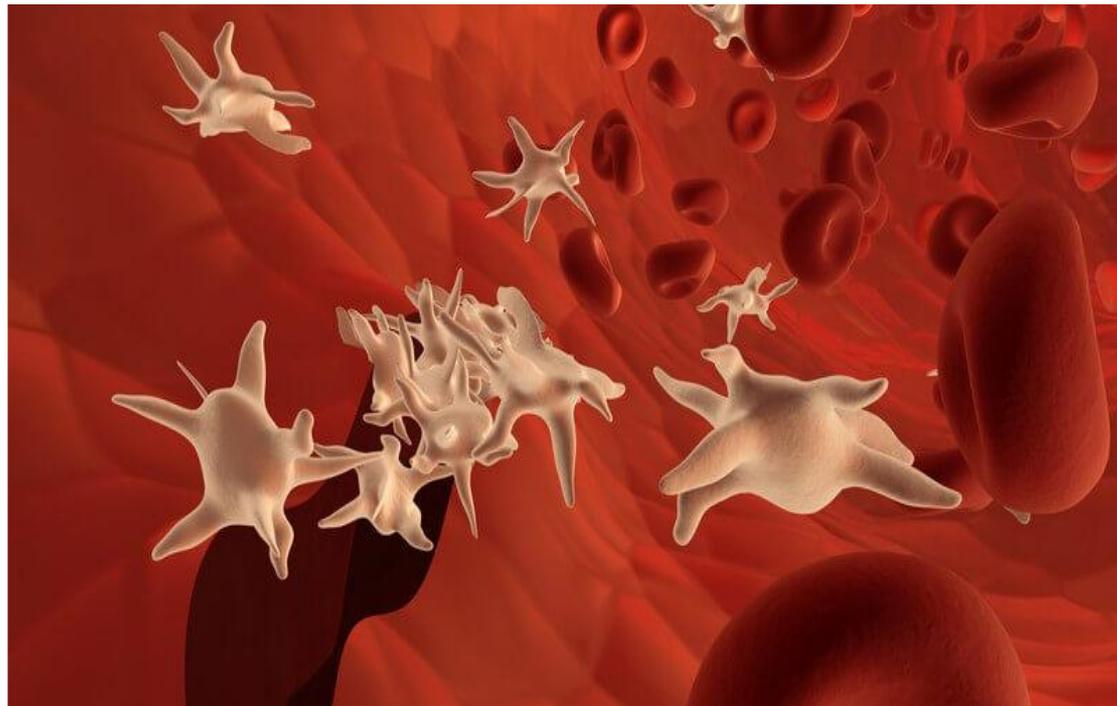




Эрик Адольф фон
Виллебранд



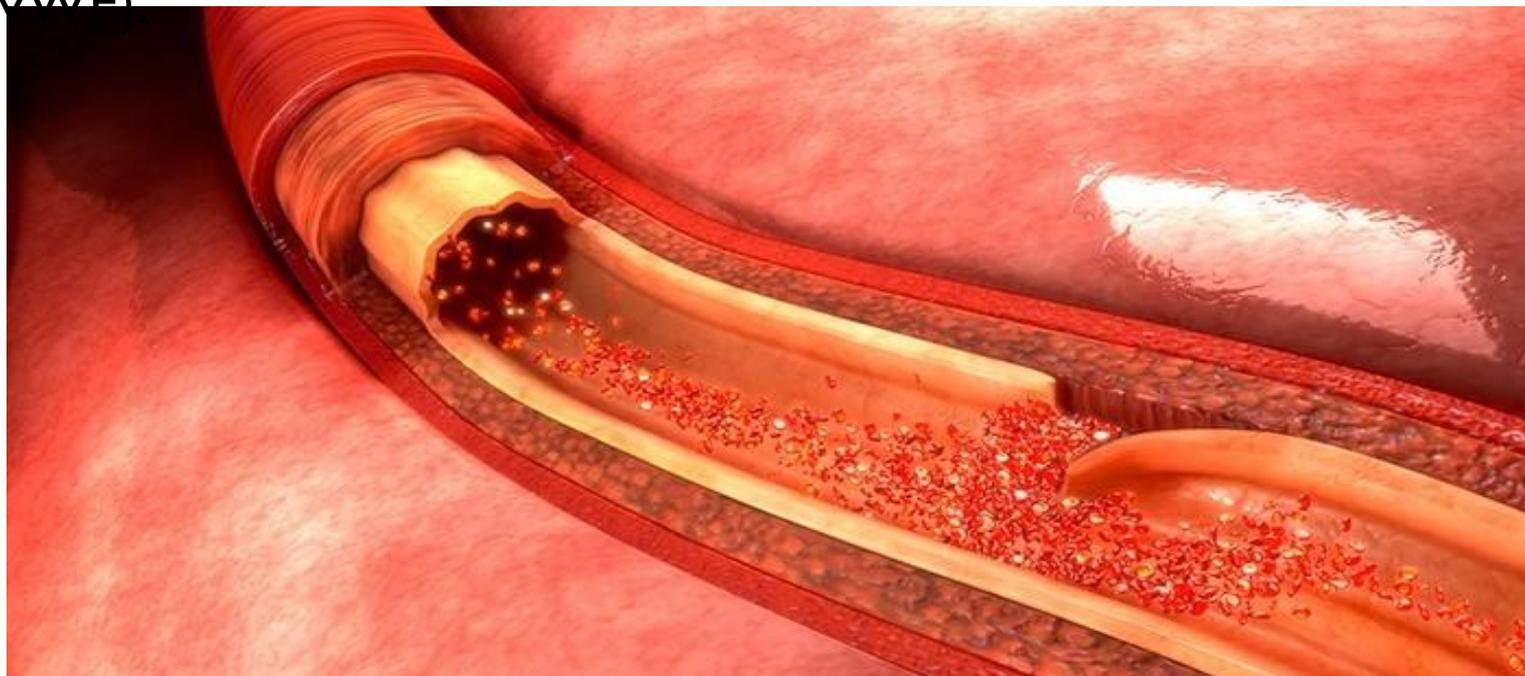
ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНИ ВИЛЛЕБРАНДА

Выполнила Кочкина Е., ординатор КЛД

Болезнь Виллебранда

- наследственная коагулопатия с аутосомно-рецессивным или аутосомно-доминантным типом наследования, обусловленная снижением количества или нарушением функции фактора Виллебранда

(vWF)



Фактор Виллебранда

- Синтезируется в эндотелиальных клетках и мегакариocyтах,
- Особая роль фактора Виллебранда в гемостазе определяется его структурой, представляющей собой серию различных по размеру мультимеров, состоящих из многократно повторяющихся субъединиц, в которых имеются домены связывания с гликопротеиновыми рецепторами тромбоцитов, коллагеном, гепарином, VIII фактором свертывания крови.
- В строении фактора Виллебранда разделяют легкие, средние, тяжелые и сверхтяжелые мультимеры.
- Наиболее активными в отношении взаимодействия с тромбоцитами и коллагеном являются крупные мультимеры фактора Виллебранда
- После секреции в плазму, мультимеры фактора Виллебранда подвергаются расщеплению ферментом метеллопротеиназой ADAMTS 13.

Классификация

Тип заболевания	Частота, %	Характеристика
Тип 1	70	Частичный дефицит vWF; уровень FVIII нормальный или сниженный пропорционально степени снижения vWF
Тип 2	25	Качественные дефекты vWF
2A		Снижение количества высокомолекулярных мультимеров vWF вследствие повышенной чувствительности к протеазе ADAMTS13
2B		Повышение аффинности vWF к рецепторам GPIb тромбоцитов, избыточное связывание vWF с тромбоцитами
2M		Снижение ристоцетин-кофакторной активности vWF при нормальном содержании антигена vWF; нормальная мультимерная структура vWF
2N		Снижение аффинности к FVIII
Тип 3	5	Практически полное отсутствие vWF с низкой активностью FVIII

Клиническая картина

- Основное проявление – геморрагический синдром микроциркуляторного/смешанного типов спонтанного или посттравматического характера.

- При болезни Виллебранда 1 и 2 типов преобладает микроциркуляторный тип кровотечения.



ЭКХИМОЗ

При типичной болезни Виллебранда, характеризующихся выраженным снижением уровня FVIII, часто наблюдается микроциркуляторно-гематомный тип геморрагического синдрома.

Лабораторная диагностика

Для уточнения диагноза рекомендуется проведение поэтапного лабораторного коагулологического исследования.

Первым этапом лабораторной диагностики рекомендуется проведение коагулологического скрининга, включающего следующие показатели:

- общий анализ крови с подсчетом количества тромбоцитов;
- исследование агрегации тромбоцитов с основными индукторами - ристоцетином, коллагеном, АДФ, тромбином, адреналином;
- определение АЧТВ, ПТИ, ТВ и фибриногена.

Скрининговые исследования

Исследование	Тип болезни Виллебранда					
	1	2A	2B	2M	2N	3
Количество тромбоцитов	N	N	↓ / N	N	N	N
Время свертывания	↑ / N	↑	↑	↑	N	↑
АЧТВ	↑ / N	↑ / N	↑ / N	↑ / N	↑ / N	↑ / N

- Количество тромбоцитов: данный показатель остается в норме при большинстве форм болезни Виллебранда; тромбоцитопения различной степени выраженности может наблюдаться у некоторых пациентов при типе 2B болезни Виллебранда.
- АЧТВ увеличивается в отдельных случаях, степень удлинения зависит от степени дефицита фактора VIII и от чувствительности реагента к дефициту фактора VIII.

Для верификации диагноза БВ рекомендуется проведение второго этапа диагностики - специфических коагулологических исследований:

- соотношение $vWF:RCo/vWF:Ag$ (обязательно);
- FVIII:C (обязательно),
- уровень RIPA в двух концентрациях ристомицина (для уточнения типа БВ);
- анализ мультимеров vWF (в неясных случаях).

Ристоцетин-кофакторная активность vWF:RCo

Исследование	Тип болезни Виллебранда					
	1	2A	2B	2M	2N	3
vWF:RCo	↓	<20%	↓	↓	N/↓	<5%

- Фиксированные формальдегидом контрольные тромбоциты инкубируются с ристоцетином. Без участия фактора Виллебранда тромбоциты не могут агрегировать.
- В такой тест-системе выраженность агглютинации прямо зависит от наличия фактора Виллебранда.
- При снижении количества этого протеина или его качественных изменениях агглютинация либо слабо выражена, либо вовсе отсутствует.

Ристоцетин-кофакторная активность vWF:RCo

Исследование	Тип болезни Виллебранда					
	1	2A	2B	2M	2N	3
vWF:RCo	↓	<20%	↓	↓	N/↓	<5%

- Ожидаемые значения для активности ристоцетин-кофактора для взрослого населения лежат в диапазоне 58÷166% (0.58÷1.66 ед/мл).
- Если результат теста у пациента дал значение менее 58% агрегации, то для выяснения типа болезни Виллебранда плазма больного анализируется с добавлением трех концентраций ристоцетина: 1.2 мг/мл , 0.9мг/мл, 0.6мг/мл

Определение антигена фактора Виллебранда

Исследование	Тип болезни Виллебранда					
	1	2A	2B	2M	2N	3
vWF:Ag	↓	↓/N	↓/N	↓/N	N/↓	<5%

- Количественная оценка уровня антигена фактора Виллебранда в плазме производится с использованием теста vWF:Ag. При этом используется метод ИФА или автоматизированный латексный иммуноанализ.
- Этот тест является очень надежным и хорошо воспроизводимым, однако имеет ограничения поскольку показывает только уровень vWF без оценки его функции. Необходимо учитывать группу крови пациента (концентрация vWF:Ag меньше в группе крови O)

Соотношение

$$vWF:RCo / vWF:Ag$$

Исследование	Тип болезни Виллебранда					
	1	2A	2B	2M	2N	3
Отношение $vWF:RCo / vWF:Ag$	> 0,7	< 0,7	< 0,7	N / ↓	> 0,7	Вариабельно

- Определение количества антигена vWF позволяет дифференцировать количественный дефицит, при котором $vWF:Ag$ уменьшается, от качественных нарушений, при которых его уровень не снижается, а отношение $vWF:RCo / vWF:Ag$ составляет в норме >0,7
- Оценка соотношения определит необходимость дополнительных исследований для дифференцировки типов 2A, 2B или 2M в случае если полученный коэффициент <0,7

Агрегация ТЦ, вызванная ристоцетином (RIPA)

Исследование	Тип болезни Виллебранда					
	1	2A	2B	2M	2N	3
RIPA	↓ / N	↓ / N	↑ при низкой концентрации	↓ / N	N	Отсутствует

- Определение агрегации тромбоцитов с ристоцетином в плазме применяют для количественной оценки фактора фон Виллебранда.
- Установлена линейная зависимость между степенью ристоцетиновой агрегации и количеством фактора Виллебранда.
- В основе метода лежит способность ристоцетина стимулировать *in vitro* взаимодействие фактора Виллебранда с тромбоцитарным гликопротеином Ib. В большинстве случаев болезни Виллебранда отмечается нарушение ристоцетин-агрегации при нормальном ответе на

Агрегация ТЦ, вызванная ристоцетином (RIPA)

Исследование	Тип болезни Виллебранда					
	1	2A	2B	2M	2N	3
RIPA	↓ / N	↓ / N	↑ при низкой концентрации	↓ / N	N	Отсутствует

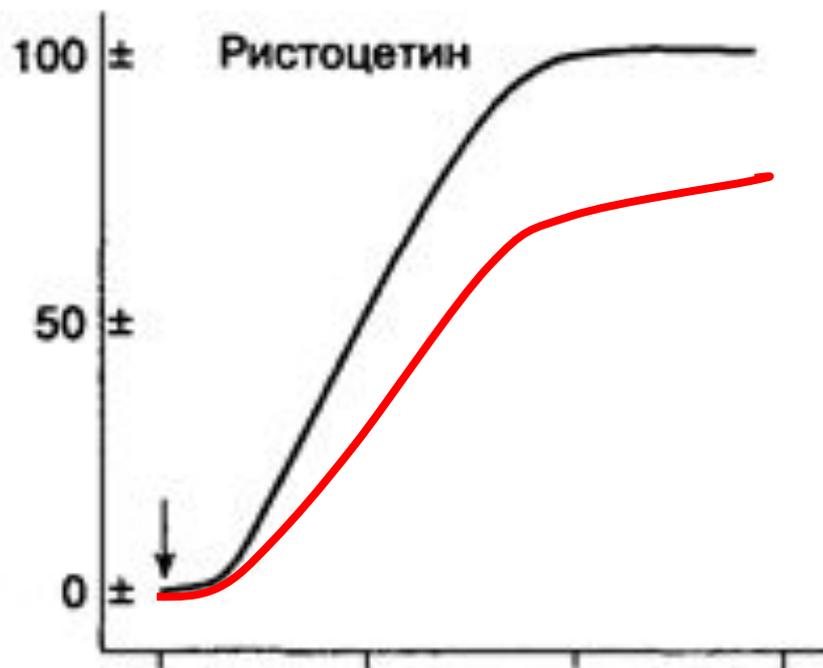


График зависимости оптической плотности (ось Y) от времени (ось X).

- кривая черного цвета – агрегатограмма здорового человека;
- кривая красного цвета – агрегатограмма соответствующая плазме, с низкой концентрацией фактора Виллебранда.

Активность фактора VIII

Исследование	Тип болезни Виллебранда					
	1	2A	2B	2M	2N	3
FVIII:C	↓/N	↓/N	↓/N	↓/N	↓	< 10%

- Одностадийный клоттинговый метод.
- При добавлении к разведенной исследуемой плазме субстратной дефицитной плазмы происходит коррекция всех факторов свертывания кроме фактора VIII. Поэтому время свертывания в тесте АЧТВ смеси разведенной исследуемой и субстратной дефицитной по фактору VIII плазм зависит только от активности фактора VIII в исследуемой плазме. Активность фактора VIII определяют по калибровочному графику разведений плазмы-калибратора с установленной активностью фактора VIII.
- В норме активность фактора колеблется от 50 до 150%

Мультимерный анализ

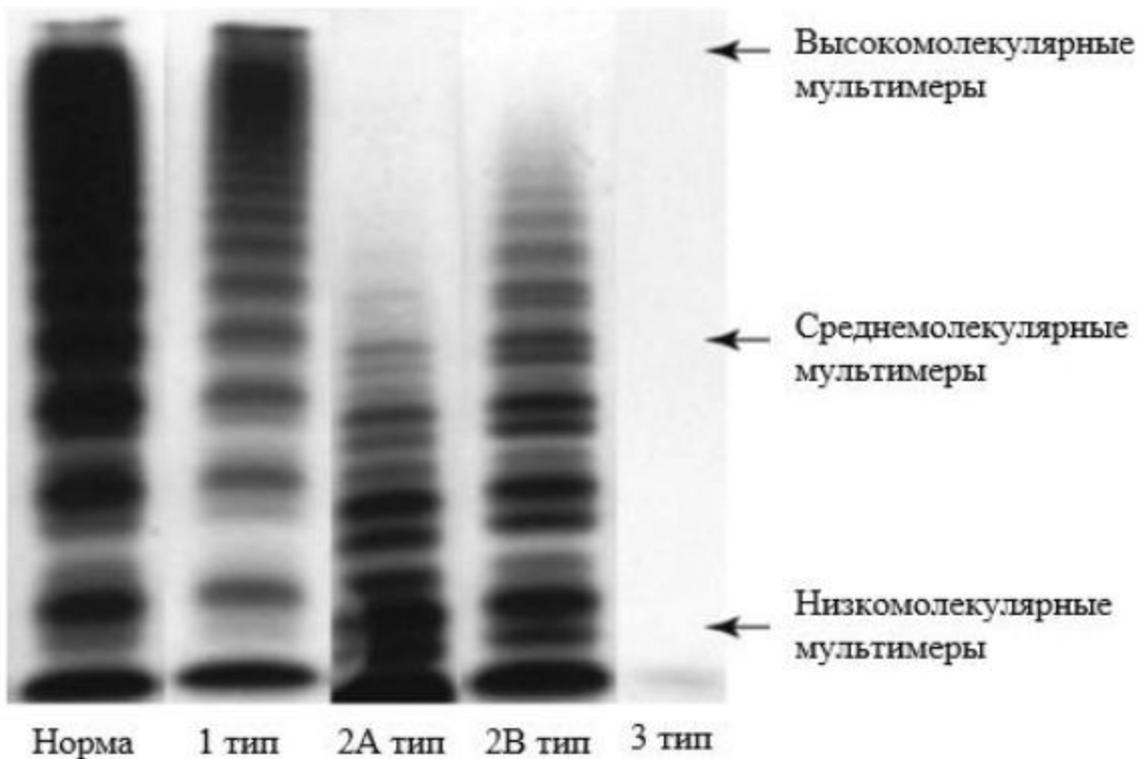
Исследование	Тип болезни Виллебранда					
	1	2A	2B	2M	2N	3
Мультимеры vWF	N / ↓	Abs высокомолекулярных мультимеров	Abs высокомолекулярных мультимеров	N	N	Отсутствует

- Виллебранда представляет собой серию различных по размеру мультимеров, состоящих из многократно повторяющихся субъединиц.
- Мультимерный анализ это исследование распределения фактора Виллебранда по размерам молекул путём электрофореза в агарозном геле.

Мультимерный анализ

- Принцип мультимерного анализа – электрофоретическое разделение мультимеров ФВ на агаровом геле, основанное на их молекулярном

весе. Используется для определения и подтверждения типа болезни Виллебранда.



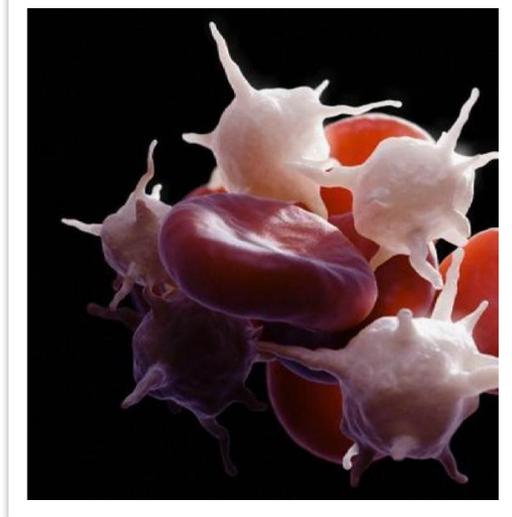
Коллагенсвязывающая активность vWF:CB

Исследование	Тип болезни Виллебранда					
	1	2A	2B	2M	2N	3
vWF:CB	↓/N	↓↓	↓	↓/N	N/↓	<5%

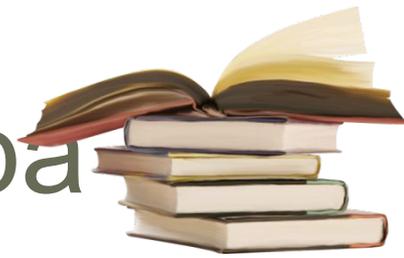
- Количественное определение коллаген-I связывающей активности фактора Виллебранда в образцах человеческой цитратной плазмы методом иммуноферментного анализа.
- Связывание коллагена играет важную роль при исследовании ФВ. Этот тест служит для определения высокомолекулярных мультимеров. Кроме того, некоторые варианты болезни Виллебранда имеют специфический коллагенсвязывающий дефект и классифицируются как тип 2M.
- Исследование способности фактора Виллебранда связываться с коллагеном помогает обнаружить нарушения в мультимерной структуре vWF.
- Референсные значения – 60 – 130 %

Дополнительные методы

- Способность ФВ связываться с тромбоцитами. Связывание тромбоцитов используется для подтверждения 2го типа болезни Виллебранда. В этом анализе используются коммерческие тромбоциты и плазма пациента. Отмечается увеличение связывания при типе 2В.
- Способность ФВ связываться с VIII фактором. Данный тест анализирует способность выделенного фактора Виллебранда из плазмы пациента связывать рекомбинантный фактор VIII. Используется для подтверждения 2N типа.
- Секвенирование гена ФВ.



Используемая литература



- Клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Виллебранда рекомендации утверждены на iv конгрессе гематологов россии (апрель 2018);
- Болезнь фон Виллебранда. Принципы лабораторной диагностики. Мельник А.А., к.б.н.;
- Sweli.ru
(<http://www.sweli.ru/zdorove/meditsina/gematologiya/antigen-faktora-vilibranda-metod-opredeleniya.html>);
- Инструкция по применению Набора реагентов для определения активности VIII фактора свертывания крови (Фактор VIII – тест). Ренам НПО;
- Биохиммак. Коллаген I -связывающая активность фактора Виллебранда;
- Гемостатика
(<http://hemostatica.ru/hemostasis/tests-clinical-applications/vwd/diagnosti>