprašytą baigiamajame darbe. Naudoto „STA R MAX“ (Diagnostica Stago, Prancūzija) analizatoriaus gamintojai rekomenduoja „ABP VWF RICO ASSAY“ reagentus (ABP, Jungtinė Karalystė), kurie nėra sukurti naudojamam analizatoriui ir metodui. Siūlomas rinkinys skirtas pacientų trombocitų agregacijos tyrimams. Medžiagos tik adaptuotos vWF:RCo tyrimui. Galimi sistemų nesuderinamumo trūkumai galėjo lemti kalibracinės kreivės taškų išsibarstymą. Nors nustatytas determinacijos koeficientas $R^2=0,992$ tenkina gamintojo nurodytą minimalią kalibracinės kreivės determinacijos koeficiento reikšmę $R^2=0,985$, tačiau stebimas akivaizdus neproporcingas skiedimui, optinio tankio pokytis lemiantis netikslią kalibracinės kreivės interpoliaciją (siekiant išlaikyti bendrą 3–ios eilės polinominę priklausomybę) tarp gautų išibarsčiusių kreivės taškų, o ne tiksliai juose. Šį verčių išsibarstymą galėjo lemti netikslus standartinių trombocitų dozavimas, dėl nepakankamai efektyvaus maišymo ir ne homogeniškos trombocitų koncentracijos suspensijoje palaikymo. Galima priežastis – per mažas maišančio magneto paviršiaus plotas.

Naudojantis sugeneruota kalibracinė kreivė išmatuojamos vWF:RCo aktyvumo vertės esančios 13–160 % intervale. Tiriant atsitiktinių pacientų plazmas susidurta su atvejais, kuomet išmatuotos reikšmės yra didesnės nei maksimali kalibracinės kreivės vertė. Siekiant gauti tikslias vertes būtina įdiegti papildomus protokolus, kai tiriama plazma skiedžiama ir tikrosios vWF:RCo aktyvumo vertės apskaičiuojamos įvertinant skiedimą. Didžiausias naudotas skiedimas – 30 kartų. Su problemomis susidurta ir matuojant sergančių vWL ar galimai sergančių vWL pacientų plazmas, kurioms būdingas žemas vWF:RCo aktyvumas. Kalibracinė kreivė apima vWF aktyvumo reikšmes nuo 15 %. Tarp tiriamųjų pacientų pasitaikė atvejų, kuomet vWF:RCo aktyvumas yra mažiau nei 15 %. Trečios eilės polinominė lygtis patikimai aprašo vertes iki 13 % vWF aktyvumo. Nustatyti tikslią

aktyvumo reikšmę svarbu diferencijuojant vWL tipus: 1vWL ar 2vWL būdingas iš dalies ar ženkliai sumažėjęs vWF:RCo aktyvumas, 3 vWL tipui būdingas neišmatuojamas vWF:RCo aktyvumas. Todėl atvejais kai tikrasis vWF:RCo išmatuojamas ir yra reikšmių intervale iki 13 % sistema pateikia atsakymą išraiška <13 %. Tai gali būti klaidingai interpretuojama kaip neišmatuojamas vWF:RCo aktyvumas, būdingas 3 vWL. Sistema sukonfigūruota taip, jog tirama plazma visada skiedžiama 3 kartus, o išmatuotos aktyvumo reikšmės pateikiamos jau įvertinus skiedimą. Minimali aktyvumo vertė su 3 kartų skiedimu gali būti 13 %. Siekiant išmatuoti žemas aktyvumo vertes įvesti papildomi protokolai, kuriuose naudojamas 2 kartų skiedimas arba tirama plazma visai neskiedžiama, nes praskiedus vWF:RCo aktyvumas tampa neišmatuojamas. Įvesti papildomi protokolai skirti matuoti itin aukštoms ir žemoms vWF:RCo aktyvumo reikšmėms reikalauja papildomų laiko ir reagentų sąnaudų, kai tas pats mėginys analizuojamas keletą kartų, nustatant tinkamą skiedimą ir tikrosios reikšmės matavimo intervalą. Tai itin apsunkina efektyvų metodo taikymą rutininėje laboratorinėje praktikoje.

Siekiant įsitikinti tinkamu analizatoriaus veikimu ir reagentų patikimumu atliekama kokybės kontrolė komercine kontroline medžiaga. Patologinių verčių kontrolinė medžiaga yra specializuota ir priklausanti rinkiniui. Normalių verčių kontrolinė medžiaga nėra vWF:RCo reagentų rinkinio dalis. Metodo protokole nurodyta rekomenduojama kontrolinė normalių verčių plazma specializuota kitiems gamintojo metodams ir analizėms. Taip pat nenurodytas ir normalių verčių kontrolės vidurkis ir reikšmių patekimo intervalas. Vadinasi, normalių reikšmių zonai netaikoma jokia kokybės kontrolė. Tokia praktika gali lemti klaidingus vWF:RCo rezultatus ir rezultatų interpretacijos klaidas. 1 vWL ir 2 vWL atvejais vWF:RCo aktyvumas gali būti normos ribose, todėl būtina, kad ir normalių verčių zonoje išmatuoti rezultatai būtų patikimi.

vWF:RCo aktyvumas įvertimas optinio tankio pokyčiu nustatomu 540 ir 405 nm bangos ilgyje. Šiame bangos ilgyje hemoglobino formoms, bilirubinui, chilomikronams ar triacilgliceroliams nebūdinga maksimali sugertis. Ikianalizinių klaidų ar klinikinių būklių atveju galimai vyksiančios spektrinės interferencijos įtaka vWF:RCo vertėms minimali. Ikterijos, hemolizės ir lipemijos įtaką vWF:RCo rezultatams vaizduojama 18 paveiksle.



18 pav. Analizuojamų metodų vWF:RCo ir vWF:CB matavimo bangos ilgiai mėginio ikterijos, hemolizės ir lipemijos sugerties atžvilgiu [45] (λ_{mat} – matavimo bangos ilgis).

Trumpiausias vWF:RCo rinkinio komponentų stabilumas – 4 valandos. vWF:CB metodo reagentų rinkinys gali būti dalinamas į 2 dalis. Kiekviena dalis skirta įvykdyti 28 reakcijoms. Kiekvienos analizės metu privaloma sukurti kalibracinę kreivę ir atlikti bent patologinių verčių kokybės kontrolę. Kalibracinė kreivė sudaryta iš 6 taškų, kai vienam taškui gauti vykdomos 2 reakcijos. Vieno lygio kokybės kontrolei vykdomos taip pat 2 reakcijos. Vadinasi vien įgyvendinti būtinas metodo ir kokybės kontrolės sąlygas reikalinga 14 reakcijų. Maksimaliai išnaudojant reagentų rinkinį optimalu rinkinį dalinti išnaudojant vieną dalį iš dviejų, kai įvykdžius būtinas metodo ir kokybės kontrolės sąlygas ir ištiriama 14 pacientų arba rinkinio nedalinti, kai įvykdžius būtinas metodo ir kokybės kontrolės sąlygas ir ištiriami 42 pacientai. Optimalios sąlygos priklauso nuo įstaigoje esančio klinikistų užsakymų skaičiaus, VUL SK numanomas galimas vWF:CB poreikis gali būti suderinamas su efektyviu (kaštų atžvilgiu) metodo įgyvendinimu, išlaikant palankų užsakymo išpildymo laiką.

vWF:RCo gamintojas nepateikia metodui pritaikyto pamatinių biologinių verčių intervalo. Naudojamosi bendromis literatūros šaltiniuose nurodomomis normos vertėmis.

5.4.vWF:CB metodo vertinimas

Komercinis „Asserachrom VWF:CB“ (Diagnostica Stago, Prancūzija) reagentų rinkinys pritaikytas „Gemini“ analizatoriui (STRATEC Biomedical AG, Vokietija). Šis analizatorius gali vykdyti visiškai automatizuotas ELISA tipo reakcijomis pagrįstas metodikas. Tačiau diegiant „Asserachrom VWF:CB“ metodą to padaryti nepavyko. Susidurta su techninėmis kliūtėmis, kai analizatoriaus dalys – reagentų talpų laikikliai neatitinka pačių reagentų talpų ar minimalių likutinių tūrių. Dėl šio sistemų nesuderinamumo pasirinkta alternatyvi ELISA tipo reakcijų vykdymo metodika – pusiau automatinis būdas, kai mėginių ir reagentų patalpinimas į reakcijos vietą vykdomas rankiniu būdu. Kritinė ir itin svarbi plovimo stadija, garantuojanti ELISA reakcijų sėkmę, vykdyta automatiškai. Rankiniu būdu dozuojuant mėginius ar reagentus didėja sisteminių ir atsitiktinių klaidų tikimybė. Tai gali lemti didelę variaciją ir žemo lygio pakartojamumą. Pastarasis aspektas galėjo turėti įtakos pakartojamumui metodo viduje, kuris netenkina gamintojo nurodymų. Kita vertus, gamintojo nurodytas pakartojamumas metodo viduje yra maždaug dvigubai mažesnis nei įprastai nustatomi literatūros šaltiniuose, tiriančiuose vWF:CB metodų, pagrįstų ELISA tipo reakcijomis, charakteristikas (pvz. [36]). Galima įtarti, jog gamintojo nurodytos charakteristikos gali būti išpildomos tik esant idealios sutapties sąlygoms, kai naudojama ta pati analizinė sistema. Tačiau įsitikinti būtų sunku, to gamintojas nenurodo. Pateikti itin žemi pakartojamumo ir atkuriamumo variacijos koeficientai vertinami ne kaip realiai išpildomas kokybės kriterijus, o komerciniais motyvais pagrįstas rodiklis. Juo labiau, ir esant didesniems pakartojamumo variacijos koeficientams nenustatyta reikšminga įtaka galinti neigiamai paveikti rezultatų interpretaciją ir klinikinius sprendimus.

Iš sugeneruotos kalibracinės kreivės išmatuojamos vWF:CB aktyvumo vertės esančios 6,13–98 % intervale. Kalibracinę kreivę aprašanti tiesės lygtis patikimai atspindi aktyvumo priklausomybę 1–140 %. Tai yra darbinis matavimo intervalas. Tiriant plazmas su patologinių verčių vWF:CB aktyvumu matavimo intervalas pakankamas. Tačiau tiriant normalių verčių plazmas dažnu atveju 1–140 % matavimo intervalo nepakanka. Tuo įsitikinta tiriant atsitiktinių pacientų grupę, kai iš 20 tiriamųjų 7 nepavyko išmatuoti tikslios vWF:CB aktyvumo vertės, dėl viršyto matavimo intervalo. Šiuo atveju atsakymo rezultatai įgauna pusiau kiekybinį pavidalą (>140%). Galimas tyrimo kartojimas skiedžiant tiriamą plazmą nėra racionalus ir taikytinas kai tyrimas trunka apie 3 valandas. Galimas šios problemos sprendimo būdas skiesti tiriamųjų plazmas 1:51 ar 1:102,

kaip nurodyta gamintojo metodikose. Tačiau atsiranda rizika gauti žemas, neišmatuojamas vWF:CB aktyvumo vertes, kai neturima jokio preliminaraus numanymo, kokia tikroji vWF aktyvumo vertė. Kaip tik šios aplinkybės dažnai susiklosto rutininėje klinikinės laboratorijos praktikoje.

vWF:CB aktyvumas įvertimas optinio tankio pokyčiu nustatomu 450 nm ir 620 nm bangos ilgiuose. Pastarajame bangos ilgyje hemoglobino formoms, bilirubinui, chilomikronams ar triacilgliceroliams nebūdinga maksimali sugertis (18 paveikslas). Vadinasi vWF:CB metodas gali būti taikomas esant tiriamos plazmos neženkliai hemolizei, ikterijai ar lipemijai. Ikianalizinių klaidų ar klinikinių būklių atveju galimai vyksiančios spektrinės interferencijos įtaka vWF:CB vertėms minimali.

Trumpiausias vWF:CB rinkinio komponento stabilumas – 4 valandos. vWF:CB metodo reagentų rinkinys gali būti dalinamas į 3 dalis. Kiekviena dalis skirta įvykdyti 32 reakcijoms. Kievinos analizės metu privaloma sukurti kalibracinę kreivę ir atlikti bent pataloginių verčių kokybės kontrolę. Kalibracinė kreivė sudaryta iš 5 taškų, kai vienam taškui gauti vykdomos 2 reakcijos. Vieno lygio kokybės kontrolei vykdomos taip pat 2 reakcijos. Vadinasi vien įgyvendinti būtinas metodo ir kokybės kontrolės sąlygas reikalinga 12 reakcijų. Maksimaliai išnaudojant reagentų rinkinį optimalu dalinti išnaudojant vieną dalį iš trijų, kai įvykdžius būtinas metodo ir kokybės kontrolės sąlygas ir ištiriama 10 pacientų (1–am pacientui po 2 pakartojimus), rinkinį dalinti išnaudojant dvi dalis iš trijų, kai įvykdžius būtinas metodo ir kokybės kontrolės sąlygas ir ištiriama 26 pacientai ar rinkinio nedalinti, kai įvykdžius būtinas metodo ir kokybės kontrolės sąlygas ir ištiriami 42 pacientai. Optimalios sąlygos priklauso nuo įstaigoje esančio klinacistų užsakymų skaičiaus. VUL SK numanomas galimas vWF:CB poreikis gali būti suderinamas su efektyviu (kaštų atžvilgiu) metodo įgyvendinimu, išlaikant palankų užsakymo atlikimo laiką.

Šio tyrimo metodo privalumas tas, jog gamintojas pateikia metodui pritaikytas pamatinių biologinių verčių intervalo reikšmes. Pateikiamose normose atsižvelgiama ir į kraujo grupę įtaką normalioms vWF:CB vertėms.

5.5. vWF:RCo ir vWF:CB metodų tinkamumo įvertinimas

Siekiant racionaliai ir nešališkai įvertinti realias metodo įdiegimo galimybes kiekvienas iš metodų–kandidatų vertinamas pagal 7 savybes. Jei metodas pateisina vertinamą savybę, suteikiamas „+“, jei ne „-“. Įvertis „+/-“ suprantamas kaip iš dalies pateisinta savybė ir vertinama teigiamai „+“,

bet su tam tikromis išlygomis. Sumuojant bendrą „+“ skaičių šis įvertis kiekybiškai įgauna 1/2 „+“ vertę. Galutiniai metodų vertinimo rezultatai pateikiami 11 lentelėje.

Dėl tiriamo metodo trūkumų lėmusių eksperimento schemos pasikeitimus (išėkvotos galimos reakcijos), tiriamajame darbe nebuvo įvertintas vWF:RCo metodo glaudumas. Tuo tarpu vWF:CB metodo glaudumas tenkino keliamus reikalavimus. Naudojant Passing–Bablok metodų palyginimo modelį nustatyta, jog vWF:RCo metodas netenkina keliamų poslinkio reikalavimų ir pasižymi žemu atitikimu etaloniniam metodu, kai vWF:CB atitikimas vWF:Ac yra geras, o poslinkis tenkina keliamus reikalavimus. Vertinant tiesiškumą matavimo intervale atsižvelgiama į kalibracijos sėkmę ir kalibracinės kreivės kokybę. Abiem metodams įvykdyta sėkminga kalibracija su reikalavimus tenkinančiais determinacijos koeficientais. Analizuojant abu tiriamus metodus susidurta su matavimo intervalo pločio trūkumais. Kai dažnu atveju nustatomos vWF aktyvumo vertės viršija matavimo intervalo plotį, taip komplikuojamas tikslus kiekybinis vWF aktyvumo įvertinimas. Ši problema gali būti sprendžiama taikant mėginio skiedimus. vWF:RCo atveju matavimo intervalas neapima itin aktualių žemo vWF:RCo aktyvumo verčių, tačiau ši problema iš dalies gali būti sprendžiama panaikinant pirminį mėginio skiedimą pirminiame protokole. vWF:CB detekcijos riba siekia 1 %, tai puikiai pateisina keliamus detekcijos ribų reikalavimus. Tiriamiems metodams nenustatytas galimas reikšmingas optinės interferencijos poveikis. vWF:RCo reagentų stabilumas trumpas ir sunkiai suderinamas su efektyviu reagentų ir išteklių naudojimu. vWF:RCo gamintojai nepateikia rekomenduojamų normos verčių, o vWF:CB gamintojai pateikia rekomenduojamas normos vertes.

11 lentelė. Galutiniai metodų įvertinimo rezultatai („+“ – metodas pateisina vertinamą savybę; „-“ – metodas ne pateisina vertinamos savybės; „+/-“ – iš dalies pateisinta savybė).

Vertinama savybė	vWF:RCo	vWF:CB
1. Glaudumas	Nėra duomenų	+
2. Tikslumas (poslinkis) ir lyginamų metodų atitikimas	-	+
3. Tiesiškumas matavimo intervale	+	+

4. Matavimo intervalo plotis, detekcijos riba, kiekybinio vertinimo riba	+/-	+/-
5. Interferencija	+	+
6. Reagentų ir mėginių stabilumas	-	+
7. Normos ribos	-	+
Bendras „+“ skaičius (Visi galimi)	2,5 (6)	6,5 (7)

Susumavus gautus rezultatus paaiškėjo, jog vWF:RCo nepateisino metodui keliamų lūkesčių. vWF:RCo nerekomenduojama svarstyti kaip galimo patikimo metodo vWF aktyvumui vertinti. Juo labiau kai egzistuoja puiki alternatyva – vWF:Ac metodas. vWF:CB gali būti svarstomas kaip tinkamas metodas vWF aktyvumui ir funkcijoms vertinti.

5.6. Pacientų sergančių vWL ar įtariama vWL atvejų analizė

9 pacientų grupei su diagnozuota ar įtariama vWL atliktas visas VUL SK LMC ir Vaikų ligonės VUL SKF LMC esančių laboratorinių tyrimų spektras, skirtas vWL diagnostikai. Taip pat pacientai tirti ir naujai įdiegtais vWF:RCo ir vWF:CB metodais. Kadangi metodai nėra patvirtinti šių tyrimų rezultatai vertinami kaip papildoma, gretutinė informacija, o ne patikimas kriterijus priimti klinikinius sprendimus. Pacientų atvejų analizė ir interpretacija atlikta remiantis tyrimų rezultatais pateiktais 3 priede.

Pacientė LT–1 yra 6 metų amžiaus mergaitė su kraujavimo klinika. Pacientės kraujo grupė O Rh(D) teigiama (+), todėl rezultatų analizėje naudotasi normomis rekomenduojamomis šiai kraujo grupei. Stebimi rutininių kraujo krešėjimo tyrimų pokyčiai: pailgėjęs PT ir ADTL laikas. Taip pat stebimi specifinių vWL diagnostinių tyrimų pokyčiai. vWF:Ag ir vWF:Ac aktyvumo sumažėjimas ir vWF:Ac/ vWF:Ag santykio sumažėjimas lygus 0,6. Pastaroji santykio vertė būdinga kokybiniais vWF pokyčiams ir sutrikusiai funkcijai. Funkcijos sutrikimai būdingi 2 tipo vWL. Galimą 2vWL tipo diagnozę iliustruoja ir vWF:RCo ir vWF:CB vertės, kurios ženkliai sumažėjusios ir artimos detekcijos ribai. Taip pat ir vWF:RCo/ vWF:Ag ir vWF:CB/ vWF:Ag santykiai lygūs 0,2. Tai rodo

ryškius vWF funkcijos pakitimus. Toliau atlikti tyrimai skirti diferencijuoti 2 tipo vWL potipius. Atlikus FVIII aktyvumo tyrimus atmesta 2N vWL. Nors FVIII aktyvumas ir sumažėjęs tačiau FVIII/vWF:Ag santykis lygus 1,8 išduoda, jog pacientės vWF specifinės sąveikos su FVIII nepakitusios. Bendras FVIII aktyvumo sumažėjimas atsiranda dėl bendro vWF:Ag aktyvumo sumažėjimo, kai dėl vWF deficito FVIII degraduojamas. Galimą FVIII stoką ir hemofiliją paneigia sumažėjęs vWF aktyvumas. Taip pat ekskliuduojamas 2B vWL, kai RIPA-L rezultatai yra normos ribose. Taip pat nestebimas RIPA-H sumažėjimas aišinamas kiekybiniais ir kokybiniais vWF pokyčiais. Tolesnei 2A vWL ar 2M vWL diferenciacijai būtina multimerų analizė elektroforezės metodu. 2M vWL tipui būdinga DMM multimerų stoka, kai 2A vWL multimerų elektroforezinis profilis normalus.

Pacientas LT–2 yra 2 m. amžiaus berniukas su netipine kraujavimo klinika. Būdingos visame kūne atsirandančios sunkiai gyjančios kraujosrūvos. Kraujosrūvų atsiradimą sukelia net nežymus fizinis kontaktas, pvz. vaikiškos kepurėlės ryšio įspaudas. Stebimi rutininių kraujo krešėjimo tyrimų pokyčiai – ženkliai pailgėjęs ADTL laikas. Taip pat padidėjęs trombocitų skaičius, aiškinamas mieloidinio kamieno aktyvinimu po nukraujavimų. Atlikus vWL diagnostikai skirtus tyrimus nukrypimai nuo normos verčių nestebimi. Vienintelis pokytis – fibrinogeno koncentracijos ir FVIII aktyvumo padidėjimas. Galima uždegiminė būklė, maskuojanti vWF pokyčius. Uždegimas gali turėti įtakos ir trombocitozei. Rekomenduotina ir tikslinga kartoti tyrimus būklei pagerėjus.

Pacientas LT–3 yra 5 m. amžiaus berniukas su kraujavimo klinika ir pailgėjusiu kraujavimo laiku. Paciento kraujo grupė B Rh(D) neigiama(–). Kraujo grupės įtaka vWF aktyvumui nebūdinga. Rutininių kraujo krešėjimo tyrimų pokyčiai nestebimi. Specifiniai vWL diagnostiniai tyrimai atskleidžia kokybinius vWF funkcijos pakitimus, kai vWF:Ag normos ribose, o vWF:Ac sumažėjęs. Tai atspindi ir vWF:Ac/ vWF:Ag santykis lygus 0,5. Papildomi funkcijų tyrimai vWF:RCo ir vWF:CB papildo ankstesnius radinius ir atspindi funkcinis vWF pokyčius ir 2 tipo vWL. Agregacijos tyrimų rezultatai su LRIPA agonistu paneigia 2B potipio vWL. Taip pat atmetama ir 2N potipio vWL, nes nustatytas FVIII aktyvumas ir santykis su vWF:Ag normos ribose. 2A ir 2M vWL potipių skirtumai nustatomi tik multimerų elektroforezės būdu, kai 2A vWL atveju stebima DMM multimerų stoka, o 2N vWL metu pasiskirstymo profilis normalus. Dar vienas, ne itin jautrus kriterijus vWF:CB aktyvumas. 2M vWL atveju vWF:CB vertės normos ribose ar sumažėjusios neženkliai, kai 2A vWL metu vWF:CB sumažėjimas ženklus. Pastarasis atvejis vWF:CB aktyvumo

atžvilgiu giminingsnis 2M potipio vWL. Tiksliam vWL tipo nustatymui rekomenduojama atlikti multimerų analizę elektroforezės metodu.

Pacientė LT–4 yra 12 m. mergaitė, kuria būdinga ryški kraujavimo klinika. Pacientės kraujo grupė O Rh(D) teigiama (+), todėl rezultatų analizėje naudotasi normomis rekomenduojamomis O kraujo grupei. Atlikus rutininis kraujo krešėjimo tyrimus nustatytas ADTL pailgėjimas. Specifiniai vWF tyrimai nerodo reikšmingų nukrypimų nuo normos. Agregacijos tyrimo metu nustatyta ribinė agregacijos aktyvumo vertė su ADP agonistu ir sumažėjęs aktyvumas su didelės koncentracijos ristocetinu. Pastarasis radinys nurodo, jog galimi trombocito ar jo paviršiaus struktūrų (receptorių) pokyčiai. Šis įtarimas kyla lyginat vWF:RCo ir vWF:Ac su RIPA agregacijos rezultais. vWF:RCo ir vWF:Ac tyrimai nerodo nukrypimų nuo normos. Vadinasi sąveika tarp standartinių trombocitų (su normaliomis paviršiaus struktūromis) ir pacientės vWF yra nepakitusi. Todėl atmetama vWL, dėl vWF multimerų pokyčio galimybės. Nukrypimai išryškėja tuomet, kai reakcijoje dalyvauja tiriamosios trombocitai. Agregacijos pokyčiai tik su ADP ir RISTO–H agonistu būdingi trombocitų kaupimo sutrikimams, bei egzogeninių preparatų sukeltiems krešėjimo sutrikimams, Bernard–Soulier sindromui, TT vWL. Žinoma, kad pacientė nevarato jokių vaistų. Be to, pacientės mamai nustatyta nepatikslinga koagulopatija su panašia klinikine išraiška kaip ir pacientei. Kraujo tepinėlyje stebimi morfologiniai pokyčiai: dideli trombocitai, tačiau trombocitopenijos nėra. Bernard–Soulier sindromas ir TT vWL diagnozės atmetos atlikus trombocitų GpIb receptorių tipavimo tyrimus, tekės citometru. Pokyčiai nenustatyti. Nepaneigti lieka tik trombocitų granulių saugojimo ir išskyrimo sutrikimai. Šiuo metu diagnozė įvardinta kaip nepatikslingi kokybiniai trombocitų pakitimai.

Pacientas LT–5 yra 9 m. amžiaus berniukas. Pacientės LT–4 brolis. Šiam tiriamajam nebūdinga žymi kraujavimo anamnezė. Pastebėtas retai pasireiškiantis kraujavimas iš nosies, galimai ne spontaniškas, o išprovokuotas aplinkos poveikio. Laboratoriniai tyrimai atliekami siekiant įvertinti galimą paveldėjimą ir ligos fenotipo pasireiškimą šeimoje, kai LT–4 ir LT–5 mamai nustatyta neaptikslinga trombocitopatija. Pacientui LT–5 atlikus visą galimų vWL tyrimų spektrą, pokyčiai nenustatyti. Išskyrus ideopatinę trombocitozę, kuriai priežastis nenustatyta.

Pacientė LT–6 yra 2 m. amžiaus mergaitė, su būdinga švelnia kraujavimo klinika. Pacientei nustatyta A kraujo grupė Rh(D) teigiamas(+), kraujo grupė įtakos vWF tyrimų rezultatų interpretacijai įtakos neturi. Atlikus tyrimus skirtus vWF kokybiniais ir kiekybiniais pokyčiams įvertinti pakitimai nenustatyti. Pastariesiems radiniams prieštarauja RIPA–H tyrimo rezultatai. Su

didelės koncentracijos ristocetino agonistu nustatytas žemas agregacijos aktyvumas. Skiekiant atmesti atsitiktinės klaidos tikimybę tyrimus rekomenduojama kartoti. Rezultatams atsikartojus būtina kokybinių trombocitų pokyčių diferenciacija nuo vWL. Tam pasitarnautų vWF multimerų tyrimai.

Pacientė LT–7 yra 15 metų mergina. Būdinga klinika – gausus kraujavimas menstruacijų metu. Taip pat nereguliarus ciklas, kurio gydymui paskirti geriamieji kontraceptikai. Atlikti tyrimus nustayta padidėjusi fibrinogeno koncentracija taip pat padidėjęs vWF:RCo, vWF:CB ir FVIII aktyvumas. Didelė tikimybė, kad minėtus pokyčius sukelia taikoma terapija. Rekomenduojama tyrimus kartoti nutarukus gydymą kontraceptinėmis tabletėmis.

Pacientas LT–8 12 metų berniukas. Su teigiama kraujavimo klinika ir šeimine anamneze. Paciento mamai diagnozuota 1 tipo vWL. Rutininių kraujo krešėjimo tyrimų pokytis – pailgėjęs ADTL. Sumažėjusi vWF:Ag vertė nurodo apie kiekybinius vWF pokyčius. Atveju, kai stebimas kiekybinis vWF:Ag sumažėjimas, žemesnės vWF:Ac, vWF:RCo, vWF:CB aktyvumo vertės nebūtinai nurodo kokybinius vWF pokyčius. 1 ir 2 vWL tipų diferenciacijai naudojami surogatiniais išvestiniais rodikliais. Nustatytas vWF:Ac/vWF:Ag ir vWF:RCo/vWF:Ag santykių sumažėjimas liudija galimą 2 tipo vWL ir vWF funkciją pažeidžiančius pokyčius. Netipiškai vWF:CB/vWF:Ag santykio vertė – normali. Tokia santykių kompozicija būdinga 2M vWL potipui, kai atmesta 2N vWL tipo galimybė, esant FVIII/vWF:Ag normos ribose. Vertėtų pastebėti, kad ženklus kiekybinis vWF sumažėjimas lemia vWF funkcinio aktyvumo pokyčius dėl bendros vWF stokos. Šiuo atveju, kai vWF:Ag aktyvumas itin žemas, išvestinių rodiklių skaičiavimas nėra adekvatus. Kaip bebūtų, patvirtinimui būtina atlikti multimerų tyrimus.

Pacientė LT–10 14 metų mergina, kuriai diagnozuota nepatikslinta koaguliopatija. Būdinga klinika – menoragija. Pacientės kraujo grupė – O Rh(D) teigiama(+). Atliktus tyrimus nustatytas ADTL pailgėjimas. vWL specializuotų diagnostinių tyrimų rezultatų nukrypimai nuo nuormos nenustatyti išskyrus vWF:CB aktyvumo sumažėjimą. Tik izoliuotas vWF gebos prijungti kolageną sumažėjimas, be bendro funkcinio aktyvumo sumažėjimo nenurodo aiškių vWF pakitimų. Įprastai bendro aktyvumo vertės turėtų gerai iliustruoti specifinio aktyvumo vertės. Šiuo atveju taip nėra. Atmetus atsitiktinės vWF:CB matavimo klaidos galimybę, šie radiniai galėtų būti nežymių kokybinių vWF defektų atveju. Kai nestebimi bendro funkcinio aktyvumo pokyčiai, tiklus potipio nustatymas galimas tik atlikus vWF multimerų analizę elektroforezės metodu.

5.7. Pacientų atvejų analizės aptarimas

Skirsnyje aptariami pacientų atvejų analizės metu išryškėję vWF:RCo ir vWF:CB rezultatų aspektai.

Analizuojant vWL sergančių ar galimai sergančių pacientų atvejus pastebėta, kad visais atvejais vWF:RCo vertės iliustravo vWF:Ac vertes, nors metodų palyginamosios analizės metu, vWF:RCo nerodė patenkinamo vWF:Ac atitikimo. Kaip bebūtų tiek tiriamojo darbo metu, tiek litertūros apžvalgos metu paaiškėjo, jog vWF:RCo patikimumas abejotinas.

Didžiojoje dalyje atvejų vWF:CB iliustravo vWF:Ac vertes. Išskiriant atvejį, kuriame analizuojamas LT–8 pacientas, kai vWF:CB santykis galimai išryškina specifinius vWF funkcijos pokyčius, būdingus tik 2MvWL.

Didžiąjai daliai atvejų patvirtinti būtina vWF multimerų analizė. Jos metu gaunamas multimerų kompozicijos profilis yra vWF struktūrinės visumos atspindys, naudojamas nustatyti sąsajas su galimais kiekybiniais ar funkciniais pakitimais. Multimerų tyrimai neįrodo vWF funkcinių savybių. Funkcinis aktyvumas gali būti vertinamas tiesiogiai, kaip geba sąveikauti su tikslinėmis struktūromis. Taigi, patikimam ligos diagnozavimui būtini vienas kitą papildantys metodai. Nors atvejų aptarime multimerų tyrimai įvardinami kaip patvirtinamieji, kitais metodais (vWF:CB ir vWF:Ac) nustatyti radiniai neturėtų prieštarauti, o tik papildyti pirmuosius.

6. IŠVADOS

1. Von Vilebrando faktoriaus ristocetino kofaktoriaus aktyvumo tyrimas (VWF:RCo) netenkino kokybinių ir techninių reikalavimų, todėl naudoti von Vilebrando ligos diagnostikai nėra tinkamas.
2. Von Vilebrando faktoriaus kolageno jungiamosios gebos aktyvumo **tyrimas** (VWF:CB) tenkino techninius ir kokybinius reikalavimus, todėl naudoti von Vilebrando ligos diagnostikai yra tinkamas.
3. Tik von Vilebrando faktoriaus kolageno jungiamosios gebos aktyvumo tyrimo (VWF:CB) rezultatai gali būti pritaikyti surogatiniams von Vilebrando ligos žymenims skaičiuoti ir von Vilebrando faktoriaus funkcijoms vertinti.
4. Atlikus sergančių von Vilebrando liga ir asmenų su įtariama von Vilebrando liga atvejų analizę paaiškėjo, kad VWF:CB gali būti naudojamas kaip von Vilebrando ligos žymuo, tačiau jo įtraukimas į von Vilebrando ligos diagnostikai taikomų tyrimų spektrą nėra pakankamas iki galo diferencijuoti von Vilebrando ligos tipą.

7. SUMMARY

Practical application of diagnostic guidelines and implementation of new markers of von Willebrand disease

Background. Von Willebrand disease (vWD) is the most common genetic bleeding disorder caused by missing or defective von Willebrand factor (vWF). There are three main types of vWD based on qualitative or quantitative defects of VWF. Type 1 vWD is most common type. It causes lower-than-normal levels of VWF to occur in body. Meanwhile Type 3 vWD is **very** rare. People with type 3 vWD have a quantitative deficiency of vWF. People with type 2 vWD have a qualitative deficiency of vWF. Type 2 is classified into subtypes, including: 2A, 2B, 2M, 2N. Laboratory diagnosis of vWD requires a series of assays. In this master thesis Von Willebrand factor Ristocetin Cofactor (vWF:RCo) and von Willebrand factor collagen binding (vWF:CB) assays were applied as new additional vWD markers.

Methods. vWF:RCo and vWF:CB assays were implemented and evaluated by precision, measured bias, linearity over the measuring interval or analytical measurement range, limit of detection, limit of quantitation, interference, reagent carryover, reference interval or decision value. 29 blood specimens were collected from 2 groups of individuals: 20 healthy persons and 9 patients with confirmed or suspected vWD. All individuals were tested for vWF:RCo (ABP VWF Ricof Assay, ABP, UK) and vWF:CB (Asserachrom VWF:CB, Diagnostica Stago, France). Tests results were compared against a reference vWF:Ac method (Innovance VWF:Ac, Siemens Healthcare Diagnostics, Germany) to determine analytical accuracy. Additionally, patients were evaluated for other vWD markers: factor VIII, vWF antigen (vWF:Ag), platelet aggregation with ristocetin.

Results. Performance of both implemented assays according to internal quality control requirements were shown to be acceptable. Evaluation by biological variation concept was acceptable for vWF:CB assay, but not for vWF:RCo. Comparison between different methods revealed that vWF:RCo does not approve raised criteria. Surrogate vWD markers (ratios of vWF:RCo and vWF:CB to vWF:Ag) have shown statistically significant correlation $r=0,741$ ($p=0,001$) and $r=0,699$ ($p=0,011$) with corresponding surrogate vWD markers of reference method (ratio of vWF:Ac to vWF:Ag).

Conclusion. Only vWF:CB assay has proved it's usefulness as an additional vWD marker, but vWD cases analysis revealed that this functional activity test is not enough for proper subtyping of vWD. Several other methods, such as vWF multimer analysis or flow cytometry, are needed.

Key words. Von Willebrand disease, von Willebrand factor, von Willebrand factor Ristocetin Cofactor assay, vWF:RCO, von Willebrand factor collagen binding assay, vWF:CB.

Literatūros sąrašas

1. Bowman M, Hopman WM, Rapson D, Lillicrap D, Silva M, James P. A prospective evaluation of the prevalence of symptomatic von Willebrand disease (VWD) in a pediatric primary care population. *Pediatr Blood Cancer*. 2010; 55(1): 171–3.
2. Lillicrap D. von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy. *Blood* 2013; 122: 254–60.
3. Veyradier A, Boisseau P, Fressinaud E, Caron C, Ternisien C, Giraud M et al. A Laboratory Phenotype/Genotype Correlation of 1167 French Patients From 670 Families With von Willebrand Disease. A New Epidemiologic Picture. *Medicine* 2016; 95(11): e3038.
4. Springer TA. Biology and physics of von Willebrand factor concatamers. *J Thromb Haemost* 2011; 9(1): 130–143.
5. McGrath RT, McRae E, Smith OP, O'Donnell JS. Platelet von Willebrand factor – structure, function and biological importance. *British Journal of Haematology* 2010; 148: 834–843.
6. Kanaji S, Fahs SA, Shi Q, Haberichter SL, Montgomery RR. Contribution of platelet vs. endothelial VWF to platelet adhesion and hemostasis. *Thromb Haemost*. 2012; 10: 1646–52.
7. Giblin JP, Hewlett LJ, Hannah MJ. Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Blood* 2008; 112: 957–64.
8. Kusuma S, Zhao S, Gerecht S. The extracellular matrix is a novel attribute of endothelial progenitors and of hypoxic mature endothelial cells. *FASEB J* 2012; 26: 4925–36.
9. Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, Voorberg J, Eikenboom J. Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood*. 2011; 117(19): 5033-43.
10. Rondaj MG, Bierings R, Kragt A, van Mourik JA, Voorberg J. Dynamics and plasticity of WeibelPalade bodies in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26(5): 1002–07.
11. McGrath RT, McRae E, Smith OP, O'Donnell JS. Platelet von Willebrand factor – structure, function and biological importance. *Br J Haematol* 2010; 148: 834–43.
12. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews* 2009; 23: 177–89.
13. Fitch-Tewfik JL, Flaumenhaft R. Platelet granule exocytosis: a comparison with chromaffin cells. *Front Endocrinol* 2013; 26(4): 1–11.

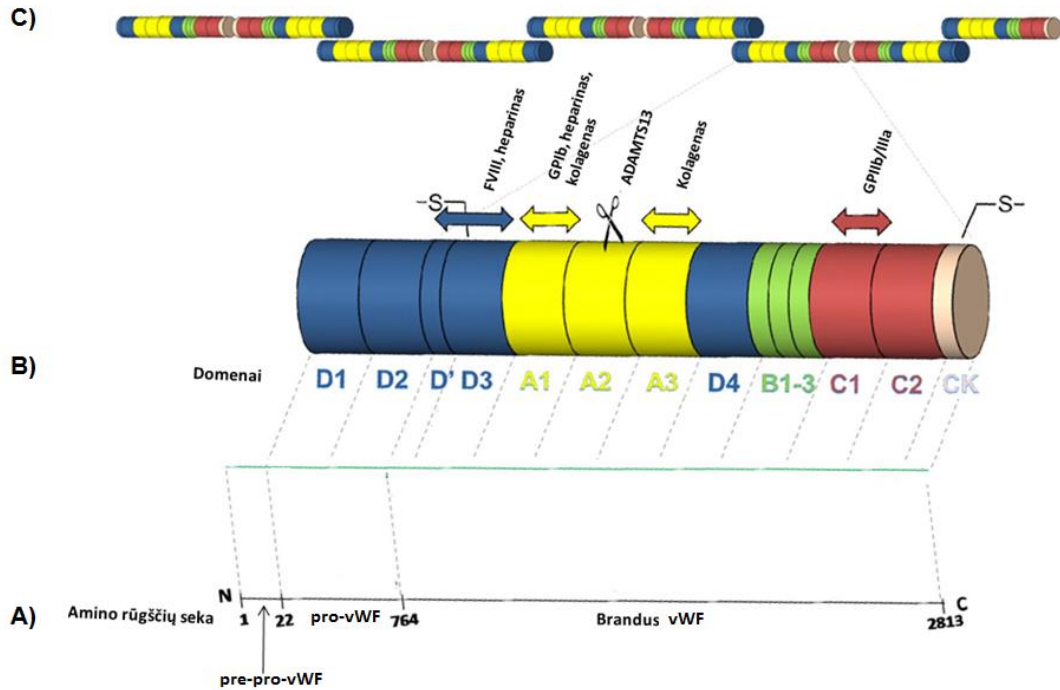
14. Lenting PJ, Denis CV. Platelet von Willebrand factor: sweet resistance. *Blood* 2013; 122(25): 1007.
15. van Loon JE. Genetic determinants of von Willebrand Factor and the risk of cardiovascular disease. *Daktaro disertacija*. Rotterdam; 2012.
16. Franchini M, Liumbruno GM. ABO blood group: old dogma, new perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(8): 1545–53.
17. Bergmeier W, Hynes RO. Extracellular Matrix Proteins in Hemostasis and Thrombosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4: a005132.
18. Terraube V, O'Donnell JS, Jenkins PV. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia* 2010; 16: 3–13.
19. Crawley JTB, Groot R, Xiang Y, Luken BM, Lane DA. Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2011; 118(12): 3212–21.
20. James PD, Notley C, Hegadorn C, Leggo J, Tuttle A, Tinlin S et al. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: results from a Canadian cohort study. *Blood* 2007; 109(1): 145–54.
21. Castaman G, Hillarp A, Goodeve A. Laboratory aspects of von Willebrand disease: test repertoire and options for activity assays and genetic analysis. *Haemophilia* 2014; 20 (4), 65–70
22. A. Hamilton, M. Ozelo, J. Leggo, C. Notley, H. Brown et al. Frequency of Platelet type versus Type 2B von Willebrand Disease. *Thromb Haemost* 2011; 105(3): 501–508.
23. Mohammad S. Enayat,¹ Andrea M. Guilliat,¹ William Lester,² Jonathan T. Wilde,² Michael D. Williams¹ and Frank G.H. Hill¹. Distinguishing between type 2B and pseudo-von Willebrand disease and its clinical importance. *Brit J Haematol* 2006; 133: 664–666.
24. Paramo JA, Bounameaux H, Levi M, YH Lip G, Marco P, Reverter JC, Tosetto A. *Practical Manual. Scores and Algorithms in Haemostasis and Trombosis*. Ambos Marketing Services, Barselona, 2014.
25. Federici AB, Bucciarelli P, Castaman G, Mazzucconi MG, Morfini M et al. The bleeding score predicts clinical outcomes and replacement therapy in adults with von Willebrand disease. *Blood* 2014; 123: 4037-4044.
26. Federici AB, Mannucci PM, Castaman G, et al. Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: A cohort study of 67 patients. *Blood* 2009; 113: 526–34.

27. Roschitz B, Thaller S, Koestenberger M, Koestenberger M, Wirnsberger A, Leschniket B et. al. PFA-100 closure times in preoperative screening in 500 pediatric patients. *Thromb Haemost.* 2007;98(1):243-247.
28. Textbook of Hemophilia, Third Edition. Edited by Christine A. Lee, Erik E. Berntorp and W. Keith Hoots. 2014 John Wiley & Sons, Ltd. Published 2014 by John Wiley & Sons, Ltd. CHAPTER 50 von Willebrand disease: biological diagnosis. p 370.
29. Castman G, Hillarp A, Goodeve A. Laboratory aspects of von Willebrand disease: test repertoire and options for activity and genetic analysis. *Haemophilia* 2014; 20(04): 65–70.
30. Favaloro EJ, Mohammed S. Evaluation of a von Willebrand factor three test panel and chemiluminescent-based assay system for identification of, and therapy monitoring in, von Willebrand disease. *Thromb Res* 2015; 17: 202–211.
30. Springer TA. Biology and physics of von Willebrand factor concatamers. *JTH* 2011; 9(1): 130–143.
30. Marcus Stockschlaedera, Reinhard Schneppenheimb and Ulrich Budde. Update on von Willebrand factor multimers: focus on highmolecular-weight multimers and their role in hemostasis. *Blood Coagul Fibrin* 2014; 25: 206–216.
31. Chandler WL, Peerscke EIB, Castellone DD, Meijer P. Von Willebrand factor assay proficiency testing. The North American specialized coagulation laboratory association experience. *Am J Clin. Pathol* 2011; 135:862–869.
32. Favaloro EJ. Interaction of factor VIII and von Willebrand factor and the identification of type 2N von Willebrand disease. *Thromb Res* 2011; 127: 2–3.
33. Veyradier A, Caron C, Ternisien C, Wolf M, Trossaert M, Fressinaud E et al. Validation of the first commercial ELISA for type 2N von Willebrand's disease diagnosis. *Haemophilia* 2011; 17 (6): 944–951.
- 34 Flood VH, Gill JC, Christopherson PA, Wren JS, Friedman KD, Haberichter SL et al. Comparison of Type I, Type III, and Type VI Collagen Binding Assays in Diagnosis of VWD. *J Thromb Haemost* 2012; 10(7): 1425–1432.
35. Meiring M, Badenhorst PN, Kelderman M. Performance and utility of a cost-effective collagen-binding assay for the laboratory diagnosis of Von Willebrand disease. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45(8): 1068–1072.

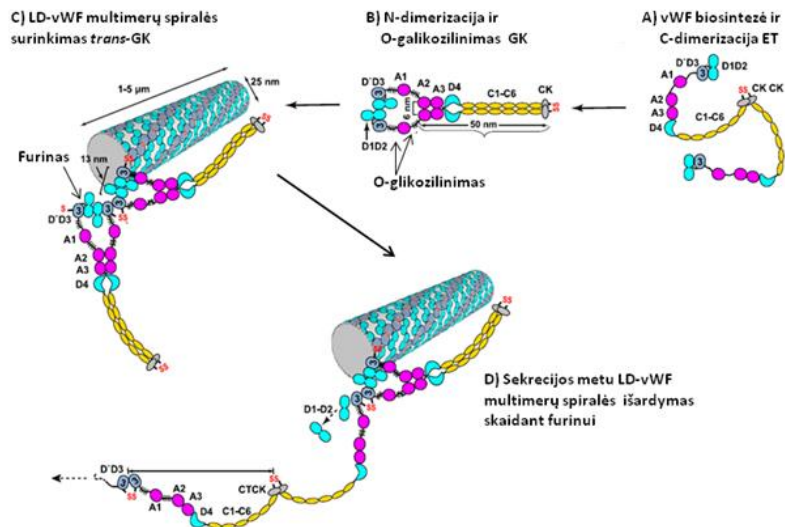
36. Favaloro EJ. von Willebrand Factor Collagen-Binding (Activity) Assay in the Diagnosis of von Willebrand Disease: A 15-Year Journey. *Diagnosis and Management of Congenital von Willebrand Disease*. *Semin Thromb and Hemost* 2012; 28(2): 191–202.
37. Frontroth JP, Hepner M, Sciuccati G, Feliu Torres A, Pieroni G, Bonduel M. Prospective study of low-dose ristocetin-induced platelet aggregation to identify type 2B von Willebrand disease (VWD) and platelet-type VWD in children. *Thromb Haemost* 2010; 104: 1158–1165.
38. van Ommen HC, Peters M. Clinical practice. The bleeding child. Part I: primary hemostatic disorders. *Eur J Pediatr* 2012, 171:1–10.
39. Favaloro EJ. Genetic testing for von Willebrand disease: the case against. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 6–12.
40. Marcus Stockschlaedera, Reinhard Schneppenheimb and Ulrich Budde. Update on von Willebrand factor multimers: focus on highmolecular-weight multimers and their role in hemostasis. *Blood Coagul Fibrin* 2014; 25: 206–216.
41. Callum G. Fraser. Biological Variation Data for setting Quality Specifications. Interneto prieiga: <https://www.westgard.com>.
42. M.P.M. de Maat et al. Literature Review: Biological Variation of Hemostasis Variables in Thrombosis and Bleeding: Consequences for Performance Specifications. *Clin. Chem.* 2016; 62: 1639 – 1646. Interneto prieiga: <http://www.ecat.nl/wp-content/uploads/2017/02/Issue-11-Literature-review-Final.pdf>
43. Popov J, Zhukov O, Ruden S, Zeshmann T, Sfferuzza A, Sahud M. Performance and Clinical Utility of a Commercial von Willebrand Factor Collagen Binding Assay for Laboratory Diagnosis of von Willebrand Disease. *Clin Chem* 2006; 52(10): 1965–1967.
44. Lawrie AS, Stufano F, Canciani MT, Mackie IJ, Machin SJ, Peyvandi F. A comparative evaluation of a new automated assay for von Wilebrand factor activity. *Haemophilia*, 19(2):338-42.
45. Lippi G, Plebani M, Favaloro EJ. Interference in Coagulation Testing: Focus on Spurious Hemolysis, Icterus, and Lipemia. *Seminars in Thrombosis & Hemostasis* 2013; 39(3): 258–266

PRIEDAI

1 priedas. A) vWF amino rūgščių sekos pokyčiai baltymo brendimo metu. B) vWF multimerų domenų organizacija. C) vWF monomerų organizacija multimero molekulėje.



2 priedas. vWF multimerų brendimas ir išskyrimas



3 priedas. Tyrimų rezultatai, kuriais remiantis atlikta 5.6. skirsnyje pateikta pacientų atvejų analizė ir interpretacija. (* kraujo ėmimo dieną).

Pacientas	LT1	LT2	LT3	LT4	LT5	LT6	LT7	LT8	LT10
Lytis (V-vyras; M-moteris)	M	V	V	M	V	M	M	V	M
Gimimo data	2010.0 5.07	2014.0 1.11	2010.0 8.30	2004.0 826	2007.1 0.17	2013.1 2.11	2001.1 1.04	2004.0 4.29	2003.0 2.10
Kraujo grupė	O Rh (D)+	-	B Rh (D)-	O Rh (D)+	B Rh (D)-	A Rh (D)+	-	-	O Rh (D)+
Amžius *	6	2	5	12	9	2	15	12	14
PLT (2–6 m. 211- 370 ·10 ⁹ PLT/l; 6- 12 m. 219-350 ·10 ⁹ PLT/l; 12-18 m. 180-307 ·10 ⁹ PLT/l)	198,7	519,6	211	368	545	-	201	-	190
PT (70-140%)	126	100	105	103	94	97	108	74	90
PT (21-29 s)	20,9	23,1	22,6	23,5	24,5	24,1	23	27,5	24,9
TNS (0,9-1,19)	0,91	1	0,98	0,99	1,03	1,01	0,97	1,14	1,04
ADTL (28-40 s)	48,7	58,6	39,1	42,8	39,9	37,7	42,0	49,5	41,9
Fibrinogenas (2-4 g/l)	2,72	4,34	2,3	3,11	3,63	2,52	5,9	3,1	2,88
vWF:Ag, (50-160 %)	25	88	67	59	89	62	127	14	63
vWF:Ac (O kr. gr. 46,3-145,6 %; A/B/AB kr. gr. 61,4-179,1%)	14,8	80,4	36,4	64,7	81,1	70,4	145,2	6,1	62,5
vWF:RCo (50–150%)	6	94	50	64	91	77	197	<9	59
vWF:CB (O kr. gr. 62-138%; A/B/AB kr. gr. 86-160 %)	5	97	37	68	116	75	179	12	55
VIII (60-150 %)	44	158	66	66	85	97	215	50	68
VIII/ vWF:Ag (0,6-1,5)	1,8	1,8	1,0	1,1	1,0	1,6	1,7	3,6	1,1
vWF:RCo/vWF:A g (0,6-1,5)	0,2	1,1	0,7	1,1	1,0	1,2	1,6	<0,6	0,9
vWF:Ac/vWF:Ag (0,6-1,5)	0,6	0,9	0,5	1,1	0,9	1,1	1,1	0,4	1,0

vWF:CB/vWF:Ag (0,6-1,5)	0,2	1,1	0,6	1,2	1,3	1,2	1,4	0,9	0,9
Agregacija su ADP (57-113 AU)	91	129	57	57	87	78	154	133	94
ASP (71-115 AU)	101	167	78	100	120	80	154	150	143
TRAP (84-125 AU)	121	151	86	92	124	91	197	152	142
RIPA-H (98-180 AU)	32	123	66	86	113	73	214	27	111
RIPA-L (13-69 AU)	14	19	17	8	12	22	34	17	11