

Uloga analizatora funkcije trombocita PFA-100 u dijagnostici von Willebrandove bolesti

Hajak, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:981196>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Jelena Hajak

ULOGA ANALIZATORA FUNKCIJE

TROMBOCITA PFA-100 U

DIJAGNOSTICI VON

WILLEBRANDOVE BOLESTI

Diplomski rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Jelena Hajak

ULOGA ANALIZATORA FUNKCIJE

TROMBOCITA PFA-100 U

DIJAGNOSTICI VON

WILLEBRANDOVE BOLESTI

Diplomski rad

Osijek, 2020.

Rad je ostvaren u: Poliklinici Zavoda za hematologiju, KBC Zagreb

Mentor rada: prof.dr.sc. Silva Zupančić Šalek

Rad ima 31 list, 4 tablice i 3 slike

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Von Willebrandova bolešt | 1 |
| 1.2. Von Willebrandov faktor | 1 |
| 1.3. Patofiziologija | 2 |
| 1.4. Klasifikacija bolesi | 3 |
| 1.5. Epidemiologija | 4 |
| 1.6. Etiologija | 4 |
| 1.7. Klinička manifestacija | 5 |
| 1.8. Dijagnoza | 6 |
| 1.9. Liječenje | 7 |
| 2. HIPOTEZA | 8 |
| 3. CILJEVI | 9 |
| 4. MATERIJAL I METODE | 10 |
| 4.1. Ispitanici | 10 |
| 4.2. Metode | 10 |
| 4.2.1. PFA-100 | 10 |
| 4.2.2. Agregacija trombocita s ristocetinom | 12 |
| 4.2.3. Aktivnost FVIII | 13 |
| 4.2.4. Koncentracija vWF (vWF:Ag) | 13 |
| 4.2.5. Aktivnost vWF (vWF:RiCo) | 13 |
| 4.3. Statističke metode | 14 |
| 5. REZULTATI | 15 |
| 6. RASPRAVA | 19 |
| 7. ZAKLJUČAK | 21 |
| 8. SAŽETAK | 22 |
| 9. SUMMARY | 23 |
| 10. LITERATURA | 24 |
| 11. ŽIVOTOPIS | 26 |

POPIS KRATICA

vWb – von Willebrandova bolest

vWF – von Willebrandov faktor

ES – endotelne stanice

GPIb – glikoprotein Ib

FVIII – faktor 8

APC – aktivirani protein C

AVWS – (engl. *acquired von Willebrand syndrome*) stečeni von Willebrandov sindrom

BS – (engl. *Bleeding Score*) rezultat krvarenja

Tr – trombociti

INR – (engl. *International Normalized Ratio*) međunarodni normalizirajući omjer

APTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

FVIII:C – aktivnost faktora 8

vWF:RiCo – ristocetinska aktivnost von Willebrandovog faktora

vWF:CB – test vezanja kolagena

vWF:Ag – koncentracija von Willebrandovog faktora

RIPA (engl. *ristocetin induced platelet agglutination*) ristocetinom inducirana aglutinacija trombocita

vWF:FVIIIb - (engl. *vWF:FVIII binding test*) test vezanja faktora 8

PFA – (engl. *platelet function assay*) test funkcije trombocit

1. UVOD

1.1. Von Willebrandova bolest

Von Willebrandova bolest (vWb) najčešći je nasljedni hemostatski poremećaj u ljudskoj populaciji, a smatra se da ga ima oko 1% ljudi. Klinički se očituje krvarenjem u kožu i sluznice, krvarenjem iz nosa, pojačanim krvarenjem već pri minimalnim zahvatima poput ekstrakcije zuba, menoragijom u žena i pojačanim krvarenjem u tijeku i/ili nakon porođaja (1). To je genetski poremećaj koji nastaje mutacijom u genu za von Willebrandov faktor (vWF) i većinom se prenosi autosomno dominantno (2). Uzrok poremećaja je kvantitativni ili kvalitativni manjak vWF koji sintetiziraju endotelne stanice (ES) i megakariociti, a u plazmi se nalazi kao najveći topivi protein u multimernoj formi različite veličine. Von Willebrandova bolest se dijeli na tri osnovna tipa. Kod tipova 1 i 3 postoji kvantitativni, a kod tipa 2 kvalitativni manjak vWF. Nadalje, tip 2 se dijeli na 4 podtipa – 2A, 2B, 2M i 2N (1). Bolest je prvi puta opisao doktor Erik von Willebrand iz Finske po kome je bolest i nazvana. Nije mogao utvrditi točan uzrok poremećaja, ali ga je mogao razlikovati od hemofilije i drugih poremećaja krvarenja (3).

1.2. Von Willebrandov faktor

Von Willebrandov faktor je veliki glikoprotein u multimernoj formi različite veličine, čija je glavna funkcija vezanje za različite proteine te sudjelovanje u koagulaciji krvi (3). VWF je uvijek prisutan u topljivom stanju u plazmi kao i u imobiliziranom stanju u subendotelnoj matrici (4). U biosintezi vWF veliki je broj kompleksnih stepenica koje se odvijaju u megakariocitima i endotelnim stanicama (2). VWF sintetiziran u endotelnim stanicama se ili konstitutivno izlučuje u plazmu ili se pohranjuje u Weibel-Palade tijelima. Oko 15% ukupnog vWF se proizvodi i pohranjuje u α -granulama trombocita i megakariocita, iako se smatra da se vrlo malo oslobađa u plazmi do aktivacije trombocita. Prema tome, vWF u plazmi je primarno izveden iz sinteze endotela (5).

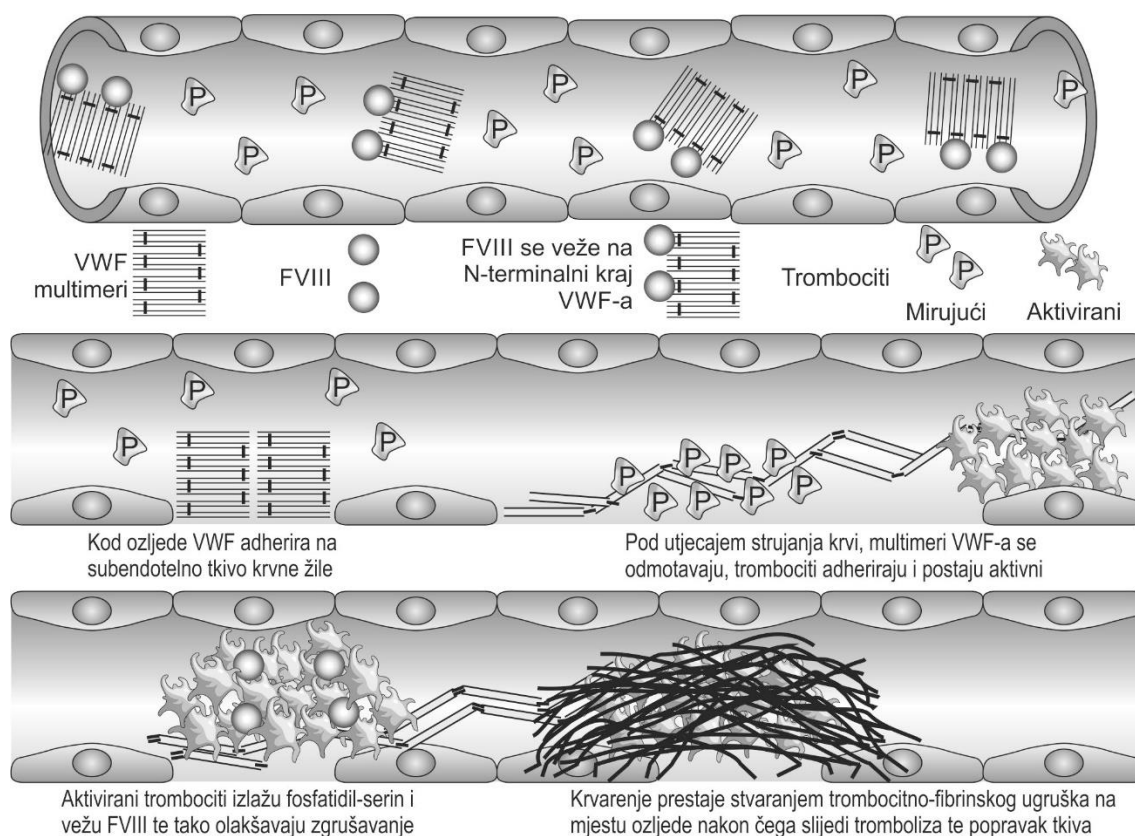
1.3. Patofiziologija

Sustav hemostaze ima ulogu održati krv u tekućem stanju u fiziološkom uvjetima, a pri ozljedi krvožilja brзом reakcijom stvoriti ugrušak i time spriječiti gubitak krvi. To je složen proces međusobno povezanih biokemijskih reakcija u kojem sudjeluju endotel krvnih žila, trombociti, faktori zgrušavanja, čimbenici fibrinolize i njihovi inhibitori. Savršena regulacija hemostaze podrazumijeva ravnotežno stanje bez krvarenja i ugruška (6). Funkcija cjelokupnog hemostatskog sustava ima tri faze – primarnu i sekundarnu hemostazu te fibrinolizu. Primarna hemostaza proces je nastanka trombocitnog ugruška na mjestu gdje je ozljeđena krvna žila. Sekundarna hemostaza obuhvaća aktivaciju komponenata plazmatske faze zgrušavanja (faktori zgrušavanja) i stvaranje stabilnog trombocitno-fibrinskog ugruška, a fibrinolitički sustav razgrađuje fibrinski ugrušak koje je ispunio svoju zadaću i ograničava stvaranje ugruška na mjestu ozljede (1).

Osnovna je funkcija vWF sudjelovanje u primarnoj hemostazi, pri čemu posreduje u adheziji trombocita preko trombocitnog glikoproteina GPIb na oštećeni endotel krvne žile. U sekundarnoj hemostazi ima posrednu zadaću kao nosač faktora zgrušavanja VIII (FVIII) u cirkulaciji, čime sprječava njegovu preranu proteolitičku razgradnju aktiviranim proteinom C (APC), zato je vWb primarno poremećaj primarne hemostaze, iako je u teškim oblicima bolesti znatno oštećena i sekundarna hemostaza zbog smanjene aktivnosti FVIII (1). Prema tome, defekti vWF mogu uzrokovati krvarenje zbog narušavanja adhezije trombocita ili smanjenjem koncentracije FVIII (7).

U plazmi, kompleks FVIII – VWF cirkulira kao labavo namotan proteinski kompleks koji ne djeluje snažno s trombocitima ili endotelnim stanicama u bazalnim uvjetima. Kada dođe do vaskularne ozljede, VWF se veže za izloženi subendotel (kolagen, itd.). Visoka brzina strujanja krvi u mikrocirkulaciji inducira konformacijsku promjenu u multimernom vWF, što uzrokuje adheziju trombocita, aktiviranje i zatim agregiranje tako da predstavlja površinu aktivirane fosfolipidne pločice. To olakšava zgrušavanje koje je djelomično regulirano FVIII. Kombinacija zgrušavanja i agregacije trombocita i adhezije tvori trombocitno-fibrinski čep, što rezultira prestankom krvarenja. Stupanj zgrušavanja pažljivo je reguliran prirodnim antikoagulansima. Nakon toga, tromboliza pokreće popravak tkiva, a na kraju se žila može re-endotelirati i održavati protok krvi (7).

Za odvijanje procesa koagulacije svaki faktor mora biti aktivan i u definiranoj količini. Nedostatak ili abnormalnost vWF dovodi to poremećaja u sustavu koagulacije, što dovodi do spontanijih krvarenja i/ili pretjeranog krvarenja kod trauma i operacija.



Slika 1. Von Willebrandov faktor (VWF) i normalna hemostaza (modificirano prema (7)).

1.4. Klasifikacija bolesti

Kao što je već napisano u potpoglavlju 1.1., von Willebrandova bolest se dijeli na tri osnovna tipa. Tip 1 i 3 su kvantitativni, a tip 2 je kvalitativni manjak vWF te se dijeli na 4 podtipa – 2A, 2B, 2M i 2N. Tip 1 vWb obilježava djelomični kvantitativni manjak vWF (smanjena sinteza funkcionalno normalne molekule), a tip 3 je najteži klinički oblik bolesti zbog praktički potpunog kvantitativnog manjka vWF. Podtip 2A obilježava nedostatak multimera srednje i velike molekularne mase, a u podtipu 2B pojačan je afinitet vezanja vWF na trombocitni GPIb, pa može nastati i umjerena trombocitopenija zbog pojačanog uklanjanja trombocita. U podtipu

2M smanjena je adhezija trombocita zbog disfunkcionalne molekule vWF uz normalne koncentracije vWF, FVIII i strukturu multimera. U podtipu 2N adhezija trombocita je normalna, ali je smanjen afinitet vWF za FVIII te je značajno smanjena i aktivnost FVIII, pa se ovaj podtip može zamijeniti s hemofilijom A. Dijagnostički pravilna klasifikacija tipa, odnosno podtipa vWb, važna je jer određuje težinu kliničke slike, ali i terapijski pristup (1).

Iznimno se može pojaviti i stečeni oblik von Willebrandove bolesti kao posljedica drugih medicinskih poremećaja (7).

1.5. Epidemiologija

Prevalencija vWb je oko 1%. Češće se može otkriti kod žena na temelju pojačanog krvarenja tijekom mjesečnica. Bolest može biti ozbiljna u osoba s krvnom grupom „0“. Tip 1 vWb je najčešći, a uključuje 60%-80% slučajeva pojave bolesti. Na tip 2 bolesti otpada 20-30%, dok je tip 3 najrjeđi s manje od 5% svih slučajeva. Stečeni oblik bolesti se najčešće javlja kod osoba starijih od 40 godina bez prethodne povijesti krvarenja (3).

1.6. Etiologija

Gen koji kodira vWF smješten je na vrhu kratkog kraka kromosoma 12, a njegovom mutacijom nastaje von Willebrandova bolest. Svaki monomer von Willebrandova faktora sadrži 2050 aminokiselina sa specifičnim domenama koje nose različite funkcije (3). Do danas su utvrđeni različiti genski defekti, pa se tako razlikuju pojedini tipovi vWb. Primjerice u tipu 1 i 3 vWb nalazimo velike delecije, insercije i točkaste mutacije dok tip 2A karakteriziraju supstitucije aminokiselina, a u tipu 2B nalaze se različite aminokiselinske insercije ili supstitucije (2).

vWb većinom se prenosi autosomno dominantno (2). Roditelj koji nosi gen može i ne mora biti simptomatičan. Tip 1 i tip 2 nasljeđuju se ako se gen prenosi na potomstvo od bilo kojeg roditelja. Kod tipa 2 bolesti iznimka je podtip 2N koji se nasljeđuje autosomno-recesivno kao i tip 3 koji se javlja samo ako su bolesnici dvostruko nasljedili recesivni gen, tj., ako je gen nasljeđen od oba roditelja (1, 3).

Stečeni von Willebrandov sindrom (AVWS, engl. *acquired von Willebrand syndrome*) odnosi se na nedostatke u koncentraciji vWF, strukturi ili funkciji koji nisu izravno nasljeđeni, ali su

posljedice drugih medicinskih poremećaja, primjerice limfoproliferativne bolesti, monoklonalne gamopatije, sistemskog eritemskog lupusa i nekih karcinoma (7).

1.7. Klinička manifestacija

Kao rezultat nedostatka ili abnormalnosti von Willebrandovog faktora, razine faktora VIII mogu biti varijabilno smanjene. Ovisno o stupnju von Willebrandovog faktora i redukciji faktora VIII varira i ozbiljnost kliničkih manifestacija pa tako različiti tipovi von Willebrandovih bolesti imaju različite stupnjeve sklonosti krvarenju. Nadalje, djeca s vWb mogu imati simptome koji se razlikuju od simptoma roditelja koji nose gen. Kliničke manifestacije uglavnom su predstavljene krvarenjem u sluznice i meka tkiva, a mnogo češće bolest je primjećena kod žena zbog menoragija koje su zabilježene u više od 70% žena s vWb, dok pola bolesnica pati od dismenoreje (3, 8).

Klinička ekspresija vWb obično je blaga u tipu 1, s progresivnim povećanjem težine u tipu 2 i 3. Tipično vWb tipa 1 pokazuje blago mukokutano krvarenje. Najčešći simptomi uključuju modrice i epistaksiju, dok žene imaju teška menstrualna krvarenja u reproduktivnoj dobi. Osobe tipa 2A vWb obično pokazuju blaga do umjerena mukokutana krvarenja. Gastrointestinalno krvarenje može biti posebno učestalo u tipu 2A i teško se može kontrolirati. U podtipu 2B također su prisutna blaga do umjerena mukokutana krvarenja uz prisutnu trombocitopeniju koja se može povećati uslijed stresa (infekcija, operacija, trudnoće). Tip 2M iznimno može imati ozbiljnija mukokutana krvarenja ukoliko je niska aktivnost vWF. U tipu 2N simptomi su slični blagom obliku hemofilije A s pretjeranim krvarenjem tijekom operacija. Najteži oblik bolesti je tip 3 u kojem pojedinci imaju ozbiljna unutarnja krvarenja i krvarenja u zglobove. U osoba sa stečenom vWb prisutna su blaga do umjerena krvarenja (3, 8).

Krvarenje nakon ekstrakcije zuba je najčešća manifestacija poslijeoperacijskog krvarenja, dok se krvarenje nakon operacije može pojaviti u ozbiljnije pogođenih bolesnika tipa 1 i 3 te je potrebna profilaktička terapija. Krvarenje nakon poroda rijetko se primjećuje u tipu 1 jer se razine FVIII / vWF mogu ispraviti na kraju trudnoće u blagim slučajevima tipa 1, dok tipovi 2A, 2B i 3 obično zahtijevaju zamjensku terapiju nakon porođaja kako bi se spriječilo trenutno ili odgođeno krvarenje (8).

1.8. Dijagnoza

Dijagnoza vWb, a osobito tipa 1, može biti otežana zbog kliničke heterogenosti i poteškoća u standardiziranju dijagnostičkih testova. Na razine vWF također značajno utječu fiziološke (dob, vježbanje i trudnoća) ili patološke varijable (upale i rak). Nadalje, krvna grupa igra glavnu ulogu u razinama vWF u plazmi, pa tako pojedinci krvne grupe „0“ imaju 25% -35% niže razine vWF nego pojedinci ostalih krvnih grupa (9).

Nužan uvjet za pokretanje laboratorijske procjene je povijest simptoma mukokutanog krvarenja. Povijest krvarenja može biti sugestivna za vWb kada su prijavljena najmanje tri različita hemoragijska simptoma ili ako je rezultat krvarenja veći od 3 kod muškaraca ili veći od 5 u žena. Rezultat krvarenja (engl. *bleeding score* - BS) je sumacijski indeks koji obuhvaća i broj i težinu krvarenja koja se generira zbrajanjem težine svih prijavljenih simptoma krvarenja i ocjenjuju se prema proizvoljnoj skali (9).

Ako su anamneza i BS pozitivni rade se probirne koagulacijske pretrage koje pokazuju uredan broj Tr, uredan INR, produženo vrijeme krvarenja i, ponekad, blago produženo APTV (10).

U većini tipova vWb produženo je vrijeme krvarenja, ali nedovoljna osjetljivost i standardiziranost ograničava kliničku korisnost ove pretrage. APTV je produžen u tipovima praćenima smanjenom aktivnošću FVIII. Budući da nijedna zasebno učinjena laboratorijska pretraga ne otkriva sve tipove i podtipove vWb, laboratorijska dijagnostika temelji se na kombinaciji više koagulacijskih pretraga, uključujući određivanje koagulacijske aktivnosti FVIII (FVIII:C), testove funkcionalne aktivnosti; vWF aktivnost i vWF ristocetinska aktivnost (vWF:RiCo), test vezanja kolagena (vWF:CB) i određivanje koncentracije vWF (vWF:Ag). Te pretrage obavljene u kombinaciji otkrivaju većinu slučajeva vWb, a dodatne se pretrage, kao što su ristocetinom inducirana aglutinacija trombocita (RIPA, engl. *ristocetin induced platelet agglutination* - vWF:RIPA), analiza multimera vWF (elektroforetska metoda) i test vezanja vWF:FVIII (engl. *vWF:FVIII binding test*) mogu koristiti za daljnju klasifikaciju podtipova vWb (1).

Ako su rezultati pretraga FVIII:C, vWF:Ag, vWF:RiCo i vWF:CB uredni, vWb se s velikom sigurnošću može isključiti (1) dok se konačna dijagnoza postavlja na temelju anamnestičkih i obiteljskih podataka, zatim na temelju kliničke slike i laboratorijskih nalaza (2).

1.9. Liječenje

Terapija se primjenjuje samo pri aktivnom krvarenju ili pred invazivni postupak (npr. ekstrakcija zuba, kirurški zahvat). Nadoknađuje se vWF infuzijom pasteriziranog koncentrata FVIII intermedijarne čistoće, koji sadrži sastojke vWF (10).

Dezmopresin je analog vazopresina koji potiče oslobađanje vWF u plazmu i podiže razine FVIII. Koristan je u tipu 1 vWb, dok u drugima ne pomaže ili čak može štetiti. Radi procjene adekvatnosti odgovora bolesniku se daje pokusna doza i nakon toga mjeri razina vWF antigena. Infuzijom 0,3 µg/kg u 50 ml fiziološke otopine kroz 15–30 min, dezmopresin omogućava manje zahvate (npr. vađenje zuba, mala kirurgija) bez nadoknadne terapije (10).

2. HIPOTEZA

Osnovna hipoteza ovog istraživanja je da analizator funkcije trombocita PFA-100 omogućava probir na poremećaje primarne hemostaze te uz ostale koagulacijske pretrage dovodi do konačne dijagnoze von Willebrandove bolesti.

3. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Usporediti rezultate ADP/C i EPI/C dobivene analizatorom funkcije trombocita PFA-100
2. Usporediti rezultate dobivene analizatorom funkcije trombocita PFA-100 s rezultatima testova potrebnih za konačnu dijagnozu von Willebrandove bolesti, a to su: agregacija trombocita s ristocetinom, koncentracija vWF antigena i aktivnost vWF te razina faktora VIII u plazmi

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 20 bolesnika oba spola s von Willebrandovom bolesti i pozitivnom hemoragijskom dijatezom, te patološkim nalazima koagulacijskih pretraga koje čine dijagnozu bolesti. Ispitanici su obrađivani u Poliklinici Zavoda za hematologiju, KBC-a Zagreb. Uključeni su bolesnici u razdoblju od travnja 2017. do travnja 2018. Uzorak za istraživanje je puna krv bolesnika.

4.2. Metode

Za konačnu dijagnozu von Willebrandove bolesti provodi se više pretraga. Predmet ovog istraživanja je ispitivanje funkcije trombocita pomoću PFA-100 analizatora (engl. *platelet function assay*, PFA). Za usporedbu rezultata učinjene su i druge pretrage: agregacija trombocita s ristocetinom, aktivnost FVIII, koncentracije vWF (vWF:Ag) te aktivnost vWF (vW:RiCo).

4.2.1. PFA-100

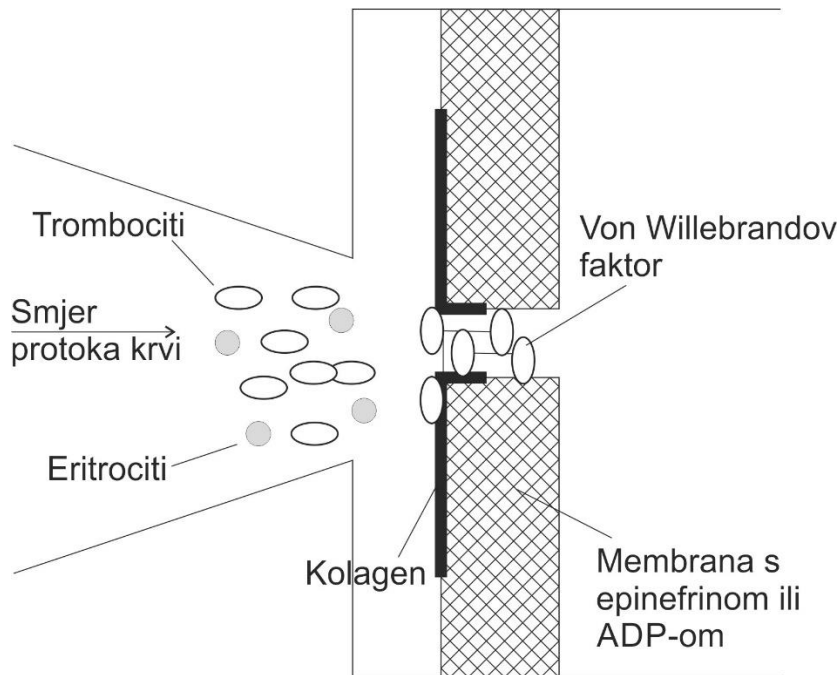
PFA-100 analizator omogućava brzu procjenu funkcije trombocita na malim uzorcima pune krvi uz natrijev citrat, a radi na principu in-vitro simulacije procesa adhezije i agregacije trombocita do kojih dolazi uslijed vaskularne ozljede. Za analizu u PFA-100 analizatoru potrebne su dvije različite testne kazete; Col/EPI i Col/ADP. Col/EPI sadrži membranu prekrivenu s 2 µg konjskog kolagena tipa I i 10 µg epinefrin bitartrata dok Col/ADP sadrži membranu prekrivenu s 2 µg konjskog kolagena tipa I te 50 µg adenzin-5'-difosfata (ADP). Svi reagensi; kolagen, ADP i epinefrin, imaju važnu ulogu u in-vivo procesima primarne hemostaze. Oštećene krvne žile izlažu kolagena vlakna, koja posreduje u vezanju von Willebrandovog faktora te trombociti prijanjaju na vWF što predstavlja prvu fazu primarne hemostaze. Dok vaskularne lezije otpuštaju velike količine ADP-a u krvotok, sistemske reakcije povećavaju razinu epinefrina. Te supstance, uključujući i kolagen, mogu aktivirati trombocite interakcijom sa specifičnim receptorima čime pojačavaju procese primarne hemostaze (11).

Osim biokemijski aktivnih membrana svaki testni uložak sadrži i druge integrirane dijelove poput spremnika za uzorak i kapilaru. Uzorak, tj. citratna puna krv se aspirira iz spremnika za uzorak kroz kapilaru te središnji otvor na membrani što simulira uvjete protoka kroz žilu. Tijekom PFA testa trombociti adheriraju na kolagenom prekrivenu membranu što potiče njihovu aktivaciju, a uslijed kontakta s ADP-om ili epinefrinom dolazi do otpuštanja sadržaja iz trombocitnih granula. Oslobađanje sadržaja granula je praćeno prianjanjem trombocita jedan prema drugome da se formiraju agregati. Kao mjera trombocitne funkcije u PFA testu uzima se upravo proces agregacije trombocita u kojem se stvara tromb na otvoru membrane i postupno ga smanjuje dok u konačnici u potpunosti ne zaustavi protok krvi. PFA sustav detektira vrijeme od početka testa do trenutka kada tromb začepi otvor na membrani te taj vremenski interval zabilježava kao vrijeme zatvaranja (engl. *closure time*, CT). CT je u konačnici indikator funkcije trombocita u analiziranom uzorku pune krvi.

Formiranje tromba u PFA sustavu je pod utjecajem sniženog broja trombocita, njihove smanjene aktivnosti, snižene razine vWF u plazmi ili smanjenog hematokrita (11).



Slika 2. Testna kazeta Col/Epi.



Slika 3. Princip rada analizatora funkcije trombocita PFA-100 (modificirano prema (13)).

4.2.2. Agregacija trombocita s ristocetinom

Agregacija trombocita važan je test za ispitivanje funkcije trombocita kao i jedan od testova u dijagnostici von Willebrandove bolesti. Analitička metoda koja se koristi je svjetlosna ili optička agregometrija. Njezin princip temelji se na mjerenju porasta prolaza svjetlosnog snopa kroz suspenziju posebno pripremljene plazme bogate trombocitima, do čega dolazi nakon dodatka specifičnog agonista agregacije koji uzrokuje stvaranje trombocitnih grudica (14). U ovome slučaju agonist je ristocetin - antibiotik koji potiče vezanje vWF na trombocite te prepoznaje njegove visokomolekularne forme (1).

Jedan od nedostataka ove metode je složena priprema uzorka kojom se izdvajaju normalni elementi krvi poput eritrocita, neutrofila i monocita čime se izuzima njihov prirodni učinak na agregaciju trombocita u ispitivanom uzorku (14).

4.2.3. Aktivnost FVIII

Određivanje aktivnosti faktora zgrušavanja VIII provodi se modificiranom metodom mjerenja APTV-a odnosno fotometrijskim mjerenjem. Određivanje aktivnosti se temelji na svojstvu da plazma bolesnika korigira APTV plazme koja je deficitarna za FVIII, odnosno ima aktivnost manju od 1 %. Uzorak plazme bolesnika se razrjeđuje puferom u omjeru 1:9 te se miješa sa plazmom deficitarnom za FVIII. Vrijeme APTV potrebno za nastanak ugruška tada ovisi samo o aktivnosti FVIII u uzorku jer deficitarna plazma sadrži sve ostale faktore zgrušavanja u suvišku. Promjenom apsorbancije odnosno transmitancije određuje se APTV. Iz prethodno izrađene kalibracijske krivulje, koja predstavlja odnos vremena zgrušavanja u sekundama (s) i aktivnosti FVIII u razrijeđenjima standardne plazme očitava se aktivnost FVIII (%) u uzorku (15).

4.2.4. Koncentracija vWF (vWF:Ag)

Von Willebrandov faktor antigen test određuje kvantitativnu vrijednost vWF iz plazme metodom imunoturbidimetrije. Male čestice polistirena na koje su vezana specifična antitijela kovalentnom vezom agregiraju pri miješanju s uzorcima koji sadrže von Willebrandov antigen. Agregacija se tada detektira turbidimetrijski prema povećanju zamućenosti, koja je proporcionalna razini antigena prisutnih u analiziranom uzorku. Koncentracija vWF u plazmi može biti povećana u starijoj dobi, u menopauzi, nakon fizičkih aktivnosti poput tjelevoježbe ili u stresu (16).

4.2.5. Aktivnost vWF (vWF:RiCo)

Aktivnost vWF, odnosno ristocetinska aktivnost (vWF:RiCo) ispituje sposobnost vWF u plazmi da veže trombocite u prisutnosti ristocetina. Budući da je test vWF:RiCo pokazatelj aktivnosti vWF, aktivnost će biti niža u plazmi bolesnika pojedinih tipova bolesti koje karakterizira nedostatak visokomolekularnih formi vWF ili multimeri srednje i velike molekularne mase ili kod funkcionalno defektnog vWF (1).

Analitička tehnika koja se koristi je svjetlosna ili optička agregometrija ranije opisana. Vrijednost vWF:RiCo ovisi o krvnoj grupi, a povišenu vrijednost možemo zabilježiti u trudnoći i akutnoj fazi (12).

4.3. Statističke metode

Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim frekvencijama i omjerima. Numerički podaci opisani aritmetičkom sredinom, standardnom devijacijom, medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Rezultati su prezentirani tablično. Za usporedbu kategorijskih podataka između nezavisnih skupina korišten je Hi-kvadrat test. Za usporedbu kategorijskih podataka između zavisnih skupina korišten je McNemarov test. Povezanost dviju numeričkih varijabli testirana je Spearmanovim testom korelacije. Razina značajnosti je postavljena na $\text{Alpha} = 0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc Statistical Software version 18.11.6 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2018).

5. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na 20 ispitanika ukupnog raspona od 21 do 85 godina što nam daje prosječnu starosnu dob od 43 godine (aritmetička sredina) uz standardnu devijaciju od 18 godina. Muških ispitanika je bilo 6 u usporedbi sa 14 ispitanica (Hi-kvadrat test, $P = 0,20$).

Tablica 1. Deskriptivne vrijednosti mjerenih parametara

| Mjerena varijabla | Aritmetička sredina (SD) | Medijan (interkvartilni raspon) | Ukupni raspon |
|--------------------------|---------------------------------|--|----------------------|
| ADP/C (s) | 174,6 (72,0) | 145,5 (118,4 - 229,0) | od 77 do 312 |
| EPI/C (s) | 216,0 (67,5) | 224,0 (167,5 - 266,0) | od 83 do 307 |

Prosječne vrijednosti funkcije trombocita dobivene analizatorom PFA-100 za ADP/C i EPI/C te njihova odstupanja i rasponi prikazani su tablično (Tablica 1).

Rezultati analize povezanosti vrijednosti funkcije trombocita za ADP/C i EPI/C pokazali su vrlo visoku i statistički značajnu korelaciju između ove dvije varijable (Spearmanov test korelacije, $Rho = 0,84$ [95% CI: 0,63 do 0,94]; $P < 0,001$).

Rezultati se približno podudaraju i sa apsolutnim razlikama u aritmetičkim sredinama pojedinih mjerenja (Tablica 1).

Tablica 2. Usporedba rezultata ADP/C i EPI/C dobivenih analizatorom PFA-100

| | | Broj ispitanika | | | P* |
|-------|--------|-----------------|-------|--------|------|
| | | ADP/C | | | |
| | | <120 | >=120 | Ukupno | |
| EPI/C | <180 | 4/5 | 3/15 | 7/20 | 0,63 |
| | >=180 | 1/5 | 12/15 | 13/20 | |
| | Ukupno | 5 | 15 | 20 | |

*McNemar test

Usporedbom broja pozitivnih dijagnoza dobivenih analizatorom PFA-100 za ADP/C i EPI/C nije dobivena statistički značajna razlika. U postocima razlika iznosi 10 %, uz 95%CI od 9,1 % do 29,1 % (Tablica 2).

Tablica 3. Usporedba rezultata ADP/C dobivenih analizatorom PFA-100 s rezultatima pojedinih dijagnostičkih testova

| | | Broj ispitanika | | | P* |
|--------------------------------------|---------------|-----------------|-------|--------|------------------|
| | | ADP/C | | Ukupno | |
| | | <120 | >=120 | | |
| Agregacija trombocita s ristocetinom | >60 | 5/5 | 13/15 | 18/20 | <0,001 |
| | <=60 | 0 | 2/15 | 2/20 | |
| Aktivnost FVIII | 50-150 | 4/5 | 13/15 | 17/20 | 0,002 |
| | <=50 | 1/5 | 2/15 | 3/20 | |
| vWF:Ag | 50-160 | 4/5 | 6/15 | 10/20 | 0,13 |
| | <=50 | 1/5 | 9/15 | 10/20 | |
| vWF:RiCo | 50-150 | 3/5 | 3/15 | 6/20 | >0,99 |
| | <=50 | 2/5 | 12/15 | 14/20 | |
| | Ukupno | 5 | 15 | 20 | |

*McNemar test

Usporedba rezultata ADP/C dobivenih analizatorom PFA-100 s rezultatima testova potrebnih za konačnu dijagnozu pokazala je značajnu razliku u usporedbi s testom Agregacije trombocita s ristocetinom (McNemar test, $P < 0,001$) te s testom Aktivnosti FVIII (McNemar test, $P = 0,002$). Usporedba s ostala dva testa nije pokazala značajnu razliku, a rezultat usporedbe ADP/C s testom Aktivnosti vWF (vWF:RiCo) pokazuje veliku sličnost, odnosno usklađenost (Tablica 3).

Tablica 4. Usporedba rezultata EPI/C dobivenih analizatorom PFA-100 s rezultatima pojedinih dijagnostičkih testova

| | | Broj ispitanika | | | P* |
|--------------------------------------|--------|-----------------|-------|--------|--------------|
| | | EPI/C | | Ukupno | |
| | | <180 | >=180 | | |
| Agregacija trombocita s ristocetinom | >60 | 7/7 | 11/13 | 18/20 | 0,001 |
| | <=60 | 0 | 2/13 | 2/20 | |
| Aktivnost FVIII | 50-150 | 5/7 | 12/13 | 17/20 | 0,01 |
| | <=50 | 2/7 | 1/13 | 3/20 | |
| vWF:Ag | 50-160 | 6/7 | 4/13 | 10/20 | 0,38 |
| | <=50 | 1/7 | 9/13 | 10/20 | |
| vWF:RiCo | 50-150 | 3/7 | 3/13 | 6/20 | >0,99 |
| | <=50 | 4/7 | 10/13 | 14/20 | |
| Ukupno | | 7 | 13 | 20 | |

*McNemar test

Usporedba rezultata EPI/C dobivenih analizatorom PFA-100 s rezultatima testova potrebnih za konačnu dijagnozu pokazala je također značajnu razliku u usporedbi s testom Agregacije trombocita s ristocetinom (McNemar test, $P = 0,001$) te s testom Aktivnosti FVIII (McNemar test, $P = 0,01$). Usporedba sa ostala dva testa također nije pokazala značajnu razliku, a rezultat usporedbe EPI/C s testom Aktivnosti vWF također pokazuje veliku sličnost, odnosno usklađenost (Tablica 4).

6. RASPRAVA

Istraživanje je provedeno na 20 ispitanika s pozitivnom hemoragijskom dijatezom te patološkim nalazima koagulacijskih pretraga koje čine dijagnozu von Willebrandove bolesti.

Od svih ispitanika, muških je bilo 6 u usporedbi s 14 ispitanica. Ta razlika može se pripisati epidemiološkim podacima koji pokazuju da se bolest češće otkriva kod žena na temelju pojačanog krvarenja tijekom mjesečnica.

Analizatorom funkcije trombocita PFA-100 provedena su dva različita testa; funkcija trombocita uz adenzin-difosfat i kolagen odnosno ADP/C te funkcija trombocita uz epinefrin i kolagen odnosno EPI/C. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da oba mjerenja pokazuju slične rezultate bez statistički značajne razlike, štoviše, pokazuju visoku i statistički značajnu korelaciju. Također se može primjetiti da je veći broj ispitanika prepoznat kao pozitivan što može upućivati na von Willebrandovu bolest. Međutim, rezultati PFA-100 analizatora su pod utjecajem više faktora. Na njih može utjecati sniženi broj trombocita, njihova smanjena aktivnost, snižena razina vWF u plazmi ili smanjeni hematokrit što znači da mjerenja samo sa PFA-100 nisu dovoljna za dijagnozu von Willebrandove bolesti te su potrebna daljna testiranja. Favaloro je u svome istraživanju došao do sličnih rezultata te dokazao da PFA-100 analizator ima vrlo visoku negativnu prediktivnu vrijednost što ga čini pogodnim za isključenje sumnje na vWb, ali zbog velike osjetljivosti na niz faktora ima nisku pozitivnu prediktivnu vrijednost pa nije dovoljan za dijagnozu bolesti (17).

Za detaljniju analizu, rezultati dobiveni PFA-100 analizatorom uspoređeni su s rezultatima dobivenim testovima agregacije trombocita s ristocetinom, mjerenjem aktivnosti faktora zgrušavanja VIII, koncentracije vWF (vWF:Ag) te mjerenjem aktivnosti vWF (vW:RiCo). Oba testa, i ADP/C i EPI/C pokazuju sličnu podudarnost s ostalim mjerenjima.

Oba testa pokazala su veliku statističku razliku u usporedbi sa testom agregacije s ristocetinom. S obzirom da testovi PFA-100 analizatora određuju funkciju trombocita mjereći adheziju i agregaciju trombocita očekivano bi bilo da se rezultati u većoj mjeri podudaraju s rezultatima testa agregacije s ristocetinom koji mjeri agregaciju trombocita uz agonist ristocetin. Osim samog principa na kojem se temelje ove različite analitičke tehnike, razlika je i u analiziranom uzorku. Za PFA-100 analizator to je puna krv, dok se za agregaciju s ristocetinom koristi

plazma. Nadalje, u PFA sistemu koristi se više reagensa ključnih za hemostazu što uz uzorak pune krvi omogućava simulaciju hemostaze kakva je u fiziološkim uvjetima. Iz navedenog moglo bi se pretpostaviti da PFA-100 anaizator ima veću osjetljivost za poremećaje primarne hemostaze no za takve zaključke potrebna su detaljnija ispitivanja. Konkretno iz ovog slučaja vidljivo je da je većem broju ispitanika izmjerena patološka vrijednost funkcije trombocita uz PFA-100 analizator nego što je izmjereno testom agregacije uz ristocetin.

Usporedbom s ostalim mjerenjima podudarnosti su različite. Rezultati ADP/C i EPI/C pokazuju značajnu razliku u usporedbi s mjerenjem aktivnosti faktora zgrušavanja VIII, dok u usporedbi s koncentracijom vWF te aktivnošću vWF nema značajne razlike. Štoviše, sa rezultatima mjerenja aktivnosti vWF postoji velika podudarnost. Ta pojedina mjerenja zasebno, daju uvid u mogući razlog patološkog rezultata PFA-100 te u kombinaciji mogu dovesti do zaključka radi li se o von Willebrandovoj bolesti te o kojem tipu bolesti. Nepodudarnost rezultata PFA-100 i samo jedne dodatne pretrage ne mogu niti potvrditi niti isključiti postojanje von Willebrandove bolesti. Zbog postojanja različitih tipova vWb sa različitom zastupljenošću u populaciji, svakom slučaju je potrebno pristupiti individualno te učiniti više pretraga prije konačne dijagnoze. Iz istog razloga u ovom istraživanju, sa malim brojem ispitanika, podudarnost između rezultata je šarolika.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti slijedeći zaključci:

- Ispitivanjem funkcije trombocita analizatorom PFA-100 potvrđeno je da postoji visoka korelacija između rezultata dobivenih s ADP/C i EPI/C, a kombinacijom tih dvaju ispitivanja omogućen je probir bolesnika sa sumnjom na von Willebrandovu bolest.
- Pozitivan rezultat dobiven ispitivanjem funkcije trombocita analizatorom PFA-100 nije dovoljan za konačnu dijagnozu von Willebrandove bolesti budući da na funkciju trombocita utječe više parametra.
- Zbog postojanja različitih tipova von Willebrandove bolesti, prije konačne dijagnoze potrebno je učiniti spektar pretraga koje će nam potvrditi ili opovrgnuti rezultate dobivene PFA-100 analizatorom te u kombinaciji omogućiti donošenje konačne dijagnoze von Willebrandove bolesti s uvidom o kojem tipu bolesti se radi.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: ispitati podudarnost rezultata dobivenih analizatorom funkcije trombocita PFA-100 međusobno te s rezultatima testova potrebnih za konačnu dijagnozu von Willebrandove bolesti.

Nacrt studije: Istraživanje slučaja

Ispitanici i metode: ispitivanje je provedeno na 20 ispitanika oba spola s pozitivnom hemoragijskom dijatezom te patološkim nalazima koagulacijskih pretraga koje čine dijagnozu von Willebrandove bolesti. Iz pune krvi bolesnika ispitana je funkcija trombocita analizatorom PFA-100 dok je iz plazme ispitana agregacija trombocita s ristocetinom, aktivnost FVIII, koncentracija vWF i aktivnost vWF.

Rezultati: pronađena je visoka korelacija rezultata ADP/C i EPI/C dobivenih analizatorom PFA-100. Rezultati oba mjerenja analizatorom PFA-100 pokazali su značajnu razliku s rezultatima agregacije trombocita s ristocetinom te aktivnosti FVIII, dok s rezultatima koncentracije vWF i aktivnosti vWF nema statistički značajne razlike. Štoviše, s rezultatima aktivnosti vWF pokazali su veliku podudarnost.

Zaključak: analizatorom funkcije trombocita PFA-100 omogućen je probir na von Willebrandovu bolest dok je za konačnu dijagnozu bolesti potrebno provesti više dodatnih pretraga.

Ključne riječi: von Willebrandova bolesti, analizator funkcije trombocita PFA-100, FVIII, vWF.

9. SUMMARY

The role of the PFA-100 platelet function analyzer in diagnosis of von Willebrand disease

Objectives: to examine interconnection of results measured by the PFA-100 among each other, and with the results of tests needed for final von Willebrand disease diagnose.

Study design: Case study

Participants and methods: The study was done on 20 patients, both male and female, with presence of the haemorrhagic diathesis and pathological results of the coagulation tests which are needed for von Willebrand disease diagnose. Sample for platelet function was blood while agregation of platelets with ristocetin, FVIII activity, concentracion and activity of vWF used plasma for it's determination.

Results: ADP/C and EPI/C results, measured with PFA-100 shows significant corelation. Both tests show significant difference from results of agregation with ristocetin and FVIII activity. When compared with concentracion and activity of vWF statistical significance is not present. Moreover, there is high congruence with the results of activity of vWF.

Conclusion: with PFA-100 analyzer screening on von Wilebrand disease is possible, but for confirmation, few more specific coagulation tests needs to be done.

Key words: von Wilebrand disease, PFA-100 analyzer, FVIII, vWF

10. LITERATURA

1. Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M, Erceg D, Burek V i sur. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
2. Labar B, Hauptmann E, Črepinko I, Malenica D, Radman I, Nazor A i sur. Hematologija. Zagreb: Školska knjiga; 1998.
3. Bharati KP, Prashanth UR, Von Willebrand Disease: An Overview, *Indian J Pharm Sci.* 2011; 73(1): 7-16.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3224412/>
4. Gale AJ, Current Understanding of Hemostasis, *Toxicol Pathol.* 2011; 39(1): 273-280.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3126677/>, pristupljeno: 13.04.2019.
5. Kanaji S, Fahs SA, Shi Q, Haberichter SL, Montgomery RR, Contribution of platelet versus endothelial VWF to platelet adhesion and hemostasis, *J Thromb Haemost.* 2012; 10(8): 1646-1652.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3419786/>
6. Zupančić-Šalek S, Stančić V Hemostaza. U: Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B *Interna medicina, Medicinska biblioteka* 2008; 918-919.
7. Nichols WL, Hultin MB, James AH, Manco-Johnson MJ, Montgomery RR, Ortel TL i sur. Von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA), *Haemophilia.* 2008; 14(2): 171-232.
8. Castman G, Goodeve A, Eikenboom J, Principles of care for the diagnosis and treatment of von Willebrand disease, *Haematologica.* 2013; 98(5): 667-674.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3640108/>
9. Castman G, Linari S, Diagnosis and Treatment of von Willebrand Disease and Rare Bleeding Disorders, *J Clin Med.* 2017; 6(4): 45.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5406777/>
10. Hrvatski liječnički zbor. MSD priručnik dijagnostike i terapije. Dostupno na adresi:<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/hematologija-i->

onkologija/trombocitopenija-i-trombocitopatije/von-willebrandova-bolest, pristupljeno 27.04.2019.

11. Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH. Dade® PFA Collagen/EPI Test Cartridge and Dade® PFACollagen/ADP Test Cartridge - Training Manual.
12. KBC Zagreb, Interna skripta, Abecedni popis pretraga koje se provode u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku
13. Kapapa T, Röhrer S, Struve S, Petscher M, König R, Wirtz CR i sur. Desmopressin Acetate in Intracranial Haemorrhage, *Neurol Res Int.* 2014; 2014: 298767.
14. Miličić D, Skorić B, Aspirinska rezistencija, *Liječ Vjesn* 2011; 133:337-342
15. Zdravstveno veleučilište u Zagrebu. Interna skripta za studente medicinsko laboratorijske dijagnostike, 3 god. Transfuzijska medicina. Mjerenje aktivnosti FVIII – koagulacijska metoda
16. Siemens Diagnostics. BCS® XP System – Training Manual. Verzija 2.0.
17. Favalaro EJ, Utility of the platelet function analyser (PFA-100/200) for exclusion or detection of von Willebrand disease: A study 22 years in the making, *Thromb Res.* 2020; 188:17-24

11. ŽIVOTOPIS

Jelena Hajak

Datum i mjesto rođenja: 16.07.1994., Zagreb, Republika Hrvatska

Adresa: Topolovec 4, 10340 Vrbovec

E-adresa: hajakjelena@gmail.com

Obrazovanje:

2016. – 2020. Medicinski fakultet u Osijeku- diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

2013. – 2016. Zdravstveno veleučilište Zagreb – preddiplomski stručni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

2009. – 2013. Srednja škola Vrbovec – opća gimnazija