Doprinos određivanja svih sljednih varijanti u genima za von Willebrandov faktor i za faktor zgrušavanja VIII u dijagnostici von Willebrandove bolesti i razlikovanju od blage hemofilije A

Lapić, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:839175

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ivana Lapić

DOPRINOS ODREĐIVANJA SVIH SLJEDNIH VARIJANTI U GENIMA ZA VON WILLEBRANDOV FAKTOR I ZA FAKTOR ZGRUŠAVANJA VIII U DIJAGNOSTICI VON WILLEBRANDOVE BOLESTI I RAZLIKOVANJU OD BLAGE HEMOFILIJE A

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ivana Lapić

DOPRINOS ODREĐIVANJA SVIH SLJEDNIH VARIJANTI U GENIMA ZA VON WILLEBRANDOV FAKTOR I ZA FAKTOR ZGRUŠAVANJA VIII U DIJAGNOSTICI VON WILLEBRANDOVE BOLESTI I RAZLIKOVANJU OD BLAGE HEMOFILIJE A

DOKTORSKI RAD

Mentori:
Prof. dr. sc. Renata Zadro
Prof. dr. sc. Dunja Rogić

Zagreb, 2022.

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ivana Lapić

CONTRIBUTION OF COMPLETE SEQUENCE ANALYSIS OF VON WILLEBRAND FACTOR AND COAGULATION FACTOR VIII GENES IN THE DIAGNOSIS OF VON WILLEBRAND DISEASE AND DISTINCTION FROM MILD HAEMOPHILIA A

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:
Professor Renata Zadro, PhD
Professor Dunja Rogić, PhD

Zagreb, 2022

Doktorski rad predan je na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Doktorski rad izrađen je pod mentorstvom prof. dr. sc. Renate Zadro i prof. dr. sc. Dunje Rogić u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb u suradnji sa Zavodom za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti te Zavodom za pedijatrijsku hematologiju, onkologiju i transplantaciju krvotvornih matičnih stanica Klinike za pedijatriju Kliničkoga bolničkog centra Zagreb, a u sklopu Poslijediplomskog doktorskog studija ,,Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALE

Ovaj doktorat je za mene puno više od istraživanja o von Willebrandovoj bolesti. To je priča osobnog i znanstvenog sazrijevanja, upornosti, stalnog pomicanja granica i otkrivanja čari plivanja uzvodno. Priča o usponima i padovima, o odlascima i povratcima, o izazovima i neizvjesnostima. Ali najviše od svega, priča je to o suradnji, podršci i prijateljstvima.

Najveću zahvalnost dugujem prof.dr.sc. Dunji Rogić koja je uz mene od samih mojih početaka i koja me izgradila u ono što sam ja danas. Hvala za odnos koji nadilazi ulogu mentora, za potpuno povjerenje, podršku i razumijevanje, preusmjeravanje na pravi put kada je to bilo potrebno, ali i slobodu da se izrazim i radim na svoj način.

Veliko hvala prof.dr.sc. Renati Zadro na osmišljavanju istraživanja, motivaciji, susretljivosti, svoj pomoći i stručnim savjetima tijekom izrade i pisanja ovog doktorskog rada.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Ani Boban, prof.dr.sc. Ernestu Biliću i Sari Dejanović Bekić, dr.med. na iznimnoj suradnji i susretljivosti prilikom uključivanja ispitanika u istraživanje, te upoznavanju s kliničkom stranom dijagnostike.

Hvala Margareti Radić Antolic, spec.med.biokem. i lab.medicine, što me uputila u svijet molekularne dijagnostike te bez ikakvih interesa i bezrezervno pomagala u izradi praktičnog dijela doktorata. Hvala i cijelom njezinom timu, vrijednim i veselim djelatnicama Laboratorija za molekularnu hematologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, koje su uvijek bile spremne pomoći.

Zahvaljujem doc. dr.sc. Désirée Coen Herak na stručnim savjetima i djelatnicama Laboratorija za koagulaciju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku za pomoć pri izvođenju koagulacijskih analiza i spremanju uzoraka.

Koliko je ovaj proces bio zahtjevan najbolje zna Vladimira, koja je samnom proživljavala svaku nedoumicu i izazov, bila nevjerojatna podrška i dijelila jednaku znanstvenu i stručnu znatiželju. Hvala što si uvijek bila tu, hvala za kilometre ispisanih poruka i mailova, ali i sve prijeđene kilometre na trkačkim stazama.

Hvala Andrijani što je uvijek znala naći pravu riječ, veselila se svakom mom uspjehu i vjerovala u mene i kad ja nisam. Hvala što si moja oaza zdravog razuma, podrške i ženske mudrosti kad je svijet kaotičan, nelogičan i naopak.
Hvala Dragani koja je bila suradnik za poželjeti i kojoj sam, s potpunim povjerenjem, mogla prepustiti posao u rutini kako bih pobjegla odrađivati doktorat.
Ivi i Maji hvala jer su moje Supergirls koje u ovih 8 godina prijateljstva nikad nisu bile stranci, uvijek iznova unose veselje u moj život i moja su bezuvjetna podrška. Hvala za sve zajedničke događaje koji su uvijek posebni, a do ovog ne bi došla bez vas.

Hvala mami Biserki i tati Steliu, jer su mi dopustili da izaberem svoj put i sve omogućili, pa i više od toga.
Bratu Danielu hvala jer je moj veliki navijač, njemu sam doktorica već odavno.

SAŽETAK

Višestruka uloga von Willebrandova faktora (VWF) u hemostazi, složenost njegove strukture i veliki broj mutacija u različitim dijelovima gena za VWF čine von Willebrandovu bolest (VWB) klinički izrazito heterogenim poremećajem, a njegovu pravilnu dijagnostiku i razlikovanje od blage hemofilije A otežanima.

Cilj ovog istraživanja bio je primijeniti cjeloviti pristup dijagnostici VWB-a u Republici Hrvatskoj koji uključuje globalne i visokodiferentne koagulacijske pretrage kojima su ispitana funkcionalna i strukturna svojstva VWF-a te molekularnu analizu svih sljednih varijanti u genima za VWF i faktor zgrušavanja VIII (FVIII) sekvenciranjem sljedeće generacije (NGS) i dodatnim pretraživanjem velikih delecija i duplikacija metodom višestrukog umnažanja vezanih sondi.

Istraživanje je obuhvatilo 83 ispitanika, a mutacije u genu za VWF nađene su kod njih 48. Na temelju rezultata koagulacijskih pretraga i genetičke analize, 19 ispitanika klasificirano je kao tip 1 VWB-a, šest kao tip 3, dok je među 23 ispitanika s tipom 2 VWB-a 15 imalo tip 2A, sedam tip 2B, a tip 2N potvrđen je u jednom slučaju. Heterozigotni genotip utvrđen je kod 38 ispitanika, sedam su bili složeni heterozigoti i tri homozigoti. Ukupno je utvrđeno 36 različitih mutacija u genu za VWF, od kojih su 13 novootkrivene. Mutacije u genu za FVIII nađene su kod petero ispitanika, pri čemu je u dva muška homozigota postavljena dijagnoza blage hemofilije A, dok su tri ženske ispitanice heterozigoti i smatraju se nositeljicama hemofilije A. Kod jedne je ispitanice uz mutaciju u genu za FVIII nađena i mutacija u genu za VWF. Dvije su mutacije u genu za FVIII novootkrivene. Kod 30 (36 %) ispitanika nisu nađene mutacije u genima za VWF i FVIII, pri čemu je devet ispitanika zbog aktivnosti VWF-a ispod 50 % svrstano u kategoriju tzv. ,,niskog VWF-a“.

Ovo istraživanje upozorilo je na znatnu heterogenost genetičke osnove VWB-a u hrvatskoj populaciji, a istodobno sekvenciranje gena za VWF i FVIII tehnologijom NGS omogućilo je jednoznačno postavljanje dijagnoze VWB-a te diferencijalno dijagnostičko razlučivanje od blage hemofilije A. Time je osigurana osnova za pravilno liječenje i skrb za bolesnike te su razjašnjeni molekulsko-patofizološki mehanizmi koji su u podlozi poremećaja krvarenja kod obrađenih bolesnika.

Ključne riječi: von Willebrandova bolest, blaga hemofilija A, koagulacijske pretrage, molekularna dijagnostika, sekvenciranje sljedeće generacije

EXTENDED SUMMARY

Background: Von Willebrand disease (VWD) is the most common inherited bleeding disorder caused by quantitative deficiency and/or qualitative defects of von Willebrand factor (VWF). VWF is a large plasma glycoprotein that has two essential roles in haemostasis: platelet adhesion and aggregation at the site of vascular injury by mediating interaction between platelet receptor glycoprotein Ib (GPIb) and collagen in the subendothelium, and as a carrier and stabilizer of coagulation factor VIII (FVIII) in circulation. Multiple VWF functions in haemostasis are regulated by different regions within the encoding gene which is located on chromosome 12 and comprises 52 exons. To date, more than 700 unique mutations have been discovered throughout the whole VWF gene, affecting either VWF assembly, secretion, proteolysis, clearance, and/or binding affinity to GPIb, collagen, and FVIII. Any impairment of VWF function results in bleeding phenotypes whose severity depends on the causative pathophysiological mechanism and the remaining levels of functional VWF. VWD is classified into three main categories: type 1 characterized by partial quantitative deficiency, type 2 that encompasses qualitative defects and is subdivided into four subgroups (2A, 2B, 2M, 2N) relative to the underlying structural disorder and consequent impaired function of VWF, and the most severe type 3 where virtually complete absence of VWF is observed. Diagnosis of VWD relies on clinical features that include personal and family bleeding history, and is confirmed by laboratory testing. The mainstay of VWD laboratory diagnostics is determination of both VWF antigen (VWF:Ag) and activity, as well as FVIII activity. However, due to the multifunctional nature and structural complexity of VWF, heterogeneity of underlying genetic variants, and variable bleeding tendency, accurate differential diagnosis of VWD is often challenging and the exact nature of causative VWF defect might remain incompletely revealed when commonly available laboratory assays are used. Therefore, for proper differential diagnosis of VWD subtypes, which is the basis for adequate patient treatment and counselling, additional assays that assess structural and functional features of VWF are required. In the differential diagnosis of VWD, patients presenting with ambiguous mild bleeding phenotypes coupled with borderline levels of VWF (30-50 %) are especially hard to be properly characterized. Difficulties may also arise due to similarities in clinical presentation and laboratory results with patients suffering from the mild form of haemophilia A.

Aim: The aim of the present study was to provide accurate diagnosis of VWD and distinction from mild haemophilia A by introducing a comprehensive laboratory diagnostic approach that included screening and specific coagulation assays, as well as molecular analysis of VWF and FVIII genes by means of next-generation sequencing (NGS) and additional targeted screening for deletions and duplications using the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method. With this approach, we aimed to reveal the types, distribution and frequency of mutations within the VWF gene and FVIII genes in a selected cohort of Croatian patients. Additionally, by comparing the results of coagulation testing and genetic analysis with clinical data we wanted to gain a more profound understanding of the underlying pathophysiological mechanism of the bleeding phenotype in the studied patients.

Patients and Methods: This cross-sectional study included 83 participants (54 adult and 29 paediatric) comprising patients previously diagnosed with VWD, their family members with bleeding symptoms and those with indistinctive phenotypes between VWD and mild haemophilia A. Study participants were recruited from January 2020 to May 2021 during their regular medical visit at the University Hospital Centre Zagreb. Two 2.7 or 4.5-mL 3.2 % sodium citrate tubes were drawn from each participant. The data about gender, age, AB0 group type, personal and family bleeding history as well as therapy were recorded. Coagulation testing included determination of platelet count, prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), platelet function analyzer-200 (PFA-200) closure time using cartridges with collagen and either epinephrine (COL/EPI) or adenosine diphosphate (COL/ADP), VWF gain-of-function mutant GPIb binding activity (VWF:GPIbM), VWF antigen (VWF:Ag), VWF collagen binding activity (VWF:CB) and multimeric analysis. Genetic analysis included NGS of all 52 exons, intronic flanking regions, and promoter of the VWF gene, and all 26 exons, exon-intron boundaries and the promoter region of the FVIII gene. In addition, for patients for whom mutations were not detected with NGS but still revealed a laboratory phenotype indicative of VWD, additional targeted screening for large deletions and duplications was performed by means of MLPA.

Results: Of the 83 study participants, 48 were identified with disease-associated mutations in the VWF gene, of whom 19 were classified as type 1 VWD, 6 as type 3 VWD, while among the 23 patients with type 2 VWD, 15 were assigned as type 2A, seven as type 2B, while in one case type 2N VWD was confirmed. In 47 patients causative mutations were identified by means of NGS, while in one patient MLPA analysis revealed the presence of a large

heterozygous deletion. Heterozygous genotype was present in 38 patients, compound heterozygosity in 7 patients while three patients were homozygous for mutations within the VWF gene. In total, 36 distinct disease-associated mutations were found within the VWF gene, comprising 25 missense mutations, six nonsense mutations, three deletions and two splicing variants within intronic regions. Causative mutations were spread throughout the whole VWF gene, with the majority of them (18) being located within the largest exon 28. A total of 13 novel mutations within the VWF gene were identified: 8 missense mutations (c.571T>C, c.1496A>C, c.1531A>C, c.3829G>T, c.3829G>C, c.4471A>G, c.6479A>G, c.6596G>A), three nonsense mutations (c.319C>T, c.6151A>T, c.6504C>A), one heterozygous deletion of exons 1 to 6 and one splicing mutation within the intronic region (c.6599-2A>G). Four study participants were identified with mutations within the FVIII gene only, while one female participant had mutations both in VWF and FVIII genes. The two siblings who were homozygous for a mutation in the FVIII gene were diagnosed with mild haemophilia A, while the three heterozygous females were classified as carriers of mild haemophilia A. Two mutations within the FVIII gene were novel (c.1553A>C and c.6253G>A). Of the remaining 30 (36 %) study participants without mutations within the VWF and FVIII genes, nine had VWF:GPIbM below 50 % and were classified as "low VWF". Comparison of results of coagulation test results between patients with type 1 VWD, type 2 VWD, type 3 VWD, patients classified as "low VWF", those without mutations in the VWF and FVIII genes and normal coagulation testing results, and patients with mutations in FVIII gene revealed statistically significant difference ($P < 0.001$) for aPTT, PFA-200 COL/EPI, PFA-200 COL/ADP, VWF:GPIbM, VWF:Ag, FVIII, VWF:CB, relative content of high and low molecular weight multimers, as well as VWF:GPIbM/VWF:Ag ($P < 0.001$), VWF:CB/VWF:Ag ($P = 0.022$) and FVIII/VWF:Ag ($P = 0.001$) ratios. Both tranexamic acid and replacement therapy with concentrates containing VWF and FVIII were more frequently applied to patients with mutations within the VWF, compared to those without ($P = 0.021$ and $P = 0.009$, respectively).

Conclusions: The present study revealed considerable phenotypic and genetic heterogeneity among patients with VWD in Croatia. The application of simultaneous sequencing of whole VWF and FVIII genes by means of NGS was proven as a valid approach for differential diagnosis of VWD subtypes, as well as for unambiguous distinction of VWD from mild haemophilia A and identification of complex genotypes. Identification of causative mutations, together with detailed analysis of structural and functional disorders of VWF using specific

coagulation assays, enhanced the understanding of the pathophysiological mechanism underlying the patient's bleeding disorder, allowed appropriate treatment and provided basis for genetic counselling.

Keywords: von Willebrand disease, mild haemophilia A, coagulation testing, molecular diagnostics, next-generation sequencing

POPIS KRATICA

5' UTR	netranslatirajuća regija na 5' kraju (engl. *5' untranslated region*)
ACMG	Američko društvo za medicinsku genetiku i genomiku (engl. *American College of Medical Genetics and Genomics*)
ADAMTS13	proteaza 13 iz obitelji dizintegrina i metaloproteinaza s trombospondinskim dijelovima (engl. *A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs-13*)
ADP	adenozin-difosfat
AK	aminokiselina
APTV	aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
AVWS	stečeni von Willebrandov sindrom (engl. *acquired von Willebrand syndrome*)
BAT	upitnik o sklonosti krvarenju (engl. *bleeding assessment tool*)
CLEC4M	član M iz domenske obitelji 4 lektina tipa C (engl. *C-Type Lectin Domain Family 4 Member*)
COL	kolagen
CT	vrijeme nastanka trombocitnog ugruška na uređaju PFA-200 (engl. *closure time*)
DDAVP	1-dezamino-8-D-arginin-vazopresin (dezmopresin)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
dNTP	deoksiribonukleozid-trifosfati
eBLT	magnetne kuglice s vezanim transpozonima (engl. *enrichment bead-linked transposomes*)
EE1	pufer za eluciju kod reakcije obogaćivanja (engl. *enrichment elution buffer 1*)
EEW	otopina za pojačano ispiranje kod reakcije obogaćivanja (engl. *enhanced enrichment wash*)
EHB2	hibridizacijski pufer za reakciju obogaćivanja 2 (engl. *enrichment hybridization buffer 2*)
ELISA	enzimski povezan imunosorpcijski test (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
EPI	epinefrin (adrenalin)
EPM	reakcijska smjesa za PCR (engl. *enhanced PCR mix*)
ER	endoplazmatski retikul

ET2	ciljni pufer za eluciju (engl. *elute target buffer 2*)
FIXa	aktivirani faktor zgrušavanja IX
FVIII	faktor zgrušavanja VIII
FVIIIa	aktivirani faktor zgrušavanja VIII
FX	faktor zgrušavanja X
GPIb	trombocitni glikoprotein Ib
GPIb/IX/V	trombocitni kompleks glikoproteina Ib, IX i V
GPIbα	alfa-lanac trombocitnog glikoproteina Ib
GPIIb/IIIa	trombocitni glikoprotein IIb/IIIa
GRCh37	humani referentni genom (hg19)
HA	hemofilija A
Het	heterozigot
HGVS	Društvo za varijante humanog genoma (engl. *Human Genome Variation Society*)
HMWM	visokomolekularni multimeri (engl. *high molecular weight multimers*)
Hom	homozigot
HT1	hibridizacijski pufer
IMWM	srednjemolekularni multimeri (engl. *intermediate molecular weight multimers*)
IQR	interkvartilni raspon
HP3	2N otopina natrijeva hidroksida
ISTH	Međunarodno društvo za trombozu i hemostazu (engl. *International Society on Thrombosis and Hemostasis*)
LMWM	niskomolekularni multimeri (engl. *low molecular weight multimers*)
LRP1	protein povezan s receptorom za lipoprotein niske gustoće (engl. *low density lipoprotein receptor-related protein 1*)
MLPA	metoda višestrukog umnažanja vezanih sondi (engl. *multiplex ligation-dependent probe amplification*)
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger ribonucleic acid*)
NET	neutrofilna izvanstanična zamka (engl. *neutrophil extracellular trap*)
NGS	sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next-generation sequencing*)
NHB2	hibridizacijski pufer 2 i blokirajuće tvari (engl. *hybridization buffer 2 + IDT NXT blockers*)
NHF	Nacionalna zaklada za hemofiliju (engl. *National Hemophilia Foundation*)

NM_00052.4	referentna sekvenca gena za von Willebrandov faktor
pb	parovi baza
PCR	reakcija lančane polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)
PFA	uređaj za ispitivanje funkcije primarne hemostaze (engl. *platelet function analyzer*)
PPC	početnice za PCR reakciju (engl. *PCR Primer Cocktail*)
PV	protrombinsko vrijeme
RIPA	agregacija trombocita potaknuta ristocetinom (engl. *ristocetin-induced platelet aggregation*)
RSB	resuspendirajući pufer (engl. *resuspension buffer*)
Siglec-5	član 5 iz obitelji lektina sličnog imunoglobulinu koji veže sijalinsku kiselinu (engl. *Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 5*)
SMB3	streptavidinske magnetne kuglice (engl. *streptavidin magnetic beads*)
SSC	Znanstveni standardizacijski odbor (engl. *Scientific Standardization Committee*)
ST2	pufer za zaustavljanje reakcije tagmentacije (engl. *stop tagment buffer 2*)
TWB	pufer za ispiranje nakon tagmentacije (engl. *tagment wash buffer*)
UMWM	multimeri izrazito velike molekularne mase (engl. *ultralarge molecular weight multimers*)
VWB	von Willebrandova bolest
VWF	von Willebrandov faktor
VWF:CB	test sposobnosti von Willebrandova faktora da veže kolagen
VWF:FVIIIB	test sposobnosti von Willebrandova faktora da veže FVIII
VWF:GPIbM	test aktivnosti von Willebrandova faktora koji se koristi lateks-česticama obloženim rekombinantnim glikoproteinom Ib s dvjema pojačivačkim mutacijama
VWF:GPIbR	test aktivnosti von Willebrandova faktora koji se koristi lateks-česticama i ristocetinom
VWF:RCo	ristocetinom potaknuta aktivnost von Willebrandova faktora
VWFpp	propeptid von Willebrandova faktora
WFH	Svjetska federacija za hemofiliju (engl. *World Federation of Hemophilia*)
χ^2	hi-kvadrat

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Von Willebrandova bolest – uvodni dio 1

1.2. Struktura i sinteza von Willebrandova faktora 3

1.3. Uloga von Willebrandova faktora u hemostazi 9

1.4. Podjela von Willebrandove bolesti 11

1.5. Molekularna osnova i nasljeđivanje von Willebrandove bolesti 13

1.6. Klinička slika von Willebrandove bolesti 17

1.7. Terapijski pristupi kod von Willebrandove bolesti 19

1.8. Laboratorijska dijagnostika von Willebrandove bolesti 21

1.8.1. Probirne laboratorijske pretrage 21

1.8.2. Usmjerene laboratorijske pretrage 23

1.8.2.1. Određivanje aktivnosti von Willebrandova faktora 23

1.8.2.2. Određivanje koncentracije antigena von Willebrandova faktora 24

1.8.2.3. Određivanje aktivnosti faktora zgrušavanja VIII 24

1.8.3. Diferencijalno dijagnostičke pretrage 26

1.8.4. Predanalitički i biološki čimbenici u dijagnostici von Willebrandove bolesti 34

1.8.5. Molekularna dijagnostika von Willebrandove bolesti 36

1.9. Razlikovanje von Willebrandove bolesti i blage hemofilije A 38

2. OBRAZLOŽENJE TEME I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA 40

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 42

4. ISPITANICI I METODE 43

4.1. Ispitanici i uzorci 43

4.2. Metode 44

4.2.1. Koagulacijske pretrage 44

4.2.1.1. Broj trombocita 44

4.2.1.2. Kapacitet primarne hemostaze 44

4.2.1.3. Probirne koagulacijske pretrage 44
4.2.1.4. Određivanje aktivnosti von Willebrandova faktora 45
4.2.1.5. Određivanje koncentracije antigena von Willebrandova faktora 45
4.2.1.6. Određivanje aktivnosti faktora zgrušavanja VIII 46
4.2.1.7. Test vezanja kolagena 46
4.2.1.8. Izračun omjera 47
4.2.1.9. Analiza multimera von Willebrandova faktora 47
4.2.2. Genetička analiza 49
4.2.2.1. Izdvajanje genomske DNA 49
4.2.2.2. Mjerenje koncentracije i čistoće DNA 49
4.2.2.3. Sekvenciranje sljedeće generacije 50
4.2.2.3.1. Priprema knjižnica 50
4.2.2.3.2. Kvantifikacija knjižnica i provjera veličine ulomaka 52
4.2.2.3.3. Hibridizacija i reakcije obogaćivanja 53
4.2.2.3.4. Razrjeđivanje knjižnica i završna priprema za sekvenciranje 55
4.2.2.3.5. Sekvenciranje gena za von Willebrandov faktor i faktor zgrušavanja FVIII na uređaju MiSeq 56
4.2.2.3.6. Analiza rezultata sekvenciranja 60
4.2.2.4. Metoda višestrukog umnažanja vezanih sondi 61
4.3. Statistička obrada podataka 65
5. REZULTATI 66
5.1. Opće osobine ispitanika 66
5.2. Vrsta, raspodjela i učestalost mutacija u genima za von Willebrandov faktor i faktor zgrušavanja VIII 67
5.3. Klasifikacija ispitanika na temelju rezultata koagulacijskih pretraga i genetičke analize 71
5.4. Usporedba rezultata koagulacijskih pretraga 73
5.5. Usporedba simptoma krvarenja i primjenjivane terapije 86

5.6. Rezultati koagulacijskih pretraga i genetičke analize kod bolesnika s tipom 1 von Willebrandove bolesti 93

5.7. Rezultati koagulacijskih pretraga i genetičke analize kod bolesnika s tipom 2 von Willebrandove bolesti 100

5.8. Rezultati koagulacijskih pretraga i genetičke analize kod bolesnika s tipom 3 von Willebrandove bolesti 108

5.9. Skupni prikaz utvrđenih mutacija u genu za von Willebrandov faktor 110

5.10. Rezultati usmjerenih koagulacijskih pretraga i genetičke analize kod bolesnika kod kojih su utvrđene mutacije u genu za FVIII 111

5.11. Ispitanici bez mutacija u genima za von Willebrandov faktor i faktor zgrušavanja VIII 114

5.11.1. Ispitanici klasificirani kao ,,niski VWF“ 114

5.11.2. Ostali ispitanici bez mutacija u genima za von Willebrandov faktor i faktor zgrušavanja VIII 118

6. RASPRAVA 119

7. ZAKLJUČCI 138

8. POPIS LITERATURE 140

9. ŽIVOTOPIS 154

1. UVOD

1.1. Von Willebrandova bolest – uvodni dio

Von Willebrandova bolest (VWB) najčešći je nasljedni poremećaj zgrušavanja krvi koji nastaje zbog kvantitativnog manjka ili kvalitativnih promjena von Willebrandova faktora (VWF), uzrokovanih mutacijama u genu za VWF (1). Pojavnost VWB-a u općoj populaciji iznosi približno 1 na 1000, iako se u literaturi mogu naći podaci o prevalenciji u rasponu od 0,01 % do 1 %. VWB se smatra jednim od najmanje prepoznatih hematoloških poremećaja. Procjenjuje se da broj simptomatskih, klinički značajnih slučajeva VWB-a iznosi 125 na milijun stanovnika, dok se teški oblik bolesti javlja u jedan do pet slučajeva na milijun stanovnika (2-4). VWB je etnički i geografski jednakomjerno rasprostranjena, a iako zahvaća oba spola podjednako, kod žena se dijagnosticira dvostruko češće nego kod muškaraca zbog fizioloških krvarenja u reproduktivnoj dobi (2).

Simptomi bolesti izrazito su heterogeni i kod najvećeg broja bolesnika očituju se krvarenjima u kožu i sluznice, produljenim krvarenjem nakon operacijskih zahvata ili ozljeda, dok su krvarenja u zglobove, mišiće i mozak rijetka te ograničena na teške oblike bolesti (1, 5). Težina krvarenja ovisi o razini VWF-a u krvi te njegovim strukturnim i funkcionalnim poremećajima (2).

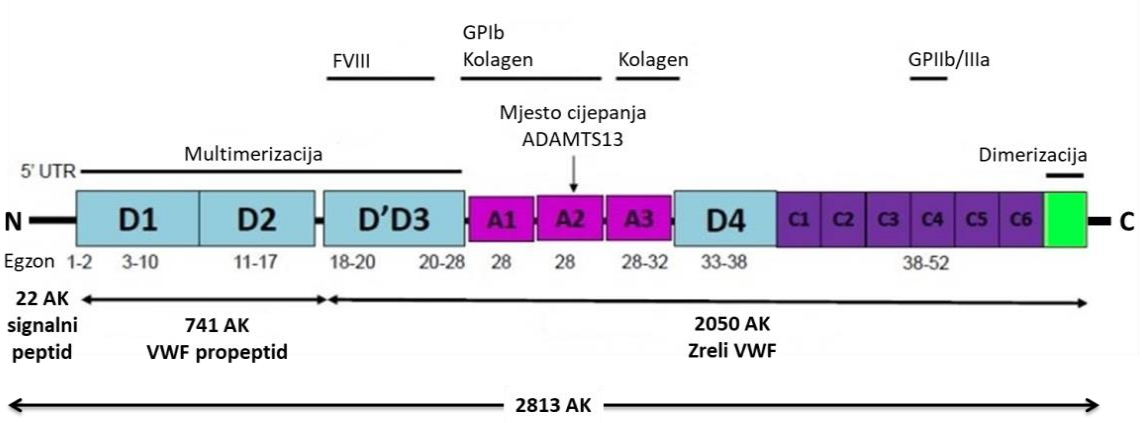
Bolest je prvi opisao finski internist dr. Erik Adolf von Willebrand u svom radu objavljenom 1926. godine. Teoriju o do tada neotkrivenom poremećaju krvarenja uobličio je tijekom liječenja djevojčice Hjördis S. podrijetlom s Ålandskog otočja smještenog u arhipelagu između Švedske i Finske koja je tijekom života imala više epizoda obilnih krvarenja iz nosa, usana, zgloba i nakon vađenja zubiju, a naposljetku je iskrvarila do smrti tijekom četvrte menstruacije u dobi od 14 godina. Detaljnom obradom čak 66 članova njezine obitelji utvrdio je da je njih 23 imalo slične simptome krvarenja, da su oba roditelja u mladosti bila sklona učestalim krvarenjima iz nosa te da su četiri njezine sestre umrle u ranom djetinjstvu zbog prekomjernog krvarenja iz nosa, gastrointestinalnog sustava i/ili kao posljedica ozljeda (6, 7). U svojim zapisima produljeno vrijeme krvarenja uz uredan broj trombocita smatrao je ključnim obilježjima ove bolesti, a poremećaj je okarakterizirao kao neotkriveni oblik hemofilije koji zahvaća oba spola i nazvao ga nasljedna pseudohemofilija. U narednom razdoblju više je znanstvenika neovisno opisalo slučajeve oba spola s istovjetnim kliničkim obilježjima, a otkrićem metoda za određivanje aktivnosti faktora zgrušavanja VIII

(FVIII) utvrđeno je da se uz produljeno vrijeme krvarenja može javiti i snižena aktivnost FVIII. Do zaključka da se radi o primarnom poremećaju nekog drugog faktora u sustavu zgrušavanja koji je različit od FVIII došla je 1956. godine grupa znanstvenika u Sveučilišnoj bolnici u Malmöu u Švedskoj na čelu s liječnicom Ingom Marie Nilsson. Oni su uočili da je primjenom precipitata plazme koji je sadržavao fibrinogen i FVIII kod bolesnice s opsežnim krvarenjima iz maternice došlo do normalizacije vremena zgrušavanja i povišenja aktivnosti FVIII, a krvarenja su zaustavljena. Jednak učinak uočen je i za pripravak dobiven iz plazme bolesnika s hemofilijom A, što je upućivalo da je za korekciju vremena zgrušavanja odgovoran faktor koji je jednako prisutan u normalnoj plazmi i u plazmi bolesnika s hemofilijom A (7). Daljnja istraživanja koja su proveli američki liječnik Edwin William Saltzman te norveški znanstvenici Leif Jørgensen i Christian Fredrik Borchgrevink pokazala su da je kod bolesnika s VWB-om prisutna smanjena adhezija trombocita na oštećeni endotel (7, 8). Za identifikaciju novog proteina u sustavu zgrušavanja, koji je kasnije nazvan VWF, zaslužan je američki liječnik Theodore S. Zimmerman. On je 1971. godine imunokemijskom metodom koja se koristila antiserumom naspram VWF-a dokazao njegovu prisutnost kod zdravih ispitanika i bolesnika s hemofilijom A, ali ne i bolesnika s VWB-om (9). Daljnjim istraživanjima u području VWB-a otkrivene su njegove funkcije u hemostazi te opisana proteinska struktura, što je dovelo do razvoja laboratorijskih pretraga koje se danas koriste u dijagnostici. Također su provedena opsežna epidemiološka istraživanja opće populacije, otkriven je gen odgovoran za sintezu VWF-a, bolest je klasificirana u podtipove ovisno o vrsti i opsegu poremećaja VWF-a te su razvijeni pristupi liječenju bolesnika (8). Danas je VWB jasno definiran poremećaj krvarenja koji se dijagnosticira na temelju pozitivne osobne i/ili obiteljske anamneze, a potvrđuje laboratorijskom dijagnostikom. Ipak, zbog višestruke uloge VWF-a u hemostazi, složenosti njegove strukture, brojnih mutacija u različitim dijelovima gena za VWF koje različito utječu na njegovu aktivnost i posljedično dovode do izrazite heterogenosti kliničke slike krvarenja, pravilna je dijagnostika VWB-a još uvijek znatan izazov. Iz istog razloga detaljna patofiziološka osnova bolesti ostaje nedovoljno istražena, što i dalje potiče znanstvenike na brojna istraživanja u ovom području.

1.2. Struktura i sinteza von Willebrandova faktora

VWF je adhezijski multimerni glikoprotein čija molekularna masa može iznositi od 500 do čak preko 20 000 kDa, što ga čini najvećim poznatim ljudskim plazmatskim proteinom. Sastoji se od pojedinačnih polipeptidnih jedinica prosječne molekularne mase 250 kDa koje su međusobno povezane disulfidnim vezama (10, 11).

Sinteza VWF-a odvija se u endotelnim stanicama i megakariocitima, a započinje stvaranjem prepropolipeptida (pre-pro-VWF) kojeg čini ukupno 2813 aminokiselina (AK). Sastoji se od kratkoga signalnog peptida od 22 AK na aminoterminalnom kraju, propeptida (VWFpp) izgrađenog od 741 AK te zrele monomerne jedinice VWF-a od 2050 AK (12, 13). Pre-pro-VWF ima karakterističnu višedomensku strukturu koja se sastoji od nekoliko homolognih područja koja se ponavljaju u sljedećem slijedu: SP-D1-D2-D'D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK, pri čemu područje D1-D2 odgovara VWFpp. Slika 1 prikazuje domensku strukturu monomera VWF-a s mjestima za vezanje ključnih liganada. Domene sadržavaju brojna vezna mjesta za različite ligande, čime omogućavaju pravilnu sintezu, sazrijevanje i hemostatsku funkciju VWF-a (Tablica 1.).



Slika 1. Domenska struktura monomera von Willebrandova faktora s naznačenim veznim mjestima za ključne ligande (prilagođeno prema 14).

FVIII – faktor zgrušavanja VIII; GPIb – trombocitni glikoprotein Ib; ADAMTS13 - proteaza 13 iz obitelji dizintegrina i metaloproteinaza s trombospondinskim dijelovima (engl. *A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs-13*); GPIIb/IIIa – trombocitni glikoprotein IIb/IIIa; AK – aminokiseline; VWF – von Willebrandov faktor; 5' UTR – netranslatirajuća regija na 5' kraju (engl. *5' untranslated region*)

Tablica 1. Ligandi i vezne domene von Willebrandova faktora (prilagođeno prema 15)

Skupina liganada	Protein	Vezna domena VWF-a
Plazmatski proteini	FVIII	D'-D3
	ADAMTS13	A1-A2-A3
	Fibrin	C1-C6
	Komponente komplementa	C1-C2
Trombocitni receptori	Glikoprotein Ib	A1
	Glikoprotein IIb/IIIa	C4
	P-selektin	D'-D3
Receptori endotelnih stanica	Integrin αVβ3	C4
	P-selektin	D'-D3
	Protein sličan kolinskom transporteru-2	A1
	CLEC4M	/
Receptori glatkih mišićnih stanica krvne žile	Integrin αVβ3	C4
Leukocitni receptori	Integrini β2	D'-D3, A1-A2-A3
	P-selektin glikoprotein-1 ligand	Glikani
	Siglec-5	/
	LRP1	/
Proteini izvanstaničnog matriksa	Kolagen tip I	A3
	Kolagen tip III	A3
	Kolagen tip VI	A1
	Trombospondin	A3
	Heparin	A1
Ostali plazmatski i/ili stanični proteini	Histoni	A1
	DNA/NETovi	A1
	Angiopoetin-2	A1
	Interleukin-8	/
	Galektin-1, galektin-3	Glikani
	Osteoprotegerin	A1
	Multimerin 1	A1-A2-A3

FVIII – faktor zgrušavanja FVIII; ADAMTS13 – proteaza 13 iz obitelji dizintegrina i metaloproteinata s trombospondinskim dijelovima (engl. *A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs-13*); CLEC4M – član M iz domenske obitelji 4 lektina tipa C (engl. *C-Type Lectin Domain Family 4 Member*); Siglec-5 – član 5 iz obitelji lektina sličnog imunoglobulinu koji veže sijalinsku kiselinu (engl. *Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 5*); LRP1 – protein povezan s receptorom za lipoprotein niske gustoće (engl. *Low density lipoprotein receptor-related protein 1);* DNA – deoksiribonukleinska kiselina; NET – neutrofilna izvanstanična zamka *(engl. neutrophil extracellular trap)*

Prije otpuštanja funkcionalnog oblika VWF-a u cirkulaciju, prethodnička molekula pre-pro-VWF-a podliježe nizu posttranslacijskih modifikacija. Signalni peptid odgovoran je za usmjeravanje ribosoma koji sadržava pre-pro-VWF na membranu endoplazmatskog retikula (ER) gdje dolazi do njegova uklanjanja proteolitičkim cijepanjem, pri čemu preostaje molekula sastavljena od 2791 AK koja se naziva pro-VWF (16). U lumenu ER-a započinje proces N-glikozilacije. Djelovanjem enzima oligosahariltransferaze dolazi do dodavanja 14-saharidnih podjedinica koje se sastoje od tri molekule glukoze, devet molekula manoze i dvije molekule N-acetilglukozamina ($Glc_3Man_9NAc_2$) na aminoskupine asparaginskih ostataka osnovnoga peptidnog lanca. Time nastaje 16 N-glikoziliranih ostataka strukture Asn-bilo koja AK-Ser ili Thr te devet N-glikoziliranih ostataka strukture Asn-bilo koja AK-Cys. Kako bi se omogućilo pravilno prostorno uvijanje proteina, membranske glukozidaze I i II uklanjaju dvije krajnje molekule glukoze čime nastaje monoglikozilirana oligosaharidna jedinica $Glc_1Man_9NAc_2$ koja služi kao vezno mjesto za stvaranje kompleksa s kalneksinom vezanim na membrani ER ili topljivim kalretikulinom. Djelovanjem disulfid-izomeraze A3 dolazi do stvaranja disulfidnih veza između tiolnih skupina (-SH) cisteinskih ostataka, što olakšava postizanje pravilne konfiguracije monomera VWF-a. Zadnji glukozni ostatak tada se uklanja djelovanjem glukozidaze II, a monomer VWF-a odvaja od kalneksina ili kalretikulina i povezuje u dimere djelovanjem disulfid-izomeraze A1. Ovaj enzim katalizira stvaranje disulfidnih veza unutar cistinskog čvora na karboksiterminalnom kraju unutar CK domene VWF-a u uvjetima neutralnog pH (16, 17). Dimeri pro-VWF prenose se u Golgijev aparat gdje dolazi do daljnje glikozilacije. N-glikozilacija započinje djelovanjem manozidaze, N-acetilglukozamin-transferaze i fukozidaze u cis odjeljcima i medijalnim odjeljcima Golgijeva aparata, a završava stvaranjem složenih glikana djelovanjem galaktoziltransferaze i sijaliltransferaze u trans-odjeljku. O-glikani nastaju prijenosom N-acetilgalaktozamina na hidroksilne skupine serinskih ili treoninskih ostataka koje se nalaze na površini monomera VWF-a. Složeniji O-glikani nastaju daljnjim dodavanjem oligosaharida. Poslijetranslacijsko

dorađivanje monomera VWF-a završava sijalizacijom, odnosno vezanjem sijalinskih kiselina, od kojih je najzastupljenija N-acetilneuraminska kiselina (17).

U Golgijevu aparatu također dolazi do proteolitičkog cijepanja VWFpp djelovanjem enzima furina, ali VWFpp ostaje vezan na monomer VWF-a nekovalentnom vezom do otpuštanja zrelog VWF-a u cirkulaciju (13, 16-18). Time se olakšava proces multimerizacije jer VWFpp ima oksidoreduktaznu aktivnost preko dva AK slijeda Cys-Gly-Leu-Cys, i to u domeni D1 na mjestima 159 do 162 i u domeni D2 na mjestima 521 do 524. Multimerizacija se odvija u uvjetima kiselog pH 6,2 i visoke koncentracije kalcijevih iona, a smatra se da ključnu ulogu ima histidin koji jedini od svih AK-a ima pKa 6,0, što je najbliže vrijednosti pH od 6,2 kolika je u Golgijevu aparatu. Zbog toga dolazi do protoniranja histidinskih ostataka, dok se ključni cisteinski ostaci Cys1099 i Cys1142 deprotoniraju, pri čemu nastaju disulfidne veze između istovjetnih cisteinskih ostatatka unutar domena D3 dimera VWF-a (Cys1099-1099' i Cys1142-1142'). U konačnici nastaju multimeri VWF-a koji se sastoje od najmanje dvije pa sve do 40 dimernih podjedinica (16, 17, 19). Multimeri VWF-a se prema broju dimernih jedinica dijele na multimere male (engl. *low molecular weight multimers,* LMWM), srednje (engl. *intermediate molecular weight multimers,* IMWM), velike (engl. *high molecular weight multimers,* HMWM) i izrazito velike molekularne mase (engl. *ultralarge molecular weight multimers,* UMWM) (Tablica 2.). Multimeri veće molekularne mase nose veći broj veznih mjesta za trombocitni GPIb i kolagen, pa hemostatska aktivnost VWF-a i klinička slika krvarenja izravno ovise o udjelu HMWM-a.

Tablica 2. Sastav i funkcija multimera von Willebrandova faktora (prema 20)

Multimeri VWF-a	Broj dimernih podjedinica	Molekularna masa (kDa)	Raspodjela	Uloga u hemostazi
Niskomolekularni multimeri	1 - 5	500 – 2500	Cirkuliraju u plazmi	Isključivo nosač FVIII
Srednjemolekularni multimeri	6 – 10	3000 – 5000		Vezanje za trombocite niskim afinitetom; nosač FVIII
Visokomolekularni multimeri	11 – 20	5500 – 10 000		Vezanje na trombocite visokim afinitetom; nosač FVIII
Izrazito (ultra) veliki multimeri	>20	>10 000	Pohrana u Weiber-Paladijevim tjelešcima i α-granulama trombocita	Cijepaju se na manje multimere neposredno nakon otpuštanja u cirkulaciju

VWF – von Willebrandov faktor; FVIII – faktor zgrušavanja VIII

Oko 95 % VWF-a iz endotelnih stanica otpušta se kontinuirano, dok se preostali dio najvećim dijelom organizira u tubularne strukture i pohranjuje u Weiber-Paladijevim tjelešcima endotelnih stanica (12, 21). Tako pohranjeni VWF sadržava isključivo UMWM. Do otpuštanja VWF-a iz Weiber-Paladijevih tjelešaca dolazi kod svake aktivacije hemostatskog sustava, a fiziološki može biti potaknuto različitim agonistima poput histamina, estrogena, trombina i fibrina. VWF se iz Weiber-Paladijevih tjelešaca otpušta egzocitozom u obliku UMWM-a. Nakon otpuštanja, VWFpp odvaja se od VWF-a i cirkulira samostalno kao nekovalentni homodimer vrlo kratkog poluvremena života (~2 sata). S obzirom na to da su UMWM izrazito hemostatski aktivni, dolazi do njihova cijepanja u domeni A2 VWF-a na

mjestu Tyr1605-Met1606 djelovanjem proteaze ADAMTS13 (engl. *A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs-13*). Time se regulira veličina VWF-a te sprječava prekomjerna aktivacija i agregacija trombocita na mjestu ozljede krvne žile (12, 16, 21).

VWF se sintetizira i u megakariocitima, a pohranjuje u α-granulama trombocita. Tu se može nalaziti i do 20 % ukupnog VWF-a u organizmu koji se također pretežito sastoji od UMWM-a. Međutim, VWF se iz trombocita oslobađa tek nakon njihove aktivacije pod utjecajem agonista poput adenozin-difosfata (ADP), kolagena i trombina, a otpušta se zajedno s ostalim sadržajem trombocitnih granula. Nakon oslobađanja, potiče adheziju trombocita uz ozlijeđeno tkivo i njihovo međusobno povezivanje (21).

Nakon otpuštanja u cirkulaciju, VWF se veže za FVIII i stvara nekovalentni kompleks. Poluvrijeme života VWF-a iznosi oko 12 sati, a ovisi o stupnju i obrascu glikozilacije VWF-a. Smatra se da su stanice srodne makrofagima u jetri i slezeni odgovorne za uklanjanje VWF-a iz cirkulacije, međutim točan mehanizam nije još u potpunosti razjašnjen (22, 23).

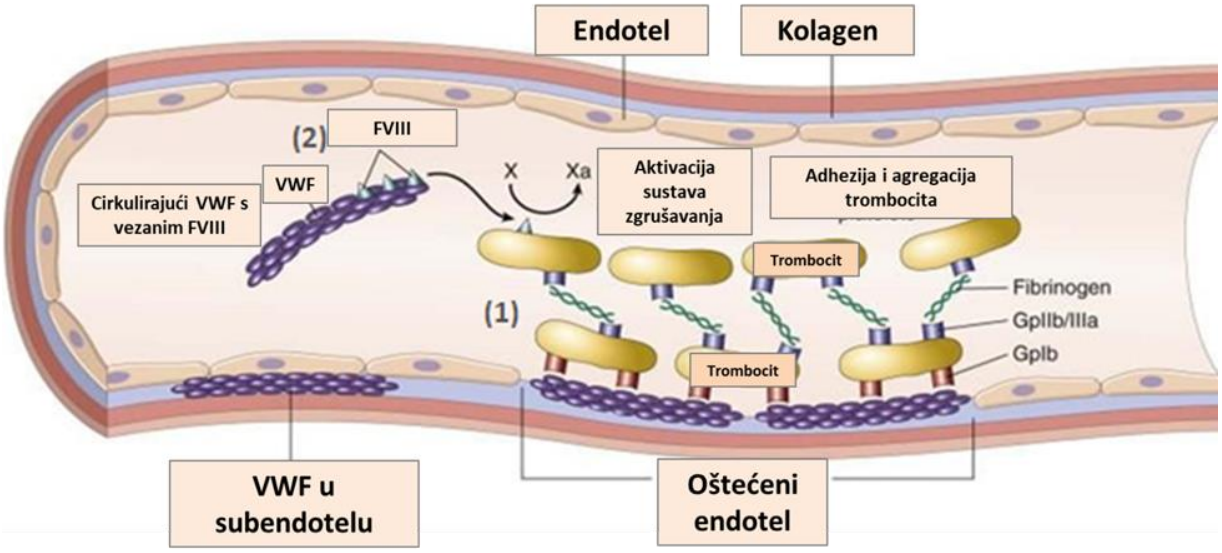
1.3. Uloga von Willebrandova faktora u hemostazi

Aktivacija sustava zgrušavanja započinje neposredno nakon ozljede krvne žile, pri čemu dolazi do niza procesa preko kojih nastaje trombocitni ugrušak (primarna hemostaza). Susljednim djelovanjem aktiviranih čimbenika zgrušavanja trombocitni ugrušak učvršćuje se u fibrinski ugrušak (sekundarna hemostaza). VWF ima ključnu ulogu u primarnoj hemostazi jer omogućuje adheziju trombocita na mjestu ozljede krvne žile posredovanjem interakcije kolagena u subendotelu s trombocitnim receptorom glikoproteinom Ib (GPIb) unutar kompleksa GPIb/IX/V te međusobnim povezivanjem trombocita preko vezanja na trombocitni receptorski glikoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa).

Ozljeda krvne žile dovodi do izlaganja subendotela toku krvi. Pojačan protok krvi dovodi do aktivacije i usmjeravanja trombocita te cirkulirajućeg VWF-a na mjesto ozljede krvne žile te otpuštanja pohranjenog VWF-a iz Weiber-Paladijevih tjelešaca. VWF podliježe konformacijskim promjenama te prelazi iz tubularnog u izduženi oblik i veže se pomoću domene A3 na kolagen tipa I i III u subendotelu, dok domena A1 veže kolagen tipa VI. Tako imobiliziran, VWF se veže na α-lanac trombocitnog receptora GPIb (GPIbα) preko aminoterminalnog kraja domene A1 i stvara most kojim dolazi do adhezije trombocita na mjestu ozljede krvne žile (10, 24, 25). Vezanje VWF-a na GPIb potiče oslobađanje trombocitnih agonista ADP-a i tromboksana A2, što dovodi do aktivacije trombocita i povećanja afiniteta trombocitnog integrina GPIIb/IIIa za VWF. Aktivirani se trombociti preko GPIIb/IIIa vežu na tetrapeptidni slijed Arg-Gly-Asp-Ser koji se nalazi blizu karboksiterminalnog kraja u domeni C1 VWF-a. Time je potpomognuta adhezija trombocita, ali i omogućeno njihovo međusobno povezivanje i agregacija (10, 25, 26). Shematski prikaz uloge VWF-a u hemostazi prikazan je na Slici 2.

U sekundarnoj hemostazi VWF sudjeluje posredno jer služi kao nosač FVIII. FVIII nastaje u hepatocitima i endotelnim stanicama kao prethodnički jednolančani polipeptid sastavljen od 2351 AK. Nakon odcijepljenja signalnog peptida (19 AK) i višestrukoga proteolitičkog cijepanja nastaje zreli oblik FVIII izgrađen od 2332 AK koje su organizirane u nekoliko domena prema redoslijedu A1-A2-B-A3-C1-C2. Proteolitičkim cijepanjem u području domene B nastaje heterodimer sastavljen od teškog lanca (A1-A2-B) i lakog lanca (A3-C1-C2) koji su povezani dvovalentnim metalnim ionom. FVIII se preko regija na lakom lancu u području domena C1 i C2 veže na domenu D'D3 koja pripada VWF-a i tvori nekovalentnu vezu. Za tu interakciju ključne su aminokiseline na mjestima od 1672 do 1689, a posebno je važna sulfatacija tirozina na mjestu 1680. Na taj je način očuvana stabilnost

FVIII, spriječena njegova prerana proteolitička razgradnja djelovanjem aktiviranog proteina C i njegova kofaktora proteina S te mu je omogućeno nakupljanje na mjestu ozljede krvne žile i time učinkovito sudjelovanje u procesu zgrušavanja (23, 24, 27, 28). Poluvrijeme života FVIII u kompleksu s VWF-a iznosi 12 do 15 sati, a kada cirkulira slobodan oko dva sata (29). Trombin koji nastaje tijekom procesa zgrušavanja oslobađa FVIII iz kompleksa s VWF-a na način da nastaju dva manja ulomka teškog lanca te dolazi do odvajanja manjeg ulomka iz lakih lanaca. Time nastaje aktivni heterotrimer FVIIIa koji sudjeluje kao kofaktor u reakciji pretvorbe faktora zgrušavanja X (FX) u njegov aktivni oblik FXa pod djelovanjem aktiviranog faktora zgrušavanja IX (FIXa). Radi održavanja hemostatske ravnoteže nastali trombin aktivira protein C koji proteolitički cijepa FVIIIa i na taj način zaustavlja unutarnji put zgrušavanja (30).



Slika 2. Uloga von Willebrandova faktora u hemostazi (prilagođeno prema 31). Nakon ozljede krvne žile i izlaganja oštećenog endotela protoku krvi dolazi do adhezije i agregacije trombocita na mjestu ozljede krvne žile. Pritom von Willebrandov faktor posreduje interakciju kolagena u subendotelu s glikoproteinom Ib na površini trombocita te agregaciju trombocita međusobnim povezivanjem preko vezanja na glikoprotein IIb/IIIa (oznaka 1). Von Willebrandov faktor djeluje i kao nosač FVIII u cirkulaciji čime ga štiti od proteolitičke razgradnji i omogućava njegovo nakupljanje na mjestu ozljede krvne žile te aktivaciju unutarnjeg puta zgrušavanja (oznaka 2).

1.4. Podjela von Willebrandove bolesti

Važeća podjela nasljedne VWB-a, koju je definirao Pododbor za VWF Međunarodnog društva za trombozu i hemostazu (engl. *International Society on Thrombosis and Haemostasis, ISTH*), temelji se na fenotipskim obilježjima VWF-a i dijeli VWB u tri osnovne skupine (1).

Tip 1 najčešći je oblik VWB-a koji obuhvaća do 80 % svih bolesnika, a obilježen je kvantitativnim manjkom VWF-a koji ima očuvanu multimernu raspodjelu i funkciju. Klinička slika krvarenja i rezultati laboratorijskih pretraga koje se koriste u dijagnostici VWB-a kod bolesnika s tipom 1 VWB-a izrazito su heterogeni zbog postojanja brojnih mutacija u genu za VWF koje sve mogu uzrokovati sličan fenotip karakterističan za tip 1 VWB-a. Snižena razina VWF-a u cirkulaciji može biti posljedica smanjenog otpuštanja VWF-a iz endotelnih stanica, njegova ubrzanog uklanjanja iz cirkulacije ili povećane osjetljivosti na proteolitičko djelovanje (1, 32). Istraživanja genetičke osnove VWB-a pokazala su da u oko 35 % bolesnika sa sniženim VWF-a ne postoji mutacija u genu za VWF te da vjerojatnost prisutnosti mutacije raste što je aktivnost VWF-a niža. Zbog toga se u literaturi sve više bolesnike s aktivnošću VWF-a od 30 do 50 % ne svrstava kao tip 1 VWB-a, već izdvaja u zasebnu skupinu koja se naziva tzv. „niski VWF“ (engl. *low VWF*) (33, 34).

Tip 2 javlja se u oko 15 – 20 % bolesnika, obuhvaća kvalitativne poremećaje VWF-a i dijeli se u četiri podskupine (2A, 2B, 2M i 2N), ovisno o vrsti strukturnoga i funkcionalnog poremećaja VWF-a.

Tip 2A obuhvaća oko 50 % svih bolesnika s tipom 2 VWB-a, a obilježen je smanjenim afinitetom vezanja VWF-a na trombocitni GPIb zbog selektivnog manjka HMWM-a i/ili IMWM-a. Iako to nije dio službene klasifikacije VWB-a, tip 2A dodatno se može podijeliti s obzirom na uzrok i to na podtipove uzrokovane poremećajem multimerizacije (IIC, IID, IIE) i zasebni podtip koji nastaje zbog povećane podložnosti proteolitičkoj razgradnji proteazom ADAMTS-13 (IIA). Do smanjene učinkovitosti stvaranja multimera VWF-a može doći zbog poremećaja VWFpp koji sprečavaju multimerizaciju u Golgijevu aparatu (IIC), promjena na karboksiterminalnom kraju CK domene koje sprječavaju proces dimerizacije u endoplazmatskom retikulu (IID) ili promjena unutar D3 domene koje utječu na pravilno stvaranje disulfidnih veza unutar Golgijeva aparata (IIE). Kod podtipa IIA prisutne su mutacije u genu za VWF koje utječu na domenu A2 VWF-a i povećavaju dostupnost ciljnog mjesta cijepanja proteaze ADAMTS-13 (1, 32, 35).

Tip 2B uzrokovan je mutacijama u genu za VWF koje dovode do promjena u domeni A1 i uzrokuju povećani afinitet VWF-a za trombocitni GPIb, ubrzano uklanjanje djelovanjem proteaze ADAMTS-13 i posljedično gubitak HMWM-a. Zbog spontanog vezanja VWF-a na trombocite kod bolesnika s tipom 2B VWB-a može biti prisutna trombocitopenija.

Tip 2M uzrokovan je promjenama u domeni A1 koje dovode do smanjenog afiniteta VWF-a za trombocitni GPIb i posljedično smanjene adhezije trombocita, uz očuvanu multimernu strukturu i raspodjelu. Zbog smanjenog vezanja na trombocite kod tipa 2M ne dolazi do učinkovite proteolitičke razgradnje VWF-a i u cirkulaciji mogu zaostati UMWM-ovi (1, 32, 33). Manji broj slučajeva tipa 2M može nastati zbog promjena u domeni A3 i poremećaja vezanja kolagena tipa VI (2).

Tip 2N nastaje zbog promjena u području domena D' i D3 (od Ser764 do Arg1035) koje se očituju smanjenom sposobnošću vezanja FVIII na VWF. Time je FVIII podložan bržoj proteolitičkoj razgradnji te je njegov životni vijek skraćen na dva sata. S obzirom na to da se tip 2N laboratorijski očituje sniženom aktivnošću FVIII, u nedostatku pretraga koje specifično mjere sposobnost VWF da veže FVIII ovaj se oblik VWB-a može zamijeniti blagom hemofilijom A (1, 32, 35, 36).

Tip 3 najrjeđi je, ali najteži oblik potpunog nedostatka VWF-a koji se javlja s učestalošću od jednog slučaja na milijun stanovnika (1, 32). Karakterizira ga potpuni nedostatak VWF-a zbog čega bolesnici imaju tešku kliničku sliku krvarenja.

Osim nasljednih oblika VWB-a, krvarenje zbog poremećaja VWF-a može biti i stečeno, kao posljedica nekoga drugog osnovnog patofiziološkog poremećaja i takav se poremećaj naziva stečeni von Willebrandov sindrom (engl. *acquired von Willebrand syndrome,* AVWS). Najčešće se javlja u starijoj dobi i to kod bolesnika s limfoproliferacijskim bolestima (multipli mijelom, kronična limfocitna leukemija, Waldenströmova makroglobulinemija i dr.), ali može biti pridružen i mijeloproliferacijskim poremećajima, solidnim tumorima, autoimunim i kardiovaskularnim bolestima, posebice kod bolesnika s umjetnim srčanim zaliscima. Nastaje zbog povećane razgradnje ili ubrzanog uklanjanja VWF-a iz cirkulacije. Laboratorijski se očituje sniženom koncentracijom i aktivnošću VWF-a, a često je prisutan selektivni manjak HMWM-a (37).

1.5. Molekularna osnova i nasljeđivanje von Willebrandove bolesti

Gen odgovoran za sintezu VWF-a nalazi se na kraju kratkog kraka kromosoma 12 (12p13.2), veličine je 178 kb, a sastoji se od 52 egzona. Većina je egzona manja i sastoje se od 41 do 342 parova baza (pb), dok se najveći egzon 28 sastoji od 1379 pb i odgovoran je za kodiranje ključnih regija VWF-a koje su odgovorne za vezanje liganada i uklanjanje VWF-a iz cirkulacije. Egzon 28 ujedno je i područje s najvećim brojem poznatih mutacija koje dovode do poremećaja VWF-a (38, 39). Do danas je poznato više od 700 različitih mutacija u genu za VWF koje su rasprostranjene duž čitavog gena, uključujući promotorsku regiju, svih 52 egzona te intronske regije. Kod tipa 1 i tipa 3 VWB-a uzročne mutacije mogu se naći duž cijelog gena za VWF, dok su kod podtipova tipa 2 ograničene na određene regije gena i zahvaćaju samo pojedine domene VWF-a (Tablica 3.).

Tablica 3. Raspodjela mutacija u genu i zahvaćene domene von Willebrandova faktora po tipovima von Willebrandove bolesti (40-42)

Tip VWB-a		Regije gena za VWF	Domena VWF-a
1		Uzročne mutacije utvrđene duž čitavog gena	Sve domene
2	**2A**	Egzoni 2-17, 22, 25-27, 28, 51-52	A1, A2, D1-D2, D3, CK
	2B	Egzon 28	A1
	2M	Egzoni 28 do 32	A1, A3
	2N	Egzoni 17 do 25	D'D3
3		Uzročne mutacije utvrđene duž čitavog gena	Sve domene

VWB – von Willebrandova bolest; VWF – von Willebrandov faktor

Najveći broj slučajeva tipa 1, 2A, 2B i 2M nasljeđuje se autosomno dominantno, dok se rijetki slučajevi tipa 1 i 2A te većina slučajeva tipa 3 i 2N VWB-a nasljeđuju autosomno recesivno ili su bolesnici složeni heterozigoti (43, 44).

VWB može biti uzrokovana različitim vrstama mutacija unutar gena za VWF. Tablica 4. prikazuje vrste mutacija unutar gena za VWF, njihov učinak i tip VWB-a koji mogu uzrokovati. Ako se naslijede recesivno, besmislene mutacije, pomaci okvira čitanja te greške prekrajanja rezultiraju nul-alelom i potpunim nedostatkom VWF-a. Nul-aleli uzrokuju oko 90 % slučajeva tipa 3 VWB-a (38).

Tablica 4. Vrste mutacija u genu za von Willebrandov faktor, njihov učinak i tip von Willebrandove bolesti koji mogu uzrokovati (39)

Vrsta mutacije	Zahvaćen proces	Opis poremećaja	Tip VWB-a
Transkripcijska	Prepisivanje mRNA	Poremećaj veznog mjesta transkripcijskog faktora dovodi do smanjene ili odsutne sinteze mRNA	1
Greška prekrajanja	Uklanjanje introna	Promjene GT ili AG dinukleotida na 5' ili 3' kraju pojedinog introna ili unutar bočnih intronskih regija koje mogu dovesti do preskakanja egzona, zadržavanja introna ili drugih poremećaja mRNA	Nul mutacije uzrokuju recesivni oblik tipa 3, 2N, 2A i tipa 1
		Preskakanje egzona može dovesti do delecije unutar okvira čitanja i sinteze skraćenog proteina	Dominantni oblik tipa 1 i 2A
Konverzija gena	Stvaranje mRNA ili prevođenje proteina	Zamjena slijeda nukleotida gena za VWF sa slijedom nukleotida pseudogena dovodi do mutacija pogrešnog smisla ili besmislenih mutacija; zahvaća nukleotidne slijedove veličine od 8 do 335 pb	1, 2B, 2M, 3
Besmislena mutacija (engl. *nonsense*)	Prevođenje proteina	Zbog zamjene jednog nukleotida drugim nastaje stop-kodon koji uzrokuje preuranjeni završetak sinteze proteina	Nul-mutacije uzrokuju recesivni oblik tipa 3, 2N i 2A. Dominantno nasljeđivanje uzrokuje tip 1.

Tablica 4. (nastavak) Vrste mutacija u genu za von Willebrandov faktor, njihov učinak i tip von Willebrandove bolesti koji mogu uzrokovati

Vrsta mutacije	Zahvaćen proces	Opis poremećaja	Tip VWB-a
Male delecije, insercije i duplikacije	Stvaranje mRNA ili prevođenje proteina	Promjene okvira čitanja zbog umetanja, uklanjanja ili duplikacije kraćeg slijeda nukleotida, koje najčešće zahvaćaju ponavljajuće slijedove nukletoida.	
		Mogu dovesti do gubitka stvaranja proteina ako je kodirajući slijed aminokiselina prekinut	Nul-mutacije uzrokuju recesivni oblik tipa 3, 2N, 2A i tipa 1
		Poremećaj se može odnositi na umetanje ili gubitak aminokiselina pri čemu su zahvaćeni višestruki slijedovi od po tri nukleotida	Sličan učinak kao kod mutacija pogrešnog smisla (vidi niže u tablici); uzrokuju tip 1, 2A, 2B i 2M
Velike delecije	Stvaranje mRNA ili prevođenje proteina	Mogu obuhvatiti delecije pojedinog egzona, više egzona ili čitavog gena. Poremećena je sinteza proteina ovisno o tome gdje je prekinut nukleotidni slijed. Učinak je sličan kao kod besmislenih mutacija.	Ovisno o opsegu delecije, učinak je sličan besmislenim ili mutacijama pogrešnog smisla, a može se očitovati fenotipom tipa 1,2 i 3. Nul-alel dovodi do recesivnog oblika tipa 3 i tipa 2A.
Mutacije pogrešnog smisla (engl. *missense*)	Prevođenje proteina	Zamjena jednog nukleotida drugim i ugradnja pogrešne aminokiseline. Učinak ovisi o mjestu unutar VWF-a na kojem se supstitucija dogodila.	1, 2A, 2B, 2M, 2N, 3

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger ribonucleid acid*); VWB – von Willebrandova bolest; pb – parovi baza

U najvećem broju slučajeva, odnosno u oko 65 %, VWB je uzrokovana mutacijama pogrešnog smisla (engl. *missense mutation*) kod kojih dolazi do zamjene jednog nukleotida drugim, što rezultira ugradnjom pogrešne aminokiseline prilikom sinteze proteina (40). Ovisno o mjestu unutar molekule VWF-a na kojem dolazi do zamjene aminokiselina takva

promjena u strukturi može dovesti do smanjenja koncentracije te različitih poremećaja strukture i funkcije VWF-a. Mutacije pogrešnog smisla odgovorne su za većinu slučajeva tipova 2 VWB-a jer mogu dovesti do smanjenog vezanja VWF-a na GPIb (tip 2A i 2M), pojačanog vezanja na GPIb (tip 2B), smanjenog afiniteta za FVIII (tip 2N), a dodatno mogu utjecati na učinkovitost procesa dimerizacije i multimerizacije, najčešće uzrokujući promjene u broju cisteinskih ostataka. Tip 1 i tip 3 VWB-a također mogu biti uzrokovani mutacijama pogrešnog smisla, a najčešće se radi o poremećajima otpuštanja VWF-a iz endotelnih stanica ili podložnosti ubrzanoj razgradnji (38).

Besmislene mutacije (engl. *nonsense mutations*) dovode do stvaranja stop-kodona i preuranjenog završetka sinteze proteina VWF-a i pojavljuju se u recesivnom obliku kod tipa 3, 2N i 2A, dok u heterozigotnom obliku uzrokuju tip 1 VWB-a.

Mutacije pomaka okvira čitanja (engl. *frameshift mutations*) obuhvaćaju delecije, duplikacije i insercije, a najčešće se odnose na uklanjanje ili umetanje jednog nukleotida, premda mogu zahvatiti i kraće sljedove nukleotida i to uglavnom unutar ponavljajućih sljedova. Velike su delecije, duplikacije i insercije rijetke, a mogu zahvatiti jedan ili više egzona. U homozigotnom obliku uzrokuju tip 3, dok u heterozigotnom obliku tip 1 VWB-a.

Osim egzona, mutacije se mogu naći unutar intronskih regija. To mogu biti poremećaji GT i AG dinukleotida na 5' i 3' kraju introna koji dovode do izostanka njihova prepoznavanja i greške u prekrajanju proteina. Dodatno, do neučinkovitog prekrajanja mogu dovesti promjene u području od -4 pb do +7 pb od egzon-intron graničnog područja, zbog stvaranja pseudoegzona, dodatnih mjesta prekrajanja ili zadržavanja introna.

Složenosti genetičke osnove VWB-a doprinosi i postojanje nekodirajućega, parcijalnog pseudogena na kromosomu 22 (22q11.2) koji je veličine 25 kb i pokazuje 97-postotnu homologiju s područjem od egzona 23 do 34 gena za VWF. Homolognom rekombinacijom pseudogena s genom za VWF nastaju mutacije pogrešnog smisla ili besmislene mutacije koje odgovaraju slijedu nukleotida na homolognom dijelu pseudogena (10, 39).

1.6. Klinička slika von Willebrandove bolesti

Bolesnici s VWB-om imaju povećanu sklonost krvarenjima čija vrsta i intenzitet ovise o funkcionalnoj aktivnosti ostatnog VWF-a u krvi.

S obzirom na većinski udio tipa 1 u odnosu na ostale tipove VWB-a, najveći broj bolesnika ima blage simptome i znakove krvarenja. Zbog osnovnog poremećaja primarne hemostaze, glavni simptomi jesu krvarenja u sluznice i kožu, a najčešće se očituju povećanom sklonošću modricama, krvarenjima iz nosa (epistaksama), prekomjernim krvarenjima nakon manjih ozljeda, vađenja zuba ili operacijskih zahvata (npr. tonzilektomije). Kod žena se dodatno mogu javiti obilna i produljena menstrualna krvarenja (menoragija) te prekomjerno krvarenje pri porodu. Izolirana hematurija zbog krvarenja iz urogenitalnog sustava ili melena kao posljedica krvarenja iz gastrointestinalnog sustava, uz nepostojanje nekoga drugog uzročnog patofiziološkog procesa, mogu također biti posljedica VWB-a (45).

Teži i životno ugrožavajući oblici krvarenja javljaju se neizostavno kod tipa 3, kao i nekih oblika tipa 2 VWB-a. Osim izrazito niske razine VWF-a u krvi, posljedično se javlja i snižena aktivnost FVIII te dolazi i do poremećaja sekundarne hemostaze. Zbog toga bolesnici s tipom 3 VWB-a imaju simptome i znakove krvarenja slične onima kod bolesnika s hemofilijom A. Tu se ubrajaju krvarenja unutar mišića koja se očituju intramuskularnim hematomima te krvarenja u zglobove koja dovode do upalnih procesa, oticanja zglobova i ograničene pokretljivosti. Ove se komplikacije javljaju čak sedam do deset puta češće kod bolesnika s tipom 3 nego kod bolesnika s tipom 1 VWB-a. Krvarenje u središnji živčani sustav najteži je oblik krvarenja, a njegova je učestalost 20 puta veća kod bolesnika s tipom 3 VWB-a u odnosu na ostale oblike bolesti (45, 46).

U obradi bolesnika sa sumnjom na VWB najveći je izazov procjena težine krvarenja i razlikovanje fizioloških krvarenja od prekomjernih krvarenja koja zahtijevaju dodatnu pažnju i/ili liječenje. Razlog je činjenica što su simptomi krvarenja uglavnom blagi i povremeni, a doživljaj bolesnika o prekomjernom krvarenju subjektivan, što je posebno izraženo kod žena koje imaju obilna menstrualna krvarenja. Obrada pedijatrijskih bolesnika osobito je zahtjevna. S jedne strane, djeca su nakon navršene prve godine života zbog kretanja sklonija padovima i udarcima pa time i učestalijoj pojavi modrica, epistaksama i manjim ozljedama. S druge strane, postavljanje sumnje na VWB u ranoj dobi na temelju kliničke slike krvarenja otežano je ako djeca nisu doživjela nikakvu traumu koja bi uzrokovala produljeno krvarenje. U slučaju pozitivne obiteljske anamneze na VWB ključno je podvrgnuti dijete laboratorijskoj obradi na VWB neovisno o tome je li imalo simptome pojačanog krvarenja. Na taj je način moguće

pravodobno postaviti dijagnozu VWB-a i terapijski preventivno djelovati u slučaju traume ili operacijskog zahvata (45, 47, 48).

Za procjenu sklonosti prekomjernom krvarenju primjenjuju se upitnici o sklonosti krvarenju (engl. *bleeding assessment tool*, BAT) kojima se izračunava indeks krvarenja (engl. *bleeding score*, BS). U svrhu standardizacije preporučeno je korištenje validiranog ISTH-BAT bodovnog sustava koji se sastoji od niza pitanja koja se odnose na 14 vrsta krvarenja. Mogućim odgovorima dodijeljeni su bodovi od nula do četiri ovisno o težini krvarenja i potrebi za liječenjem. Bodovni zbir veći ili jednak četiri kod muškaraca, odnosno šest kod žena i tri kod djece upućuje na to da su kod bolesnika prisutni znakovi prekomjernog krvarenja (48). Provedenom metaanalizom o dijagnostičkoj točnosti BAT-a kao probirne pretrage u dijagnostici bolesnika sa sumnjom na VWB dobivena je ukupna dijagnostička osjetljivost od 75 %, dok je dijagnostička specifičnost iznosila 54 % (49). Korisnost BAT-a znatno ovisi o populaciji, pri čemu je najveća dijagnostička osjetljivost kod odraslih žena koja je u nekim istraživanjima iznosila čak i 100 % te se stoga BAT preporučuje za početni probir na VWB kod žena s prekomjernim krvarenjem. Sukladno navedenom, primjena BAT-a kao probirne pretrage u svrhu odluke o daljnjoj laboratorijskoj obradi na VWB ima ograničenja, prije svega nedovoljnu osjetljivost. Zbog toga se posebno ne preporučuje primjena kod djece zbog izostanka znakova krvarenja u ranoj dobi, kao i kod bolesnika koji imaju blagu kliničku sliku krvarenja (33).

1.7. Terapijski pristupi kod von Willebrandove bolesti

Cilj je liječenja VWB-a regulirati dvojni poremećaj hemostaze: poremećaj adhezije i agregacije trombocita na mjestu ozljede krvne žile zbog primarnog manjka funkcionalnog VWF-a i poremećaj unutarnjeg puta zgrušavanja zbog sekundarno snižene aktivnosti FVIII. Dostupno je nekoliko terapijskih mogućnosti kod bolesnika s VWB-om, a izbor ovisi o tipu VWB-a, uzročnom strukturnom i/ili funkcionalnom poremećaju VWF-a i težini krvarenja.

Dezmopresin (1-dezamino-8-D-arginin-vazopresin, DDAVP) sintetski je analog antidiuretskog hormona koji potiče otpuštanje pohranjenog VWF-a iz Weiber-Paladijevih tjelešaca endotelnih stanica u cirkulaciju. VWF se otpušta u omjeru 1 : 1 s VWFpp, a sastoji se od hemostatski najaktivnijih HMWM-ova. Prije primjene DDAVP potrebno je provesti ispitivanje učinkovitosti ovog oblika terapije kod pojedinog bolesnika. Individualni odgovor na DDAVP uobičajeno se ispituje mjerenjem aktivnosti VWF-a i FVIII prije te jedan, dva i četiri sata nakon primjene lijeka. Lijek se može primjenjivati intravenski i subkutano na način da se dozira 0,3 μg/kg tjelesne težine, a moguća je i intranazalna primjena ubrizgavanjem po 300 μg u svaku nosnicu, odnosno 150 μg kod bolesnika tjelesne težine manje od 30 kg (50, 51). Optimalan odgovor na DDAVP podrazumijeva povišenje razine VWF-a i FVIII dva do četiri puta od bazalne vrijednosti unutar 30 do 60 minuta od primjene, pri čemu bi aktivnost VWF-a trebala biti iznad 30 %. Određivanje je važno ponoviti i četiri sata nakon primjene lijeka zbog procjene poluvremena života VWF-a i njegova uklanjanja iz cirkulacije. DDAVP je učinkovit kod bolesnika s tipom 1 VWB-a koji imaju aktivnosti VWF-a i FVIII iznad 10 %, dok je kod bolesnika s tipovima 2 i 3 terapija DDAVP-om neučinkovita, a kod tipa 2B kontraindicirana zbog mogućeg pogoršanja trombocitopenije.

Nadomjesna terapija temelji se na primjeni pripravaka koji sadržavaju VWF i FVIII ili rjeđe samo VWF, a najčešće se primjenjuje preventivno, prije operacijskih zahvata ili invazivnih postupaka kod kojih postoji rizik od pojačanog krvarenja. Dugotrajna profilaksa nadomjesnom terapijom primjenjuje se kroz dulje razdoblje kod bolesnika s tipom 3 i teškim oblikom tipa 1 VWB-a (52). U Republici Hrvatskoj registrirani su sljedeći kombinirani pripravci VWF-a i FVIII: Immunate (Baxter International, Deerfield, Illinois, SAD), Fanhdi (Grifols, Barcelona, Španjolska), Haemate P (CSL Behring, King of Prussia, Pensilvanija, SAD) i Wilate (Laboratorio Varifarma SA, Buenos Aires, Argentina). Primjena nadomjesnih pripravaka VWF-a rijetko može uzrokovati stvaranja aloprotutijela (inhibitora) na VWF. Pojava inhibitora zabilježena je u 5 do 10 % bolesnika s tipom 3 VWB-a koji su homozigoti za velike delecije ili besmislene mutacije, a može dovesti do po život opasne anafilaktičke

reakcije u slučaju ponovne primjene pripravaka VWF-a. Laboratorijsko dokazivanje prisutnosti inhibitora ključno je za sprječavanje komplikacija liječenja. Temelji se na testovima miješanja kojima se dokazuje inhibicija sposobnosti VWF-a da veže trombocitni GPIb, ali sam postupak nije standardiziran, što otežava njegovu široku primjenu. Kod bolesnika kod kojih su prisutni inhibitori na VWF za zaustavljanje krvarenja primjenjuju se pripravci rekombinantnog FVIII ili rekombinantnoga aktiviranog faktora zgrušavanja VII (50, 53).

Za regulaciju krvarenja iz sluznica kod bolesnika s VWB-om koriste se antifibrinolitici (traneksamična kiselina, epsilon-aminokaproična kiselina). Obilna menstrualna krvarenja kod žena reguliraju se hormonskom nadomjesnom terapijom (50).

1.8. Laboratorijska dijagnostika von Willebrandove bolesti

Dijagnoza VWB-a zasniva se na pozitivnoj osobnoj i/ili obiteljskoj anamnezi, a potvrđuje laboratorijskom dijagnostikom. Zbog višestruke uloge VWF-a u sustavu zgrušavanja, složenosti njegove strukture, brojnih mutacija u genu za VWF i raznolikosti kliničke slike primjenjuje se složen i postupan dijagnostički pristup (37, 54).

Laboratorijske pretrage koje se koriste u dijagnostici VWB-a mogu se prema razinama podijeliti u tri skupine:

- probirne laboratorijske pretrage
- usmjerene laboratorijske pretrage
- diferencijalno-dijagnostičke pretrage.

1.8.1. Probirne laboratorijske pretrage

Probirne laboratorijske pretrage koje se koriste kao dio početne obrade bolesnika sa sumnjom na VWB uključuju niz nespecifičnih laboratorijskih pretraga kojima se ispituju značajke primarne i sekundarne hemostaze.

Od globalnih pretraga zgrušavanja, protrombinsko vrijeme (PV) uobičajeno je uredno kod bolesnika s VWB-om, dok aktivirano parcijalno troboplastinsko vrijeme (APTV) može biti produljeno zbog sekundarnog manjka FVIII, posebice kod tipa 2N i tipa 3 VWB-a gdje je taj manjak znatan. Ipak, s obzirom na to da najveći broj slučajeva VWB-a obuhvaća blage oblike, nalaz APTV-a vrlo je često uredan (5, 54, 55).

Vrijeme krvarenja po Ivy-ju je *in vivo* pretraga koja se koristi za procjenu funkcije primarne hemostaze, a označava vrijeme koje je potrebno za zaustavljanje krvarenja nakon incizije kože podlaktice pod stalnim tlakom od 40 mmHg. Produljeno vrijeme krvarenja može upozoravati na poremećaj VWF-a, ali i biti posljedica različitih poremećaja trombocita, pa čak i anemija. Zbog ručne izvedbe, invazivnosti postupka i nedovoljne dijagnostičke osjetljivosti za VWB vrijeme krvarenja više se ne preporučuje kao probirna pretraga u dijagnostici VWB-a (56).

Kvantitativno ispitivanje kapaciteta primarne hemostaze može se provesti *in vitro* na analizatoru funkcije trombocita koji mjeri vrijeme nastanka trombocitnog ugruška (engl. *closure time, CT*). Oponašanjem *in vivo* uvjeta fiziološke brzine protoka krvi u arterijama dolazi do adhezije i agregacije trombocita na kolagenskoj membrani djelovanjem trombocitnih agonista adrenalina, odnosno ADP-a. S obzirom na ključnu ulogu VWF-a u posredovanju pri procesima adhezije i agregacije trombocita na mjestu ozljede krvne žile,

dijagnostička osjetljivost ove pretrage kod VWB-a iznosi 99,3 % jer je produljeno vrijeme nastanka ugruška prisutno kod svih bolesnika s težim oblicima (tip 2A, 2B, 2M i 3). Kod tipa 1 VWB-a dijagnostička osjetljivost iznosi oko 80 % i ovisi o funkcionalnoj aktivnosti VWF-a u plazmi. Vrijeme nastanka ugruška bit će produljeno i kod drugih čimbenika koji utječu na funkciju primarne hemostaze, uključujući kvalitativne ili kvantitativne poremećaje trombocita te terapije antiagregacijskim lijekovima. Stoga je zbog gotovo 100-postotne negativne prediktivne vrijednosti za VWB najveća vrijednost ove pretrage isključenje VWB-a u slučaju urednih nalaza za vremena nastanka ugruška s oba trombocitna agonista, posebice u hitnim stanjima kada provođenje specifičnih pretraga u dijagnostici VWB-a nije odmah dostupno (55-57).

Kompletna krvna slika dio je laboratorijske obrade bolesnika sa sumnjom ili potvrđenom dijagnozom VWB-a, a služi za otkrivanje anemije koja je posljedica krvarenja te kao pomoć u diferencijalnoj dijagnostici tipa 2B VWB-a kod kojeg se može javiti trombocitopenija (55).

1.8.2. Usmjerene laboratorijske pretrage

Usmjerena laboratorijska dijagnostika VWB-a uključuje određivanje aktivnosti i koncentracije (antigena) VWF-a te aktivnosti FVIII.

1.8.2.1. Određivanje aktivnosti von Willebrandova faktora

Određivanje aktivnosti VWF-a podrazumijeva mjerenje sposobnosti vezanja VWF-a na trombocitni GPIb. Znanstveni standardizacijski odbor (engl. *Scientific Standardization Committee*, SSC) ISTH-a svrstava dostupne testove prema metodologiji u četiri osnovne kategorije (Tablica 5.) (58).

Tablica 5. Nazivlje i podjela testova za određivanje aktivnosti von Willebrandova faktora (58)

Pokrata testa	Opis testa
VWF:RCo	Ristocetin-kofaktorska aktivnost: svi testovi koji rabe trombocite i ristocetin
VWF:GPIbR	Svi testovi koji se temelje na ristocetinom potpomognutom vezanju VWF-a na rekombinantni divlji tip GPIb
VWF:GPIbM	Svi testovi koji se temelje na spontanom vezanju VWF-a na rekombinantni GPIb s mutacijama koje pojačavaju njegovu funkciju
VWF:Ab	Svi testovi koji se temelje na vezanju monoklonskog protutijela na vezno mjesto u domeni A1 VWF-a

VWF – von Willebrandov faktor; GPIb – glikoprotein Ib

Ristocetin-kofaktorska aktivnost VWF-a (VWF:RCo) obuhvaća sve testove koji rabe trombocite, bilo svježe, fiksirane u formalinu ili u obliku otopina liofiliziranih pripravaka. Načelo testa temelji se na dodatku antibiotika ristocetina koji uzrokuje konformacijsku promjenu VWF-a, pri čemu vezno mjesto na GPIb postaje dostupno za VWF, što uzrokuje agregaciju trombocita. Iako se ova metoda desetljećima smatrala zlatnim standardom za određivanje aktivnosti VWF-a, opterećena je brojnim ograničenjima. Prije svega, problem čine kratkotrajna stabilnost i različitost trombocitnih pripravaka te ručna izvedba metode s posljedičnom nepreciznosti. Također, metoda je niske analitičke osjetljivosti s nemogućnošću određivanja aktivnosti VWF-a niže od 10 % čime je onemogućena pouzdana karakterizacija bolesnika s teškim oblicima VWB-a. Zbog svega navedenog, ova se metoda smatra neprikladnom za korištenje u rutinskom radu te se u

današnje vrijeme zamjenjuje automatiziranim metodama koje se ne koriste trombocitima (55, 58).

Jedna od njih je **metoda ristocetinom potaknutog vezanja GPIb (VWF:GPIbR)** u kojoj su trombociti zamijenjeni lateks-česticama obloženim rekombinantnim divljim tipom trombocitnog GPIb. U prisutnosti ristocetina VWF iz uzorka aglutinira lateks-čestice što se mjeri turbidimetrijski. Ova metoda postoji i u izvedbi koja se koristi magnetnim česticama obloženima rekombinantnim GPIb. Nakon vezanja VWF-a iz uzorka na GPIb potaknutog ristocetinom, dodaje se monoklonsko protutijelo naspram VWF-a obilježeno izoluminolom, pri čemu dolazi do kemiluminescencije koja je proporcionalna aktivnosti VWF-a (58, 59).

Automatizirane imunoturbidimetrijske metode postoje i u izvedbi bez ristocetina, a koriste se lateks-česticama obloženima rekombinantnim GPIb koji sadržava dvije mutacije koje pojačavaju vezanje VWF-a **(VWF:GPIbM)**. Istraživanja koja su ispitivala značajke dostupnih lateks-imunoturbidimetrijskih testova za određivanje aktivnosti VWF-a pokazala su visoku preciznost i zadovoljavajuću osjetljivost mjerenja u području niskih vrijednosti. Dodatno, dokazano je visoko slaganje rezultata dobivenih različitim testovima kod bolesnika s VWB-om, što ove metode čini pogodnima i jednakovrijednima za korištenje u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici VWB-a (59, 60).

Iako postoje na tržištu, testovi koji se temelje na vezanju monoklonskog protutijela na vezno mjesto za GPIb u A1 domeni VWF-a **(VWF:Ab)** ne odražavaju izravno vezanje VWF-a na GPIb te se smatraju posrednim testovima za određivanje aktivnosti VWF-a.

1.8.2.2. Određivanje koncentracije antigena von Willebrandova faktora

Određivanje antigena von Willebrandova faktora (VWF:Ag) pretraga je kojom se određuje koncentracija glikoproteinske molekule VWF-a neovisno o njezinoj funkcionalnoj aktivnosti. U tu svrhu koriste se enzimski povezani imunosorpcijski testovi (engl. *enyzme-linked immunosorbent assay,* ELISA) ili automatizirane imunoturbidimetrijske metode koje se koriste polistirenskim kuglicama obloženima specifičnim protutijelima naspram VWF-a. Vezanjem VWF-a iz uzorka dolazi do aglutinacije i posljedičnog povećanja zamućenja reakcijske smjese, što je proporcionalno koncentraciji antigena VWF-a u uzorku (5).

1.8.2.3. Određivanje aktivnosti faktora zgrušavanja VIII

Zbog ovisnosti FVIII o razini VWF-a u cirkulaciji, određivanje aktivnosti FVIII neizostavni je dio laboratorijske obrade bolesnika sa sumnjom ili potvrđenom dijagnozom VWB-a. Oboljeli od tipa 1 ili 2 VWB-a mogu imati blago do umjereno sniženu aktivnost

FVIII, dok su aktivnosti FVIII kod bolesnika s tipom 3 VWB-a izrazito niske te odgovaraju vrijednostima bolesnika s umjerenim ili teškim oblikom hemofilije A. Aktivnost FVIII znatno je snižena i kod bolesnika s tipom 2N VWB-a zbog poremećaja vezanja FVIII na VWF i posljedične ubrzane razgradnje. Omjer aktivnosti FVIII i VWF:Ag kod svih će tipova VWB-a biti približno jedan, izuzev tipa 2N VWB-a u kojem postoji neproporcionalno sniženje aktivnosti FVIII u odnosu na VWF:Ag, uz omjer manji od 0,5 (5, 61).

Mjerenje aktivnosti FVIII može se provoditi koagulacijskim ili kromogenim metodama. Najčešće korištena, i za potrebe dijagnostike VWB-a dostatna, jest koagulacijska metoda u jednom stupnju (engl. *one-stage clotting assay*) koja se temelji na sposobnosti ispitivane plazme da korigira APTV u mješavini s FVIII-deficijentnom plazmom (aktivnost FVIII < 1 %) koja sadržava sve faktore zgrušavanja osim FVIII, pa produljenje APTV-a ovisi isključivo o aktivnosti FVIII u ispitivanom uzorku (62).

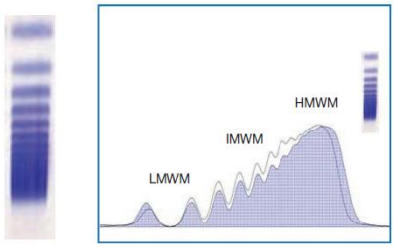
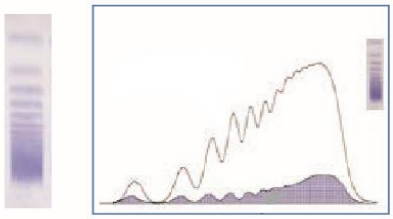
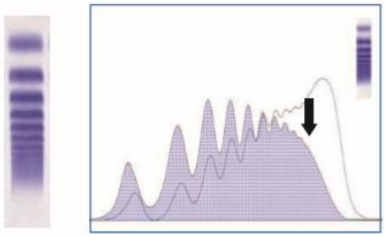
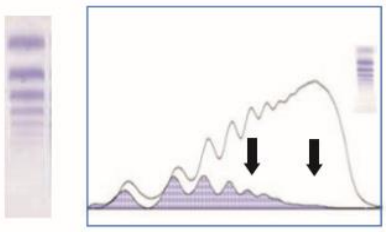
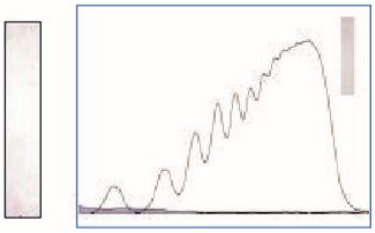
1.8.3. Diferencijalno dijagnostičke pretrage

U ovu skupinu ubrajaju se pretrage kojima se ispituju dodatna strukturna i/ili funkcionalna svojstva VWF-a, a koriste se u svrhu diferencijalne dijagnostike podtipova VWB-a.

Analiza multimera VWF-a pretraga je kojom se ispituju strukturne značajke VWF-a određivanjem raspodjele i relativnog udjela HMWM-a, IMWM-a i LMWM-a. S obzirom na povezanost hemostatske aktivnosti i udjela HMWM-a, otkrivanjem strukturnih promjena VWF-a može se razjasniti uzrok poremećaja funkcije VWF-a. Najveća je vrijednost ove pretrage u razlikovanju tipova 2A i 2B VWB kod kojih postoji manjak HMWM-a i/ili IMWM-a, od tipova 1, 2M i 2N koji imaju uglavnom urednu raspodjelu multimera uz jednakomjerno snižen intenzitet svih frakcija, ili samo blage promjene multimerne strukture i raspodjele. Jednako kao i kod ostalih diferencijalno dijagnostičkih pretraga, analiza multimera nema dijagnostičku vrijednost kod bolesnika s tipom 3 VWB-a zbog potpunog nedostatka VWF-a. Analiza multimera primjenjuje se i kod AVWS-a u kojem se uobičajeno nailazi na gubitak HMWM-a.

Praćenje promjene profila multimera, uz aktivnost VWF-a, dodatni je doprinos procjeni terapijskog odgovora bolesnika na primjenu DDAVP-a, gdje se kod optimalnog odgovora očekuje porast HMWM-a. Koristi se i u diferencijalnoj dijagnostici trombocitnih mikroangiopatija za razlikovanje trombocitne trombocitopenične purpure kod koje su prisutni UMWM od hemolitično-uremijskog sindroma kod kojeg oni izostaju. Analiza multimera VWF-a izvodi se elektroforetskim tehnikama, a najčešće se primjenjuje elektroforeza na agaroznom gelu uz imunofiksaciju sa specifičnim VWF antiserumom (20, 63, 64). Karakterističan izgled raspodjele multimera kod pojedinih tipova VWB-a prikazan je u Tablici 6.

Tablica 6. Raspodjela multimera von Willebrandova faktora kod pojedinih tipova von Willebrandove bolesti (55)

Raspodjela multimera	Izgled elferograma
Uredna raspodjela multimera s označenim multimerima male (LMWM), srednje (IMWM) i visoke (HMWM) molekularne mase u omjerima i intenzitetima jednakim kao u normalnoj plazmi	
Uredna raspodjela multimera uz jednakomjerno snižen intenzitet svih frakcija multimera; uobičajen izgled kod tipa 1, 2N i 2M VWB-a	
Promijenjena raspodjela multimera uz gubitak HMWM; uobičajen izgled kod tipa 2B VWB-a	
Promijenjena raspodjela multimera uz gubitak HMWM-a i smanjenje frakcije IMWM-a; uobičajen izgled kod tipa 2A VWB-a	
Potpuna odsutnost multimera; uobičajen izgled kod tipa 3 VWB-a	

Test vezanja kolagena (engl. *von Willebrand factor collagen binding activity,* **VWF:CB**) pretraga je kojom se ispituje dodatno svojstvo VWF-a u primarnoj hemostazi koje se odnosi na njegovu sposobnost adhezije na kolagen u subendotelu nakon ozljede krvne žile. Dostupni testovi obuhvaćaju ELISA metode i u novije vrijeme automatizirane kemiluminescentne imunokemijske metode, a temelje se na određivanju stupnja vezanja VWF-a iz uzorka bolesnika na kolagen. Sposobnost pojedinog VWF:CB testa da otkrije poremećaj vezanja VWF-a na kolagen ovisi o tipu korištenog kolagena. Najčešće izvedbe testova rabe kolagen tipa I i tipa III koji mogu biti prisutni samostalno ili u kombinaciji, a služe za ispitivanje poremećaja u veznom mjestu za kolagen unutar domene A3 VWF-a. Manji broj testova rabi kolagen tipa VI i njima se mogu otkriti oblici VWB-a kod kojih postoji poremećaj u vezanju kolagena zbog promjena u domeni A1 VWF-a. S obzirom na to da HMWM sadržavaju najveći broj veznih mjesta za kolagen, VWF:CB izravno ovisi o manjku HMWM-ova i smatra se osjetljivijim pokazateljem gubitka HMWM-ova od testova koji ispituju sposobnost vezanja VWF-a na trombocitni GPIb. Primjena ove pretrage ima najveće značenje u razlikovanju tipova 2A i 2B, kod kojih dolazi do gubitka HMWM-a, od tipa 2M VWB-a u kojem je multimerna struktura, a time i sposobnost vezanja kolagena, očuvana (56, 65). To potvrđuju i do sada provedena istraživanja koja su pokazala da se uključivanjem određivanja VWF:CB u dijagnostički algoritam VWB-a broj nepravilno klasificiranih slučajeva tipa 2M VWB-a smanjio s prethodnih čak 75 – 90 % na 30 – 45 %. Kombinacijom određivanja VWF:CB i aktivnosti koja odražava sposobnost vezanja trombocitnog GPIb te izračunom odgovarajućih omjera s VWF:Ag, kod tipa 2A i 2B dobivaju se u oba slučaja omjeri niži od 0,6. Suprotno tomu, kod tipa 2M omjer VWF:CB/VWF:Ag uobičajeno će biti veći od 0,6 uz sniženi omjer VWF:GPIb/VWF:Ag zbog smanjene sposobnosti vezanja VWF-a na trombocitni GPIb (66, 67). Ipak, manji broj slučajeva tipa 2M može biti uzrokovan i mutacijama koje dovode do poremećaja u domeni A3 i smanjenog vezanja kolagena tipa VI, a tada će VWF:CB/VWF:Ag biti snižen (2).

Test vezanja FVIII (engl. *FVIII binding assay,* **VWF:FVIIIB**) ispituje sposobnost VWF-a da veže FVIII, a izvodi se ELISA metodama. Koristi se za potvrdu dijagnoze tipa 2N VWB-a gdje se, uz sniženu aktivnost FVIII zbog ubrzane proteolitičke razgradnje, uočavaju i snižene vrijednosti VWF:FVIIIB zbog smanjenog afiniteta vezanja FVIII, a kao posljedica promjena veznog mjesta unutar područja D'-D3 VWF-a. Zbog snižene aktivnosti FVIII i blage kliničke slike krvarenja tip 2N VWB-a fenotipski se može zamijeniti s blagom hemofilijom A. Određivanjem VWF:FVIIIB i izračunom omjera s VWF:Ag omogućeno je

njihovo jednoznačno razlikovanje s obzirom na to da se kod tipa 2N VWB-a nalazi neproporcionalno snižena aktivnost VWF:FVIIIB u odnosu na VWF:Ag uz omjer < 0,6, dok je kod hemofilije A njihov omjer uredan zbog očuvane sposobnosti vezanja FVIII na VWF (68).

Agregacija trombocita potaknuta ristocetinom (engl. *ristocetin-induced platelet aggregation,* **RIPA**) koristi se za ispitivanje međusobne interakcije trombocitnog kompleksa GPIb/IX/V i VWF-a. Ristocetin djeluje kao sredstvo koje potiče agregaciju trombocita u plazmi bogatoj trombocitima (broj trombocita u rasponu od 150 do 600 x 10^9/L). Stupanj agregacije trombocita najčešće se mjeri optičkom metodom kojom se određuje porast transmisije svjetla kroz reakcijsku kivetu zbog potaknutog stvaranja agregata trombocita. RIPA se uobičajeno izvodi s ristocetinom koncentracije 1,2 mg/mL, a u slučaju urednog nalaza analizu je potrebno ponoviti s nižom koncentracijom (0,5 – 0,7 mg/mL). Trombociti zdrave osobe daju dvofaznu krivulju s ristocetinom 1,2 mg/mL, dok kod snižene razine VWF-a agregacija trombocita izostaje. Izostanak odgovora na ristocetin koncentracije 1,2 mg/mL upućuje na poremećaj VWF-a ili trombocitnog kompleksa GPIb/IX/V. Jedino će kod tipa 2B VWB-a agregacija trombocita potaknuta ristocetinom biti prisutna kod niske i visoke koncentracije ristocetina zbog poremećaja koji uzrokuje pojačano vezanje VWF-a na trombocitni GPIb. Stoga je najveća vrijednost ove pretrage upravo u diferencijalnoj dijagnostici VWB-a u smislu razlikovanja tipa 2B od ostalih tipova VWB-a (69, 70).

Izračun omjera između pretraga aktivnosti VWF-a koje se primjenjuju u dijagnostici VWB-a i VWF:Ag praktičan je pristup koji omogućava početno razlikovanje kvantitativnog tipa 1 od kvalitativnih tipova 2 VWB-a te služi usmjeravanju daljnje diferencijalne dijagnostike. Kao granična vrijednost najčešće se uzima 0,6 iako sukladno literaturnom izvoru može varirati od 0,5 do 0,7 (56, 68).

Kod tipa 1 VWB-a prisutna je snižena koncentracija potpuno funkcionalnog VWF-a te će dovesti do jednakomjernog sniženja kako aktivnosti tako i antigena VWF-a, pa je njihov omjer uobičajeno oko 1. Za tip 3 VWB-a ovaj pristup nije primjenjiv niti potreban zbog potpune odsutnosti VWF-a i uglavnom nemjerljivo sniženih vrijednosti aktivnosti i antigena VWF-a (33).

Tip 2 VWB-a obuhvaća različite strukturne i funkcionalne poremećaje VWF-a, što se očituje neproporcionalno sniženim rezultatima pretraga aktivnosti VWF-a u odnosu na VWF:Ag i omjerima ispod 0,6. Kod tipa 2A zbog gubitka HMWM-a i/ili IMWM-a i smanjenog broja veznih mjesta za GPIb i kolagen, omjeri VWF:GPIb/VWF:Ag i

VWF:CB/VWF:Ag bit će znatno niži od 0,6. Sniženi omjeri uočavaju se i kod tipa 2B zbog gubitka HMWM-a, premda su uobičajeno manje sniženi nego kod tipa 2A. Tip 2M uzrokovan je najčešće smanjenim vezanjem GPIb pa će omjer koji proizlazi iz rezultata pretrage koja mjeri sposobnost vezanja GPIb biti znatno niži od onog koji uključuje VWF:CB. Ipak, postoje i oblici tipa 2M kod kojih se javlja poremećaj vezanja kolagena i u tom će slučaju omjer VWF:CB/VWF:Ag biti znatnije snižen.

Snižen omjer FVIII/VWF:Ag omogućava razlikovanje tipa 2N od ostalih podtipova tipa 2 VWB-a (33, 56, 68).

Tablica 7. prikazuje karakteristične laboratorijske nalaze prema pojedinom tipu VWB-a, a Slika 3. prikazuje dijagnostički algoritam VWB-a.

Tablica 7. Karakteristični laboratorijski nalazi prema tipu von Willebrandove bolesti (prilagođeno prema 56,68)

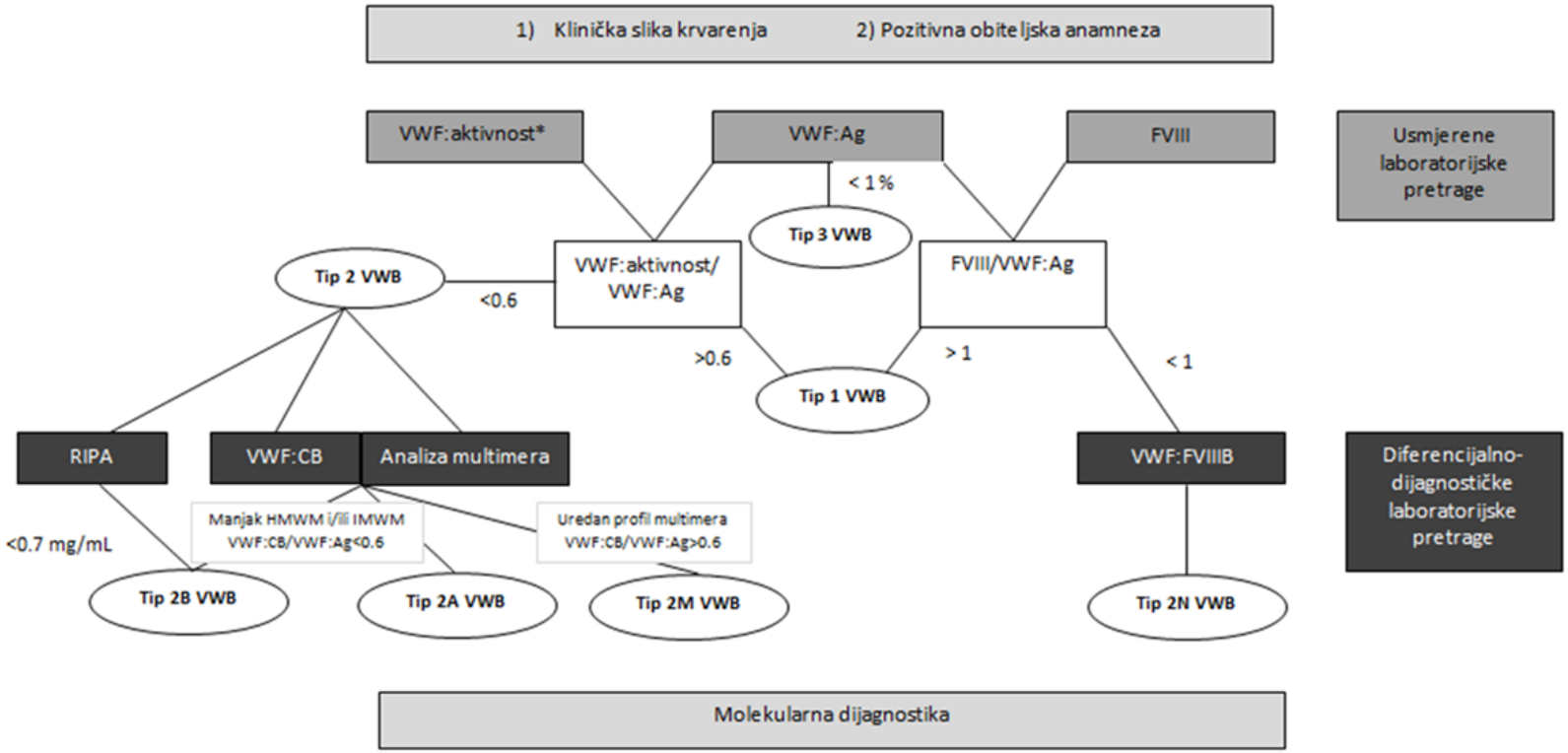
Laboratorijska pretraga	Tip von Willebrandove bolesti					
	1	2A	2B	2M	2N	3
PV	Uredno	Uredno	Uredno	Uredno	Uredno	Uredno
APTV	Uredno / Produljeno	Uredno / Produljeno	Uredno / Produljeno	Uredno / Produljeno	Uredno / Produljeno	Produljeno
Broj trombocita	Uredan	Uredan	Snižen / uredan	Uredan	Uredan	Uredan
Vrijeme nastanka ugruška na uređaju PFA	Uredno / produljeno	Produljeno / nemjerljivo	Produljeno / nemjerljivo	Produljeno / nemjerljivo	Uredno	Produljeno / nemjerljivo
VWF:aktivnost*	Snižena / uredna	Snižena (< 30 %)	Snižena / u rijetkim slučajevima uredna	Snižena / uredna	Uredna / snižena	Izrazito snižena / nemjerljivo niska (< 5 %)
VWF:Ag	Snižen / uredan	Snižen / uredan	Snižen / uredan	Snižen / uredan	Uredan / snižen	Izrazito snižen / nemjerljivo nizak (< 5 %)
FVIII	Snižena / uredna	Snižena / uredna	Snižena / uredna	Snižena / uredna	Snižena	Snižena (< 20 %)
VWF:CB	Snižena / uredna	Snižena (< 15 %)	Snižena (< 40 %)	Snižen / uredan	Uredan / snižen	Izrazito snižena / nemjerljivo niska (< 5 %)

Tablica 7. (nastavak) Karakteristični laboratorijski nalazi prema tipu von Willebrandove bolesti

Laboratorijska pretraga	Tip von Willebrandove bolesti					
	1	**2A**	**2B**	**2M**	**2N**	**3**
Omjer VWF:aktivnost*/VWF:Ag	> 0,6	< 0,6	< 0,6	< 0,6 (poremećaj vezanja GPIb) ili > 0,6 (poremećaj vezanja kolagena)	> 0,6	Nije primjenjivo
Omjer VWF:CB/VWF:Ag	> 0,6	< 0,6	< 0,6	< 0,6 (poremećaj vezanja kolagena) ili > 0,6 (poremećaj vezanja GPIb)	> 0,6	Nije primjenjivo
Omjer FVIII/VWF:Ag	> 0,6	> 0,6	> 0,6	> 0,6	< 0,6	Nije primjenjivo
Raspodjela multimera	Uredna uz snižen intenzitet svih frakcija	↓HMWM i/ili IMWM	↓HMWM	Uredna, uz manje promjene raspodjele	Uredna	Odsutna

*označava aktivnost VWF-a dobivenu bilo kojim testom koji se temelji na sposobnosti vezanja GPIb (VWF:RCo, VWF:GPIbR, VWF:GPIbM ili VWF:Ab)

PV – protrombinsko vrijeme; APTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme; VWF – von Willebrandov faktor; VWF:CB: test sposobnosti vezanja kolagena; VWF: Ag – antigen von Willebrandova faktora; FVIII – aktivnost faktora zgrušavanja VIII; GPIb – trombocitni glikoprotein Ib; HMWM – visokomolekularni multimeri; IMWM – srednjemolekularni multimeri; PFA (engl. *Platelet function analyzer*) – uređaj za ispitivanje kapaciteta primarne hemostaze mjerenjem vremena nastanka ugruška uz prisutnost kolagena i agonista trombocita (adenozin-difosfata i adrenalina)



Slika 3. Dijagnostički algoritam von Willebrandove bolesti (55)

*označava aktivnost VWF-a dobivenu bilo kojim testom koji se temelji na sposobnosti vezanja GPIb (VWF:RCo, VWF:GPIbR, VWF:GPIbM ili VWF:Ab)

VWF: Ag: antigen von Willebrandova faktora; FVIII: aktivnost faktora zgrušavanja VIII; RIPA: ristocetinom potaknuta agregacija trombocita; VWF:CB: test vezanja kolagena; VWF:FVIIIB: test vezanja FVIII; HMWM: visokomolekularni multimeri; IMWM: srednjemolekularni multimeri

1.8.4. Predanalitički i biološki čimbenici u dijagnostici von Willebrandove bolesti

Za pravilno izvođenje i interpretaciju rezultata koagulacijskih pretraga koje se koriste u dijagnostici VWB-a ključno je poštovati predanalitičke zahtjeve za obradu uzoraka te poznavati biološke čimbenike koji su uzrokom varijabilnosti rezultata koagulacijskih pretraga (71).

VWF je reaktant akutne faze čija koncentracija raste pod djelovanjem proupalnih citokina interleukina-1β, interleukina-6, interleukina-8 i tumor-nekrotizirajućeg faktora α. Djelovanjem citokina dolazi do pojačanog otpuštanja VWF-a iz endotelnih stanica te inhibicije razgradnje VWF-a proteazom ADAMTS-13 (72). Povišene vrijednosti VWF-a u upalnim stanjima mogu prikriti manjak VWF-a, posebice kod blagih oblika bolesti, te se dijagnostička obrada bolesnika na VWB ne bi trebala provoditi tijekom akutnih upalnih stanja. Trudnoća je hiperkoagulabilno stanje koje također karakterizira porast VWF-a te se stoga VWB nikad ne dijagnosticira u trudnoći, a sličan učinak uočava se i kod bolesnica koje uzimaju oralne kontraceptive na bazi estrogena. Prolazno povišene vrijednosti VWF-a javljaju se u stanjima stresa i pojačane tjelesne aktivnosti zbog endogenog otpuštanja adrenalina. Stoga je prije uzorkovanja krvi za potrebe laboratorijske dijagnostike VWB-a ključno izbjegavati tjelesnu aktivnost barem dva sata te mirovati najmanje pet minuta prije vađenja krvi (54).

Razina VWF-a raste s dobi i procjenjuje se da u odraslih osoba raste 1 – 2 % po godini. Uzročni mehanizam nije u potpunosti razjašnjen, no smatra se da se to događa zbog smanjene učinkovitosti uklanjanja VWF-a iz cirkulacije (73).

Koncentracija VWF-a u plazmi fiziološki se razlikuje ovisno o krvnoj grupi AB0. Razlog tomu je izražaj ekspresija ABH antigena krvnog sustava AB0 na površini VWF-a. Oligosaharidni antigeni izraženi su na N-vezanom oligosaharidnom lancu unutar domene A1 VWF-a koja sadržava vezno mjesto za GPIb. Kod osoba krvne grupe 0 ne dolazi do glikozilacije H antigena, što VWF čini podložnijim razgradnji posredovanoj proteazom ADAMTS-13. Stoga je poluvrijeme života VWF-a kod osoba krvne grupe 0 oko 40 % kraće, a koncentracija VWF-a oko 25 % niža u odnosu na ostale krvne grupe. Epidemiološka su istraživanja pokazala da je krvna grupa 0 najviše zastupljena među bolesnicima s tipom 1 VWB-a, dok kod ostalih tipova VWB-a to nije uočeno (73, 74).

Zbog svega navedenog uputno je za postavljanje dijagnoze blagog oblika tipa 1 VWB-a potvrditi snižene vrijednosti VWF-a u dva neovisna uzorkovanja (54).

Krv za koagulacijske pretrage uzorkuje se u epruvetu koja sadržava puferirani 3,2-postotni trinatrijev citrat kao antikoagulans, pri čemu mora biti zadovoljen omjer krvi i antikoagulansa koji iznosi 9 : 1. Uzorci se dostavljaju na sobnoj temperaturi (15 – 25 ^{o}C) jer smrzavanje uzoraka pune krvi prije centrifugiranja može uzrokovati lažno snižene vrijednosti FVIII i VWF. Analize se provode iz plazme siromašne trombocitima (< 1 x 10^{9}/L) koja se dobiva dvostrukim centrifugiranjem pri brzini od 4000 okretaja u minuti tijekom 15 minuta. To je posebno važno ako se uzorci zamrzavaju jer u slučaju prisutnosti većeg broja ostatnih trombocita pri odmrzavanju dolazi do razaranja trombocita i otpuštanja proteaza, što posljedično može dovesti do narušavanja multimerne strukture i gubitka funkcionalne aktivnosti VWF-a. Preporuka je da se analize provedu unutar dva sata od uzorkovanja krvi, a ako to nije izvedivo, uzorci plazme zamrzavaju se na -70 ^{o}C ili nižim temperaturama. Odmrzavanje se provodi u vodenoj kupelji na 37 ^{o}C kako bi se osigurala intaktnost multimerne strukture (54).

1.8.5. Molekularna dijagnostika von Willebrandove bolesti

Dijagnoza i podjela VWB-a temelji se na rezultatima koagulacijskih pretraga, dok molekularna dijagnostika još uvijek nije dio rutinskoga laboratorijskog postupnika za VWB. Određivanje genske osnove VWB-a za sada se primjenjuje u prenatalnoj i preimplantacijskoj dijagnostici za utvrđivanje nositelja genskih promjena kod članova obitelji oboljelih od teških oblika VWB-a u svrhu genetičkog savjetovanja te kod oboljelih od tipa 3 VWB-a za utvrđivanje uzročnih genskih promjena koje mogu biti rizični čimbenik za razvoj aloantitijela na VWF.

Molekularna dijagnostika VWB-a zahtjevna je zbog veličine gena za VWF, brojnih mutacija koje su rasprostranjene duž čitavog gena, uključujući svih 52 egzona i intronska područja, te različitih obrazaca nasljeđivanja. Dodatno, molekularnu dijagnostiku otežava postojanje parcijalnog pseudogena na kromosomu 22 koji pokazuje 97-postotnu homologiju s područjem od egzona 23 do 34 gena za VWF. O tome treba voditi računa prilikom osmišljavanja početnica za reakciju lančane polimeraze (engl. *polymerase chain reaction,* PCR) kako bi se specifično umnožile samo regije gena za VWF (41).

U svrhu otkrivanja mutacija kod bolesnika s VWB-a moguće je primijeniti nekoliko pristupa. Ciljano sekvenciranje metodom po Sangeru korisno je za utvrđivanje genetičke osnove kod bolesnika s jasnom kliničkom i laboratorijskom slikom tipova 2 VWB-a jer su mutacije ograničene na određene regije gena za VWF. Sekvenciranje čitavog gena nužno je za utvrđivanje mutacija kod bolesnika s tipom 1 i tipom 3 VWB-a. Metoda izbora kojom je omogućeno sekvenciranje čitavog gena tijekom jedne analize u znatno kraćem vremenskom roku jest sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing,* NGS). S obzirom na učestalo preklapanje kliničke slike i izrazitu varijabilnost laboratorijskih nalaza, NGS analizu čitavog gena za VWF uputno je provoditi i za utvrđivanje mutacija kod tipova 2 VWB-a. Ovom tehnologijom moguće je istodobno sekvencirati i više različitih gena. U dijagnostici VWB-a korisno je, osim gena za VWF, sekvencirati gen za FVIII u diferencijalnoj dijagnostici VWB-a od blage hemofilije A te gen za GPIb za razlikovanje tipa 2B od pseudo-VWB-a koji se očituje istom kliničkom slikom i laboratorijskim fenotipom, ali je uzrokovan mutacijama u genu za GPIb. Analiza podataka dobivenih NGS metodom provodi se primjenom bioinformatičkih alata koji predviđaju patogenost utvrđenih genskih varijanti (38, 39, 41).

NGS tehnologija pouzdano može otkriti mutacije pogrešnog smisla, besmislene mutacije te male delecije i insercije, dok delecije ili duplikacije čitavih egzona nije moguće

detektirati. Razlog je tomu to što ova metoda za osnovu ima umnažanje reakcijom PCR-a. Kod heterozigotnih delecija doći će do urednog umnažanja alela divljeg tipa i produkt PCR reakcije bit će prisutan, dok kod homozigota jednostavno neće doći do umnažanja nepostojećeg dijela gena i taj će dio biti preskočen pri procesu sekvenciranja. Za razliku od toga, prisutnost duplikacija uzrokovat će stvaranje više produkata umnažanja gena, ali s obzirom na uredan slijed nukleotida takva promjena neće biti uočena analizom sirovih rezultata sekvenciranja tehnologijom NGS-a. Stoga je kod bolesnika koji imaju jasni fenotip VWB-a, a tehnologijom NGS-a nisu utvrđene mutacije, potrebno provesti dodatnu analizu metodom višestrukog umnažanja vezanih sondi (engl. *multiplex ligation-dependent probe amplification,* MLPA). Ova metoda rabi specifične sonde koje se vežu na ciljne regije gena, a do umnažanja tijekom PCR reakcije doći će samo ako se dogodilo komplementarno vezanje sondi (41). Na temelju omjera jačine signala svake sonde u ispitivanom uzorku u odnosu na referentni uzorak s urednim brojem kopija analiziranog gena određuje se omjer koji upućuje postoji li promjena broja kopija egzona.

1.9. Razlikovanje von Willebrandove bolesti i blage hemofilije A

Hemofilija A nasljedni je poremećaj zgrušavanja uzrokovan mutacijama u genu za FVIII, a uzrokuje ga djelomični ili potpuni manjak FVIII u cirkulaciji. FVIII je kodiran genom veličine 186 kb koji se sastoji od 26 egzona, a nalazi na kraju dugog kraka X-kromosoma (Xq28). Hemofilija A nasljeđuje se X-vezano recesivno, a do danas je otkriveno više od 2000 različitih mutacija u genu za FVIII (75, 76). Prenose je žene, a obolijevaju muška djeca koja naslijeđuju X-kromosom s mutiranim genom za FVIII od majke. Oboljeli od hemofilije A sinovima prenose Y-kromosom te su oni stoga zdravi, dok kćeri nasljeđuju X-kromosom i postaju heterozigotne nositeljice bolesti (75).

Hemofilija A se na temelju ostatne aktivnosti FVIII u cirkulaciji dijeli na teški (FVIII < 1 %), umjereni (FVIII od 1 do 5 %) i blagi oblik (FVIII od 5 do 40 %) (76). Najčešća uzročna mutacija koja se javlja u 30 % svih bolesnika s hemofilijom A i 50 % slučajeva teškog oblika inverzija je introna 22. Male delecije i insercije uzrok su hemofilije A u 10 %, dok velike delecije i greške prekrajanja u 3 % slučajeva. Točkaste mutacije u genu za FVIII prisutne su kod 56 % bolesnika s hemofilijom A, mogu biti rasprostranjene duž čitavog gena za FVIII, uključujući egzone i intronske regije, a uzrokuju pretežno umjereni i blagi oblik bolesti (75).

Teški oblici bolesti klinički se očituju spontanim krvarenjima u zglobove i mišiće, dok se kod umjerenih oblika obilna krvarenja javljaju pri minimalnim traumama. Blagi oblici bolesti očituju se produljenim krvarenjima kod većih ozljeda i tijekom kirurških zahvata, slično kao i VWB (77). Osim slične kliničke slike krvarenja, zbog ovisnosti aktivnosti FVIII o koncentraciji te očuvanosti strukture i funkcije VWF-a, rezultati koagulacijskih pretraga mogu se preklapati kod bolesnika s VWB-om i blagom hemofilijom A. Zbog toga je razlikovanje ovih poremećaja isključivo na temelju fenotipskih obilježja otežano. To se posebno odnosi na razlikovanje blage hemofilije A i tipa 2N VWB-a zbog sniženih aktivnosti FVIII u oba slučaja, iako su zabilježeni i slučajevi zamjene tipa 1 VWB-a s blagom hemofilijom A (75). Boylan i sur. (78) u svom su istraživanju pokazali da određeni broj bolesnika s blagom hemofilijom A može imati i snižen VWF:Ag, što dodatno doprinosi kliničkoj slici krvarenja i unosi dvojbe oko pravilne dijagnoze. Dodatni je izazov pravilna identifikacija nositeljica hemofilije A među bolesnicama s produljenim krvarenjima. Plug i sur. (79) uspoređivali su aktivnosti FVIII i simptome krvarenja između nositeljica hemofilije A i zdravih ispitanica te dokazali da se kod nositeljica hemofilije A mogu javiti izrazito varijabilne aktivnosti FVIII (medijan 60 %; raspon od 5 do 219 %). Također su kod nositeljica hemofilije A prisutna

pojačana krvarenja u odnosu na zdrave žene, a najčešća tegoba jest menoragija (77, 79) koja je istodobno i jedan od najučestalijih, a ponekad i jedini simptom pojačanog krvarenja kod žena s VWB-om. U nedostatku poznate obiteljske anamneze na blagu hemofiliju A, a na temelju slične kliničke slike krvarenja i rezultata koagulacijskih pretraga, nije moguće uvijek jednoznačno razlikovati oboljele ili nositeljice blage hemofilije A od VWB-a. S obzirom na to da se radi o poremećajima koji se razlikuju po genetičkoj osnovi i načinu nasljeđivanja, a primarno je prisutan manjak različitih čimbenika u sustavu zgrušavanja, diferencijalno dijagnostičko razlučivanje blage hemofilije A od VWB-a ključno je za pravilnu skrb i liječenje bolesnika, kao i za odgovarajući pristup u genetičkom savjetovanju.

Istodobno sekvenciranje gena za VWF i FVIII tehnologijom NGS u nekoliko se istraživanja pokazalo učinkovitim pristupom koji omogućuje otkrivanje genske osnove poremećaja zgrušavanja i time jednoznačno postavljanje pravilne dijagnoze (75, 78).

2. OBRAZLOŽENJE TEME I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

VWB je klinički, laboratorijski i genetički vrlo heterogen poremećaj. U Republici Hrvatskoj postavljanje dijagnoze VWB-a danas se još uvijek temelji isključivo na kliničkoj slici krvarenja, pozitivnoj obiteljskoj anamnezi te rezultatima određivanja aktivnosti VWF-a, VWF:Ag i FVIII. Zbog višestruke uloge VWF-a u sustavu zgrušavanja, veličine i složenosti njegove strukture, brojnih mutacija koje se mogu naći duž čitavog gena za VWF s potencijalno različitim učinkom na težinu krvarenja i rezultate koagulacijskih pretraga, kao i ovisnosti razine VWF-a o krvnoj grupi AB0, dobi, stresu i upali, navedeni je pristup nedostatan. Navedenim fenotipskim pristupom ne dobiva se potpuni uvid u funkcionalne i strukturne poremećaje VWF-a te nije uvijek moguće jednoznačno postaviti dijagnozu VWB-a i razlikovati pojedine tipove bolesti. Dodatno, zbog kliničke fenotipske sličnosti VWB-a i blage hemofilije A postoji znatan problem postavljanja točne medicinske dijagnoze ovih dvaju različitih poremećaja zgrušavanja, što ima utjecaj na praćenje i pravilno liječenje bolesnika.

Ovo istraživanje osmišljeno je s ciljem da se primjenom cjelovitog postupnika dijagnostike VWB-a koji uključuje probirne i specifične koagulacijske pretrage te molekularnu analizu svih sljednih varijanti u genima za VWF i FVIII suvremenom tehnologijom NGS omogući postavljanje točne dijagnoze tipa VWB-a te jednoznačno razlikovanje nejasnih fenotipova između VWB-a i blage hemofilije A. Izabrana skupina ispitanika obuhvatila je bolesnike kojima je ranije postavljena dijagnoza VWB-a, bolesnike nejasnih fenotipova između VWB-a i blage hemofilije A, kao i članove obitelji bolesnika koji imaju znakove i simptome pojačanog krvarenja.

Hipoteza ovog istraživanja bila je da istodobno određivanje genskih varijanti gena za VWF i FVIII sekvenciranjem svih 52 odnosno 26 egzona, bočnih intronskih regija te promotorskih regija gena za VWF i FVIII, uz dodatno ciljano pretraživanje duplikacija i delecija te specifične koagulacijske pretrage omogućava jednoznačno postavljanje dijagnoze VWB-a i diferencijalno dijagnostičko razlučivanje od blage hemofilije A.

U ovom je istraživanju po prvi put u populaciji Republike Hrvatske utvrđena pojavnost pojedinih genskih varijanti gena za VWF i FVIII koje pridonose razvoju specifičnih obilježja VWB-a i procijenjeno njihovo diferencijalno-dijagnostičko značenje u razlikovanju VWB-a i blage hemofilije A. S obzirom na nedostatnost sličnih istraživanja u populacijama ovog geografskog područja te značajnu poddijagnosticiranost VWB-a, utvrđivanje pojavnosti

specifičnih mutacija u genima za VWF i FVIII u izabranoj skupini bolesnika s VWB-a i poremećajima krvarenja nejasnih fenotipskih obilježja pridonosi boljem razumijevanju molekulsko-patofizioloških procesa koji su u podlozi ovakvih poremećaja krvarenja te posljedično unaprijeđuje njihovu diferencijalnu dijagnostiku i terapiju.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja jesu:

1. Ispitati vrstu, raspodjelu i učestalost mutacija u genu za VWF i FVIII kod bolesnika s dijagnozom VWB-a i nejasnim fenotipovima između VWB-a i blage hemofilije A u Republici Hrvatskoj na temelju rezultata sekvenciranja tehnologijom NGS-a.
2. Usporediti rezultate genetičke analize tehnologijom NGS-a s rezultatima laboratorijskih pretraga u dijagnostici VWB-a te anamnestičkim i kliničkim podacima.
3. Pravilno klasificirati bolesnike s VWB-a na temelju genetičke analize.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici i uzorci

U istraživanje je bilo uključeno 83 ispitanika kako slijedi: bolesnici s poremećajima krvarenja kojima je na temelju kliničke slike i ranije laboratorijske obrade postavljena dijagnoza VWB-a, bolesnici nejasnih fenotipova između VWB-a i blage hemofilije A, te članovi obitelji bolesnika koji su imali znakove i simptome pojačanog krvarenja. U istraživanje su uključeni pedijatrijski i odrasli bolesnici neovisno o dobi, spolu, vremenu postavljanja dijagnoze ili načinu liječenja.

Ovo presječno istraživanje provedeno je u razdoblju od siječnja 2020. do svibnja 2021. godine. Pedijatrijski su ispitanici u istraživanje uključeni tijekom redovnih pregleda u ambulanti Zavoda za pedijatrijsku hematologiju, onkologiju i transplantaciju krvotvornih matičnih stanica Klinike za pedijatriju Kliničkoga bolničkog centra Zagreb, a odrasli pri pregledu u ambulanti Odjela za hemostazu i trombozu te benigne bolesti krvotvornog sustava Zavoda za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkoga bolničkog centra Zagreb.

Pregled je uključivao iscrpnu osobnu i obiteljsku anamnezu krvarenja i pregled medicinske dokumentacije, a prikupljeni su podaci o dobi, spolu, vrstama krvarenja, primjenjivanoj terapiji te o krvnoj grupi AB0.

Za potrebe laboratorijskih analiza svakom su ispitaniku uzorkovane dvije epruvete krvi s 3,2-postotnim trinatrijevim citratom (0,105-0,109 M) kao antikoagulantom volumena 2,7 mL ili 4,5 mL. Plazma siromašna trombocitima dobivena je dvostrukim centrifugiranjem 15 minuta na 4000 okretaja/min. Za pretrage iz plazme koje nisu provedene unutar istog dana uzorci plazme zamrznuti su na -80 ^{o}C do analize. Laboratorijske analize provedene su u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb.

Svi ispitanici potpisali su informirani pristanak o sudjelovanju u istraživanju. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkoga bolničkog centra Zagreb (klasa: 8.1-19/293-2; broj: 02/21 AG) te Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (klasa: 643-02/20-01/02; ur. broj: 251-62-03-20-13).

4.2. Metode

4.2.1. Koagulacijske pretrage

4.2.1.1. Broj trombocita

Broj trombocita određen je u uzorcima pune citratne krvi unutar dva sata od uzorkovanja na hematološkom analizatoru Sysmex XN-10 (Sysmex, Kobe, Japan) metodom impedancije. Konačan broj trombocita dobiven je množenjem izmjerenog broja trombocita na hematološkom analizatoru s faktorom 1,1, a radi uklanjanja učinka razrjeđenja zbog analize iz epruvete s tekućim antikaogulantom 3,2-postotnim trinatrijevim citratom.

4.2.1.2. Kapacitet primarne hemostaze

Kapacitet primarne hemostaze određen je u uzorcima pune krvi unutar dva sata od uzorkovanja na uređaju PFA-200 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka) pomoću jednokratnih test-kazeta koje sadržavaju membranu obloženu kombinacijom trombocitnih agonista: kolagena i adrenalina (COL/EPI) te kolagena i ADP-a (COL/ADP). Puna citratna krv aspirira se kod stalnog konstantnog tlaka na membranu, a djelovanjem agonista trombocita i fiziološke brzine protoka krvi dolazi do adhezije, aktivacije i agregacije trombocita te stvaranja trombocitnog ugruška koji prekriva otvor u membrani pritom zaustavljajući protok krvi. Vrijeme potrebno za zaustavljanje protoka mjeri se u sekundama (55).

4.2.1.3. Probirne koagulacijske pretrage

U uzorcima plazme siromašne trombocitima određeni su PV i APTV koagulometrijskim metodama na automatiziranom koagulacijskom uređaju s optičkom detekcijom Sysmex CS-5100 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka). Za određivanje PV-a korišten je rekombinantni tromboplastin Dade Innovin, a rezultati su izraženi kao PV-udjel očitani iz kalibracijske krivulje dobivene pomoću kalibracijskih plazmi PT Multi Calibrator (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka). Za određivanje APTV-a korišteni su reagensi Actin FS i 25 mM $CaCl_2$ (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka), a rezultati su izraženi u sekundama. U svrhu unutarnje kontrole kvalitete korištene su komercijalno dostupne kontrolne plazme Control Plasma N, Control Plasma P i Ci-Trol 2 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka).

4.2.1.4. Određivanje aktivnosti von Willebrandova faktora

Aktivnost VWF-a određena je automatiziranom lateks-imunoturbidimetrijskom metodom koja rabi lateks-čestice i mutirani oblik rekombinantnog GPIb s dvije mutacije (p.Gly233Val, p.Met239Val) koje pojačavaju vezanje VWF-a bez potrebe za ristocetinom (VWF:GPIbM). Analiza je provedena na automatiziranom koagulacijskom analizatoru Atellica COAG 360 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka) pomoću trokomponentnog reagensa INNOVANCE VWF Ac (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka). Reagens sadržava polistirenske lateks-čestice obložene protutijelima na GPIb. Dodatkom rekombinantnog GPIb s dvije pojačivačke mutacije (GPIbM) dolazi do njegova vezanja na VWF iz uzorka te vezanja nastalog kompleksa na površinu lateks-čestica, pri čemu dolazi do aglutinacije što se mjeri kao povećanje zamućenja reakcijske otopine. Promjena zamućenja proporcionalna je aktivnosti VWF-a koja se očitava iz prethodno izrađene kalibracijske krivulje koja označava odnos vremena potrebnog za postizanje određenog zamućenja i pripadajuće aktivnosti VWF-a izražene kao postotak normalne vrijednosti (%). Prije analize uzoraka provedena je unutarnja kontrola kvalitete pomoću komercijalno dostupnih kontrolnih uzoraka Control Plasma N i Control Plasma P (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka).

4.2.1.5. Određivanje koncentracije antigena von Willebrandova faktora

VWF:Ag određen je automatiziranom lateks-imunoturbidimetrijskom metodom na automatiziranom koagulacijskom analizatoru Atellica COAG 360 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka) pomoću trokomponentnog reagensa VWF Ag (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka). Reagens sadržava polistirenske lateks-čestice obložene antitijelima naspram VWF-a. Dodatkom plazme bolesnika dolazi do vezanja VWF-a iz uzorka na površinu lateks-čestica pri čemu dolazi do zamućenja reakcijske smjese. Povećanje zamućenja izravno je razmjerno koncentraciji VWF-a u uzorku, a očitava se iz prethodno izrađene kalibracijske krivulje koja označava odnos vremena potrebnog za postizanje određenog zamućenja i pripadajuće koncentracije VWF-a izražene kao postotak normalne vrijednosti (%). Prije analize uzoraka provedena je unutarnja kontrola kvalitete pomoću komercijalno dostupnih kontrolnih uzoraka Control Plasma N i Control Plasma P (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka).

4.2.1.6. Određivanje aktivnosti faktora zgrušavanja VIII

Za određivanje aktivnosti FVIII korištena je koagulacijska metoda u jednom stupnju na automatiziranom koagulacijskom analizatoru Atellica COAG 360 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka) koja se temelji na određivanju APTV-a u mješavini bolesnikove i FVIII-deficijentne plazme. Reagensi korišteni za potrebe određivanja aktivnosti FVIII jesu deficijentna plazma za FVIII, Actin FS i 25 mM $CaCl_2$ (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka). S obzirom na to da FVIII-deficijentna plazma sadržava sve faktore zgrušavanja osim FVIII (< 1 %), vrijeme nastanka ugruška ovisi isključivo o aktivnosti FVIII u ispitivanom uzorku. Na temelju izmjerenih sekundi rezultat se očitava iz prethodno izrađene kalibracijske krivulje koja označava odnos izmjerenih sekundi i pripadajućih aktivnosti FVIII (%). Prije analize uzoraka provedena je unutarnja kontrola kvalitete pomoću komercijalno dostupnih kontrolnih uzoraka Control Plasma N i Control Plasma P (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka).

4.2.1.7. Test vezanja kolagena

Određivanje stupnja sposobnosti VWF-a da veže kolagen (VWF:CB) provedeno je ELISA metodom pomoću komercijalno dostupnog kompleta reagensa TECHNOZYM VWF:CB (Technoclone, Beč, Austrija). Dodatkom uzorka dolazi do vezanja VWF-a za ljudski kolagen tipa III kojim su obložene jažice mikrotitarske pločice. Nakon ispiranja dodaje se poliklonsko antitijelo obilježeno peroksidazom koje se veže za VWF. Nakon inkubacije i ispiranja suviška nevezanih antitijela dodaje se kromogeni supstrat tetrametilbenzidin, pri čemu se razvija plavo obojenje. Reakcija se zaustavlja dodatkom 0,45 M sumporne kiseline pri čemu nastaje žuto obojenje čiji je intenzitet proporcionalan VWF:CB, a izmjeren je fotometrijski na 450 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Ortenberg, Njemačka). Iz dobivenih vrijednosti očitanja u mA konačan rezultat VWF:CB (%) očitava se iz kalibracijske krivulje koja se izrađuje za svaku seriju uzoraka pomoću kalibratora s definiranim VWF:CB vrijednostima.

4.2.1.8. Izračun omjera

Iz izmjerenih vrijednosti koagulacijskih pretraga izračunani su sljedeći omjeri:

- omjer VWF:GPIbM / VWF:Ag
- omjer VWF:CB / VWF:Ag
- omjer FVIII / VWF:Ag.

4.2.1.9. Analiza multimera von Willebrandova faktora

Analiza multimera VWF-a provedena je elektroforezom na agaroznom gelu i imunofiksacijom primjenom komercijalno dostupnog kompleta reagensa HYDRAGEL 5 von WILLEBRAND MULTIMERS (Sebia, Lisses, Francuska) na uređaju HYDRASYS 2 Scan (Sebia, Lisses, Francuska). Postupak analize proveden je prema izvornim uputama proizvođača (80). Uzorci plazme prethodno pohranjeni na -80 ºC odmrznuti su u vodenoj kupelji na 37 ºC i lagano promiješani prije početka analize. Priprema uzoraka za analizu obuhvaća razrjeđenje plazme pomoću odgovarajućeg razrjeđivača uzoraka u omjerima ovisno o vrijednosti VWF:Ag za pojedini uzorak, kako je opisano u Tablici 8.

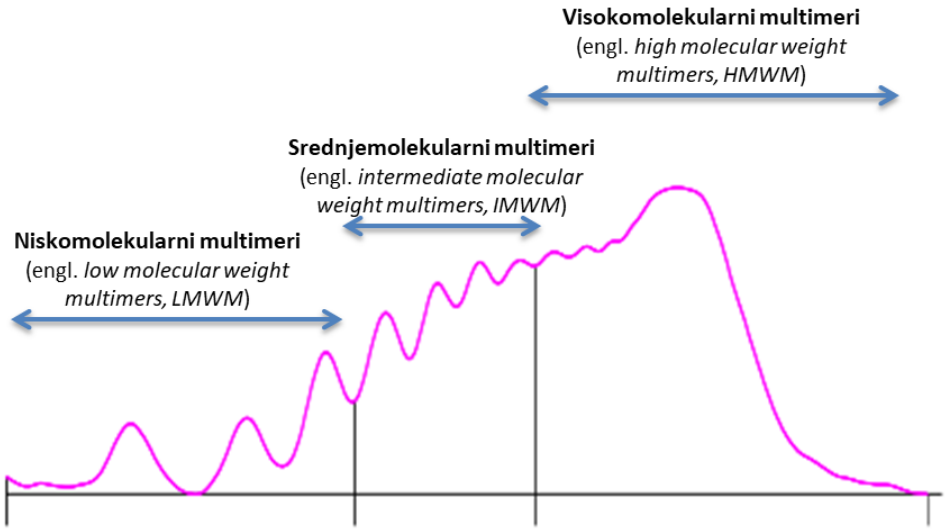
Tablica 8. Priprema razrjeđenja uzoraka za analizu multimera VWF-a

VWF:Ag (%)	Razrjeđenje	Razrjeđivač uzoraka (µL)	Plazma (µL)
< 20	1 : 4	30	10
20 – 150	1 : 6	50	10
150 – 300	1 : 10	90	10

VWF:Ag – antigen von Willebrandova faktora

Razrijeđeni uzorci inkubirani su 20 minuta na 45 ºC u vodenoj kupelji, nakon čega je unutar 10 minuta 5 µL obrađenog uzorka naneseno u jažice agaroznog gela. Elektroforetsko razdvajanje provedeno je pri konstanti od 1 W na 10 ºC kontroliranim Peltierovim efektom do akumulacije 170 Vh. Nakon elektroforetskog razdvajanja provedena je imunofiksacija u dva stupnja, pri čemu se u prvoj koristio antiserum koji sadržava ljudska antitijela na VWF, a u drugoj antiserum koji sadržava monoklonska antitijela naspram ljudskog imunoglobulina G, obilježena peroksidazom. Vizualizacija razdvojenih multimera VWF-a provedena je pomoću TTF otopine za vizualizaciju, a slijedili su postupci upijanja, rehidracije, sušenja i odbojavanja gela. Denzitometrijsko očitavanje elektroforetskih profila i analiza raspodjele multimera provedeni su pomoću pripadajućeg programa za analizu Phoresis (Sebia, Lisses,

Francuska). Vršci 1 – 3 odgovaraju niskomolekularnim, vršci 4 – 7 srednjemolekularnim dok vršci > 7 visokomolekularnim multimerima (Slika 4.). Dobiveni rezultati uspoređeni su i interpretirani u odnosu na raspodjelu multimera VWF-a normalne plazme u kojoj je vrijednost VWF:Ag ~100 %.



Slika 4. Raspodjela multimera VWF-a s dodijeljenim niskomolekularnim (LMWM), srednjemolekularnim (IMWM) i visokomolekularnim frakcijama multimera (HMWM)

4.2.2. Genetička analiza

4.2.2.1. Izdvajanje genomske DNA

Za izdvajanje genomske deoksiribonukleinske kiseline (DNA) iz leukocita periferne krvi korišten je ostatni stanični dio uzoraka dobiven nakon centrifugiranja citratne krvi i izdvajanja plazme siromašne trombocitima. Izdvajanje genomske DNA provedeno je automatiziranom metodom pomoću magnetnih čestica na uređaju MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska) primjenom odgovarajućeg kompleta reagensa za izolaciju MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska). Djelovanjem lizirajućeg pufera i proteinaze K dolazi do lize stanica i digestije proteina. Oslobođena DNA veže se na površinu magnetnih čestica, nakon čega slijedi magnetno razdvajanje kompleksa DNA i magnetnih čestica. Višestrukim ispiranjem uklanjaju se stanični ostatci te se ponavlja postupak magnetnog razdvajanja kompleksa DNA i magnetnih čestica. Odvajanje DNA od magnetnih čestica postiže se elucijom pri visokoj temperaturi.

4.2.2.2. Mjerenje koncentracije i čistoće DNA

Neposredno nakon izolacije koncentracija izolirane DNA izmjerena je na spektrofotometru NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) koji mjeri apsorbanciju vodene otopine DNA na 260 i 280 nm te iz dobivenih rezultata računa koncentraciju DNA. Čistoća DNA računa se na temelju omjera apsorbancija na 260 i 280 nm, a prihvatljiva je unutar raspona od 1,8 do 2,0. Izolirane DNA pohranjene su u hladnjaku na +4 ^{o}C do analize.

Za potrebe NGS-a koncentracija DNA u svakom uzorku dodatno je izmjerena na fluorimetru Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) koji mjeri fluorescenciju nastalu vezanjem fluorescentne boje specifično i isključivo na dvolančanu DNA u uzorku. Na taj način uklonjen je doprinos tvari iz uzorka koje nespecifično apsorbiraju na 260 nm, što je poznati nedostatak spektrofotometrijskog mjerenja na uređaju NanoDrop Lite. Za određivanje koncentracije DNA na Qubit 3.0 fluorimetru korišten je odgovarajući komplet reagensa Qubit dsDNA Broad Range Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) koji omogućuje mjerenje koncentracije DNA u rasponu od 2 do 1000 ng/µL. Prije određivanja koncentracije DNA u seriji uzoraka analizirani su standardi niske i visoke koncentracije, pri čemu na temelju dobivenih fluorescencija uređaj automatski izrađuje kalibracijsku krivulju. Reagens je razrijeđen puferom u omjeru 1 : 200. Uzorci za mjerenje

koncentracije DNA pripremljeni su u razrjeđenju 1 : 200 miješanjem 1 µL uzorka i 199 µL razrijeđenog reagensa. Nakon inkubacije u trajanju od dvije minute na sobnoj temperaturi izmjerena je fluorescencija, a uređaj automatski iz kalibracijske krivulje izračunava koncentraciju DNA u ng/µL.

4.2.2.3. Sekvenciranje sljedeće generacije

Postupak NGS-a proveden je prema izvornom protokolu proizvođača (81), a obuhvatio je sljedeće postupke: pripremu knjižnice, kvantifikaciju knjižnica i provjeru veličine ulomaka, hibridizaciju i reakcije obogaćivanja, sekvenciranje gena za VWF i FVIII te analizu dobivenih rezultata sekvenciranja pomoću bioinformatičkih alata.

4.2.2.3.1. Priprema knjižnica

Priprema knjižnice obuhvatila je razrjeđenja uzoraka, tzv. tagmentaciju DNA (enzimsko cijepanje uz dodavanje adaptora), pročišćavanje tagmentirane DNA, obilježavanje uzoraka i umnažanje PCR reakcijom te pročišćavanje dobivenih knjižnica pomoću magnetnih kuglica.

Reagensi potrebni za pripremu knjižnica:

1) razrjeđenje uzoraka: sterilna voda
2) tagmentacija DNA: magnetne kuglice s vezanim transpozonima (engl. *enrichment bead-linked transposomes,* eBLT), pufer za tagmentaciju
3) pročišćavanje tagmentirane DNA: pufer za zaustavljanje reakcije tagmentacije (engl. *stop tagment buffer 2,* ST2), pufer za ispiranje nakon tagmentacije (engl. *tagment wash buffer,* TWB)
4) obilježavanje i umnažanje tagmentirane DNA: reakcijska smjesa za PCR (engl. *enhanced PCR mix,* EPM), komplet jedinstvenih dvojnih indeksa (i7 i i5) veličine 10 pb za obilježavanje uzoraka (IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A)
5) pročišćavanje knjižnica: magnetne kuglice za pročišćavanje AMPure XP Beads (Beckman Coulter, Brea, Kalifornija, SAD), svježe pripremljeni 80-postotni etanol, pufer za resuspendiranje (engl. *resuspension buffer,* RSB).

Postupak:

Na temelju koncentracija DNA izmjerenih fluorimetrijski uzorci su razrijeđeni sterilnom vodom do početne količine DNA od 300 ng u ukupnom volumenu od 30 µL.

Volumeni DNA i volumeni sterilne vode za svaki uzorak izračunani su prema sljedećim formulama:

$$V\ (DNA),\ \mu l = \frac{300}{C\ (DNA), ng/\mu L}$$

V (sterilna voda), µL = 30 – V (DNA)

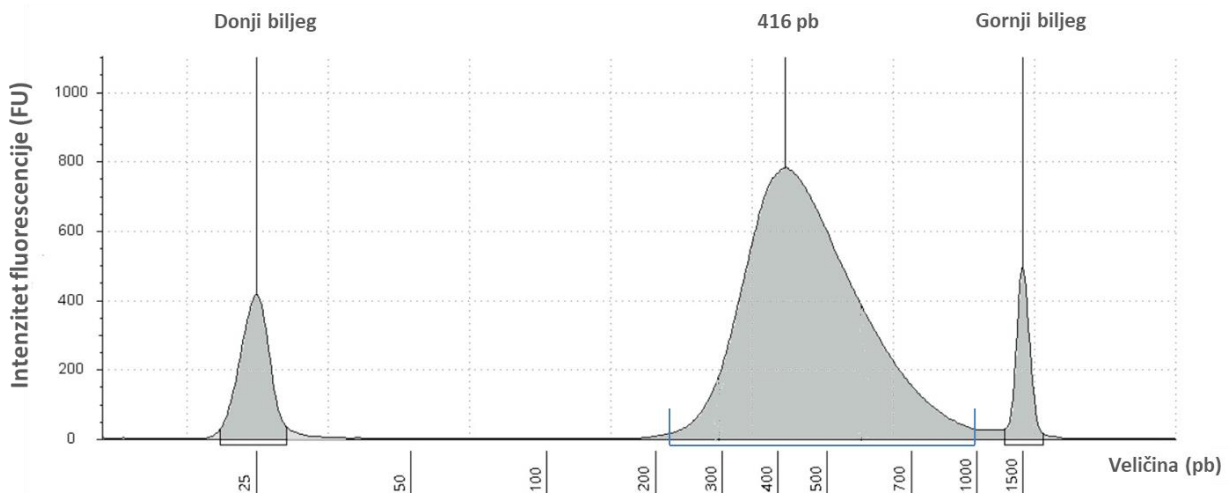
U svako pripremljeno razrjeđenje uzorka dodaje se 11,5 µL eBLT i 11,5 µL pufera za tagmentaciju. Proces tagmentacije izvodio se u termobloku MiniAmp Plus Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) tijekom pet minuta na 55 ^{o}C uz prethodno zagrijan poklopac na 100 ^{o}C. Proces pročišćavanja tagmentirane DNA započinje dodavanjem 10 µL ST2, inkubacijom pet minuta na sobnoj temperaturi te tri minute na magnetnom podlošku, nakon čega se supernatant uklanja. Daljnji postupak pročišćavanja uključuje ispiranje magnetnih kuglica s TWB-om te uklanjanje supernatanta, pri čemu se navedeni postupak ponavlja dva puta. U završnom koraku magnetne kuglice se ispiru sa 100 µL TWB-a, supernatant se uklanja te se pristupa pripremi reakcijske smjese za umnažanje tagmentirane DNA. U tu svrhu, 23 µL EPM-a razrjeđuje se s 23 µL sterilne vode. Na magnetne kuglice koje na sebi imaju vezanu tagmentiranu i pročišćenu DNA svakog uzorka dodaje se 40 µL dobivene reakcijske smjese za PCR.

Nakon toga u svaki se uzorak dodaje 10 µL uparenih indeksa s adaptorima za obilježavanje uzoraka, čija je kombinacija jedinstvena za svaki uzorak. Umnažanje tagmentirane i obilježene DNA provedeno je u termobloku MiniAmp Plus Thermal Cycler pod sljedećim uvjetima: tri minute na 72 ^{o}C; tri minute na 98 ^{o}C; devet ciklusa od 20 sekundi na 98 ^{o}C, 30 sekundi na 60 ^{o}C i jedna minuta na 72 ^{o}C; tri minute na 72 ^{o}C; ∞ na 10 ^{o}C. Nakon PCR reakcije odvaja se 45 µl supernatanta te se u svaki uzorak dodaje 77 µL sterilne vode i 88 µL magnetnih kuglica AMPure XP Beads. Slijede postupci miješanja, inkubacije na magnetu, uklanjanja supernatanta te dvostrukog ispiranja magnetnih kuglica 80-postotnim etanolom. U zadnjem se koraku magnetne kuglice resuspendiraju dodavanjem 17 µL RSB-a, a nakon miješanja, inkubacije na sobnoj temperaturi i na magnetnom podlošku tijekom dvije minute, 15 µL supernatanta prebacuje se u novu PCR pločicu za daljnji postupak.

4.2.2.3.2. Kvantifikacija knjižnica i provjera veličine ulomaka

Koncentracija knjižnica izmjerena je fluorimetrijski prema postupku opisanom u poglavlju 4.2.2.2.

Očekivana je veličina ulomaka u rasponu od 300 do 400 pb, a provjerena je pomoću kompleta reagensa DNA 1000 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) na uređaju za automatizirano elektroforetsko određivanje veličine ulomaka i koncentracije nukleinskih kiselina 4150 TapeStation (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) (Slika 5.).



Slika 5. Prikaz određivanja veličine ulomaka DNA elektroforezom PCR produkta na uređaju 4150 TapeStation pomoću kompleta reagensa DNA 1000

pb – parovi baza

4.2.2.3.3. Hibridizacija i reakcije obogaćivanja

Ovaj dio postupka obuhvatio je spajanje knjižnica svakoga pojedinačnog uzorka u jedinstvene uzorke, njihovu hibridizaciju sa sondama specifičnim za ciljne regije gena za VWF i FVIII, ciljano izdvajanje hibridiziranih sondi, umnažanje obogaćene knjižnice, pročišćavanje PCR produkata te provjeru veličine ulomaka i određivanje koncentracije DNA.

Ulazna količina DNA svake knjižnice za postupak spajanja po masi (engl. *pool by mass*) u jedinstvene uzorke (engl. *pool*) definirana je na 500 ng, a ulazni volumen svake pojedine knjižnice izračunan je dijeljenjem broja 500 s koncentracijom DNA izmjerenom fluorimetrijski u prethodnom koraku. S obzirom na to da je svih 83 uzoraka bilo odjednom u postupku, na temelju izračunanih volumena pripremljeno je šest jedinstvenih uzoraka koji su dobiveni spajanjem više pojedinačnih knjižnica. Korištenjem magnetnih kuglica AMPure XP Beads i RSB-a jedinstveni uzorci ukoncentrirani su do volumena od 30 µL.

Potrebni reagensi:

1) Hibridizacija: hibridizacijski pufer za reakciju obogaćivanja 2 (engl. *enrichment hybridization buffer 2,* EHB2), panel sondi za ciljne gene, hibridizacijski pufer 2 + IDT NXT blokirajuće tvari (engl. *hybridization buffer 2 + IDT NXT blockers,* NHB2), RSB.
2) Vezanje hibridiziranih sondi: streptavidinske magnetne kuglice (engl. *streptavidin magnetic beads,* SMB3), otopina za pojačano ispiranje kod reakcije obogaćivanja (engl. *enhanced enrichment wash,* EEW), pufer za eluciju kod reakcije obogaćivanja (engl. *enrichment elution buffer 1,* EE1), 2N otopina natrijeva hidroksida (HP3), ciljni pufer za eluciju (engl. *elute target buffer 2,* ET2).
3) Umnažanje obogaćenih knjižnica: EPM, početnice za PCR reakciju (engl. *PCR Primer Cocktail,* PPC).
4) Pročišćavanje PCR produkata: magnetne kuglice AMPure XP Beads, svježe pripremljen 80-postotni etanol, RSB.

Za postupak hibridizacije pripremljena je reakcijska smjesa za svaki jedinstveni uzorak koja se sastojala od 30 µL jedinstvenog uzorka knjižnica, 50 µL NHB2, 10 µL sondi iz panela za ciljne gene i 10 µL EHB2. Hibridizacija je provedena u termobloku MiniAmp Plus Thermal Cycler pod sljedećim uvjetima: pet minuta na 95 ^{o}C; 16 ciklusa po jednu minutu počevši na 94 ^{o}C pri čemu se u svakom ciklusu temperatura spušta za 2 ^{o}C; 90 minuta na 62

^{o}C. Radi optimizacije reakcije hibridizacije i smanjenja nespecifičnog vezanja početnica preporuka je da se inkubacija može produljiti do 16 sati, što je i učinjeno.

Vezanje hibridiziranih sondi na streptavidinske magnetne kuglice provedeno je neposredno nakon postupka hibridizacije. U prvom koraku izdvojeno je 100 µL produkata hibridizacije i dodano 250 µL SMB3. Dobivena reakcijska smjesa inkubirana je 15 minuta na 62 ^{o}C, nakon čega se provodi ispiranje pomoću EEW prethodno zagrijanog na inkubacijskom uređaju Hybex (SciGene, Sunnyvale, Kalifornija, SAD). Postupak se ponavlja četiri puta, a uključuje dodavanje 200 µL EEW, miješanje, inkubaciju na 62 ^{o}C tijekom pet minuta te uklanjanje supernatanta od streptavidinskih magnetnih kuglica na kojima su vezani produkti hibridizacije pomoću magneta. Nakon zadnjeg ciklusa slijedi postupak elucije koji se provodi pomoću smjese za eluciju koja se priprema miješanjem 28,5 µL EE1 i 1,5 µL HP3, a po uzorku se dodaje 23 µL navedene elucijske smjese. Slijede inkubacija, centrifugiranje i izdvajanje 21 µL supernatanta pomoću magneta u koji se dodaje 4 µL ET2. Dobivena smjesa označava pročišćene knjižnice obogaćene početnicama (hibridizirane) koje su spremne za umnažanje. Za PCR reakciju potrebno je dodati u svaki uzorak 5 µL PPC i 20 µL EPM. Umnažanje je provedeno u termobloku MiniAmp Plus Thermal Cycler pod sljedećim uvjetima: 30 sekundi na 98 ^{o}C; 16 ciklusa od 10 sekundi na 98 ^{o}C, 30 sekundi na 60 ^{o}C i 30 sekundi na 72 ^{o}C; pet minuta na 72 ^{o}C, ∞ na 10 ^{o}C.

Pročišćavanje umnoženih PCR produkata provedeno je prema postupku opisanom u poglavlju 4.2.2.3.1.

4.2.2.3.4. Razrjeđivanje knjižnica i završna priprema za sekvenciranje

Potrebni reagensi: RSB, 0,2 N NaOH, hibridizacijski pufer HT1

Postupak:

Koncentracija hibridiziranih obogaćenih knjižnica izmjerena je fluorimetrijski prema postupku opisanom u poglavlju 4.2.2.2., dok je veličina ulomaka provjerena kako je opisano u poglavlju 4.2.2.3.2.

Na temelju koncentracije umnoženih knjižnica i prosječne veličine ulomaka izračunana je molarnost svake knjižnice prema sljedećoj formuli:

$$\text{Molarnost (nmol/L)} = \frac{c\left(knjižnica, \frac{ng}{\mu L}\right) x\ 100000}{660 \frac{g}{mol} x\ prosječna\ veličina\ ulomaka\ (pb)}$$

Knjižnice su razrijeđene s RSB-om na koncentraciju 4 nM u ukupnom volumenu od 30 µL, pri čemu je volumen svake knjižnice izračunan prema sljedećoj formuli:

$$\text{V (knjižnica, µl)} = \frac{4 \frac{nmol}{L} x\ 30\ \mu L}{c\ (knjižnica, \frac{nmol}{L})}$$

Od svake razrijeđene knjižnice odvojeno je 10 µL za izradu jedinstvenoga multipleksiranog uzorka.

Završna faza pripreme za sekvenciranje uključuje denaturaciju, pri čemu se 5 µL multipleksiranoga jedinstvenog uzorka miješa s 5 µL svježe pripremljenog 0,2 N NaOH. Iz toga se priprema 20 pM knjižnica miješanjem 10 µL denaturirane 4 nM knjižnice i 990 µL HT1 ohlađenog na 4 ^{o}C. Konačna koncentracija za sekvenciranje iznosi 12 pM, a postiže se razrjeđivanjem 360 µL 20 pM knjižnice s 240 µL HT1.

4.2.2.3.5. Sekvenciranje gena za von Willebrandov faktor i faktor zgrušavanja FVIII na uređaju MiSeq

Sekvenciranje gena za VWF i FVIII provedeno je na uređaju MiSeq (Illumina, San Diego, Kalifornija, SAD) korištenjem kompleta reagensa V2 (Illumina, San Diego, Kalifornija, SAD) s 300 ciklusa, duljine čitanja 150 pb na uparenom kraju, čime je postignuta pokrivenost odabranih regija gena od 660x. Korišten je panel sondi specifično osmišljen za potrebe ovog istraživanja tvrtke Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, SAD).
Sonde su obuhvatile sljedeće ciljne regije:

- regije gena za VWF na kromosomu 12 koje uključuju svih 52 egzona, bočne intronske regije i promotorsku regiju, s posebnom pažnjom na dizajn sondi u području egzona 23 do 34 koje sadržavaju razlikovne baze i čime je omogućeno specifično umnažanje regije gena za VWF na kromosomu 12, a otklonjena mogućnost umnažanja vrlo homolognog pseudogena na kromosomu 22 (82)
- regije gena za FVIII na kromosomu X koje uključuju svih 26 egzona, intron-egzon granična područja te promotorsku regiju (83).

Ciljne regije gena za VWF i FVIII odabrane su na temelju referentnoga ljudskog genoma GRCh37 (hg19, veljača 2009.) i prikazane su u Tablicama 9. i 10.

Tablica 9. Regije gena za von Willebrandov faktor obuhvaćene panelom korištenim u istraživanju

Regije gena za VWF na kromosomu 12 prema referentnom ljudskom genomu hg19	
6058054 – 6058486	6131846 – 6132293
6058733 – 6059172	6132665 – 6133073
6060757 – 6061170	6134628 – 6135414
6061477 – 6061903	6138446 – 6138891
6062564 – 6062980	6140388 – 6140811
6076471 – 6076878	6143653 – 6144079
6077205 – 6077619	6145362 – 6145763
6078262 – 6078666	6153395 – 6153841
6080672 – 6081080	6155734 – 6156124
6085205 – 6085646	6161622 – 6162037
6090788 – 6091234	6165915 – 6166330
6092058 – 6092496	6166849 – 6167272
6094070 – 6094474	6171934 – 6172334
6094481 – 6094884	6173203 – 6173631
6100851 – 6101256	6174141 – 6174574
6102969 – 6103415	6180162 – 6180609
6103443 – 6103869	6181328 – 6181728
6105030 – 6105430	6182713 – 6183118
6120679 – 6121463	6184410 – 6184792
6122551 – 6122952	6204415 – 6204839
6125072 – 6125466	6219451 – 6220251
6125479 – 6126102	6230201 – 6230619
6127429 – 6128967	6232070 – 6232494
6130980 – 6131389	6233525 – 6235621

VWF – von Willebrandov faktor

Tablica 10. Regije gena za faktor zgrušavanja VIII obuhvaćene panelom korištenim u istraživanju

Regije gena za FVIII na kromosomu X prema referentnom ljudskom genomu hg19	
154255054 – 154255180	154134694 – 154134848
154250684 – 154250998	154133085 – 154133298
154227753 – 154227875	154132570 – 154132799
154225247 – 154225370	154132180 – 154132363
154221210 – 154221423	154130325 – 154130442
154215511 – 154215580	154129645 – 154129717
154212961 – 154213078	154128140 – 154128226
154197605 – 154197827	154124351 – 154124507
154194700 – 154194962	154114408 – 154114577
154194244 – 154194416	154091357 – 154091502
154189349 – 154189443	154089992 – 154090141
154185231 – 154185446	154088706 – 154088883
154182166 – 154182317	154065871 – 154066027
154175972 – 154176182	154254067 – 154257797
154156845 – 154159951	

FVIII – faktor zgrušavanja VIII

Sekvenciranje sintezom na uređaju MiSeq provodi se pomoću optički transparentnoga protočnog članka (engl. *flow cell*) koji na svojoj površini ima vezane dvije vrste oligonukleotida. Jednolančani ulomci DNA koji se sastoje od nekoliko pb i popravljenih krajeva na način da je stvoren 5'-fosforilirani tupi kraj vežu se pomoću adaptora na komplementarni slijed jedne vrste oligonukleotida na površini optičkog članka. Djelovanjem polimeraze dolazi do stvaranja komplementarnog lanca. Nastale dvolančane DNA denaturiraju se i dolazi do ispiranja lanaca oligonukleotida koji su bili vezani na čvrstu površinu, dok novosintetizirani lanci ostaju površinski usidreni i klonalno se umnažaju postupkom premošćujućeg PCR-a (engl. *bridge polymerase chain reaction; bridge amplification*). U tom procesu DNA lanci nadsvođuju susjedni oligonukleotid na površini optičkog članka i vežu se na njega pomoću adaptora, a djelovanjem polimeraze nastaje

dvolančana DNA koja se denaturira i u konačnici na površini optičkog članka ostaju vezane po dvije jednolančane DNA. Tijekom višestrukog ponavljanja ovih ciklusa dolazi do umnažanja svih ulomaka pri čemu nastaju milijuni prostorno odvojenih tzv. *klastera,* odnosno gustih nakupina umnoženih ulomaka DNA. Slijedi denaturacija i ispiranje komplementarnih lanaca, a za proces sekvenciranja ostaju samo izvorni lanci vezani na čvrstu površinu optičkog članka.

Sekvenciranje započinje dodavanjem četiri deoksiribonukleotida (engl. *deoxyribose nucleotide triphosphate,* dNTP), od kojih je svaki obilježen različitom fluorescentnom bojom, početnica za prvo čitanje i DNA polimeraze. Tijekom svakog ciklusa dolazi do produljenja lanca komplementarnim vezanjem jednog dNTP-a, dok se ugradnjom baze koja sadržava blokirani 3'-kraj prekida proces elongacije. Nukleotidi koji se nisu ugradili ispiru se, dok se vezani dNTP izlaže laserskom pobuđivanju i dolazi do fluorescencije. U konačnici, sekvenca gena rezultat je komplementarnog vezanja i mjerenja fluorescencije nastale pobuđivanjem fluorescentno obilježenih vezanih dNTP tijekom ponavljajućih ciklusa. Proces se odvija u milijunima paralelnih reakcija, pri čemu se identični sljedovi za određeni klaster očitavaju istodobno. Ovime se dobivaju podaci prvog čitanja (engl. *read 1*).

Nakon toga dolazi do ispiranja lanca očitanja te se očitava prvi indeks na jednak način: dolazi do vezanja prvo početnice prvog indeksa, komplementarnog vezanja fluorescentno obilježenih dNTP-a i očitavanja fluorescencije.

Za očitanje slijeda drugog indeksa, dolazi do nadsvođenja lanca DNA na susjedni oligonukleotid, a djelovanjem polimeraze i komplementarnim vezanjem nukleotida nastaje dvolančana DNA. Njezinom denaturacijom izvorni se lanac ispire, a preostaje komplementarni lanac koji se umnaža vezanjem početnice drugog čitanja, djelovanjem polimeraze i komplementarnim vezanjem fluorescentno obilježenih dNTP-a, čime se generiraju podaci drugog čitanja (engl. *read 2*).

Sljedovi za svaki uzorak iz multipleksiranoga jedinstvenog uzorka knjižnice razdvajaju se na temelju indeksa kojima su obilježeni tijekom pripreme uzoraka. Prvo i drugo očitanje uparuju se i poravnavaju s referentnim genomom hg19 (engl. *allignment*) (84, 85).

4.2.2.3.6. Analiza rezultata sekvenciranja

Rezultati sekvenciranja (očitanja) pohranjeni su unutar datoteka FASTQ formata koje su u binarnom obliku za kodiranje očitanja, a sadržavaju sekvence, njihove identifikatore te oznaku kvalitete svakog očitanja. FASTQ datoteke uvedene su u program BaseSpace Variant Interpreter (Illumina, San Diego, Kalifornija, SAD) gdje je provedeno utvrđivanje i dodijeljivanje (engl. *annotation*) sljednih varijanti gena za VWF i FVIII. Patogenost utvrđenih sljednih varijanti gena ispitana je pomoću platforme VarSome (86). VarSome je bioinformatički alat koji omogućava pretraživanje identificiranih varijanti gena unutar ljudskog genoma. Pretraživanjem pojedine varijante dobivaju se podaci o vrsti genske varijante, lokaciji unutar gena i HGVS (engl. *Human Genome Variation Society*) nazivlju. U slučajevima kada se genska varijanta nalazi unutar egzona, prikazuje se i njegova struktura, višestruki prijepisi i regije od interesa (npr. proteinske funkcionalne domene, specifična vezna mjesta itd.) na temelju podataka iz povezanoga bioinformatičkog programa UniProt. Dodatno, prikazuju se strukturne varijante gena koje se nalaze u blizini prema podacima dostupnim u ClinVar bioinformatičkom alatu (87).

Patogenost pojedinih sljednih varijanti gena klasificirana je prema nazivlju koje je definiralo Američko društvo za medicinsku genetiku i genomiku (engl. *American College of Medical Genetics and Genomics,* ACMG) (88) na sljedeći način: patogene varijante (engl. *pathogenic*), vjerojatno patogene varijante (engl. *likely pathogenic*), varijante nepoznatog značaja (engl. *variant of uncertain significance*), vjerojatno benigne varijante (engl. *likely benign*) i benigne varijante (engl. *benign*). Predviđanje patogenosti temelji se na objedinjavanju podataka iz izračuna stupnja patogenog učinka pojedine genske varijante primjenom preko 20 različitih predviđajućih algoritama te podatka o učestalosti pojedine varijante u populaciji. Također, ako postoje, prikazuju se klinički relevantni podaci povezani s učinkom određene genske varijante i povezani fenotipovi (89).

Genske varijante klasificirane kao patogene, vjerojatno patogene i varijante nepoznatog značaja smatrale su se uzročnim mutacijama za fenotip krvarenja kod ispitanika u ovom istraživanju.

Dijagnoza pojedinog tipa VWB-a postavljena je na temelju kombinacije rezultata koagulacijskih pretraga i genetičke analize.

4.2.2.4. Metoda višestrukog umnažanja vezanih sondi

Za deset ispitanika kod kojih su rezultati koagulacijskih pretraga upućivali da se radi o poremećaju VWF-a, a metodom NGS-a nije utvrđeno postojanje mutacija u genu za VWF, provedena je analiza ciljanih regija gena za VWF metodom MLPA.

MLPA metoda temelji se na umnažanju oligonukleotidnih sondi obilježenih fluorescentnim bojama ako je došlo do njihova vezanja na komplementarni slijed DNA u ispitivanom uzorku. Umnožene MLPA sonde razlikuju se po duljini PCR produkta i razdvajaju se kapilarnom elektroforezom s fluorescentnim detektorom. Intenzitet fluorescentnog signala svake sonde određuje količinu PCR produkta, a uspoređuje se u odnosu na uzorak referentne DNA.

Potrebni reagensi:

Komplet reagensa MLPA (MRC Holland, Amsterdam, Nizozemska) koji sadržava:

- SALSA MLPA pufer
- enzim SALSA ligaza-65
- pufer za ligaciju A
- pufer za ligaciju B
- SALSA smjesu početnica za PCR
- SALSA polimerazu.

Kompleti sondi za gen za VWF:

- SALSA MLPA P011 VWF (MRC Holland, Amsterdam, Nizozemska)
- SALSA MLPA P012 VWF (MRC Holland, Amsterdam, Nizozemska).

Svaki komplet sadržava 37 MLPA sondi, uključujući 28 sondi specifičnih za 26 od 52 egzona gena za VWF te devet referentnih sondi za autosomne kromosomske regije. Korištenjem obaju kompleta obuhvaćeni su svi egzoni gena za VWF-a (Tablica 11.)

Tablica 11. Duljine sondi i regije gena za von Willebrandov faktor obuhvaćene MLPA sondama iz kompleta P011 VWF i P012 VWF

Duljina (pb)		Egzon	Vezno mjesto prema	Duljina (pb)		Egzon	Vezno mjesto prema
P011	P012		NM_000552.4	P011	P012		NM_000552.4
		Start kodon	256 – 258 (egzon 2)		178	27	12 pb nakon egzona 27
	232	1	210 – 211	384		28	3941 – 3942
265		2	5 pb prije egzona 2		148	28	4608 – 4609
337		2	22 pb prije egzona 2		154	29	5372 – 5373
	427	3	380 – 381		391	30	5454 – 5455
	215	4	528 – 529		274	31	5634 – 5635
130		5	696 – 697		160	32	7 pb prije egzona 32
427		6	794 – 795	185		33	67 pb nakon egzona 33
310		6	855 – 856	283		34	6069 – 6070
	382	7	1014 – 1015		346	35	6186 – 6187
355		8	1159 – 1160	160		36	6351 – 6352
217		9	1312 – 1313		223	37	6537 – 6538
	310	10	1388 – 1389	211		38	6978 – 6979
	418	11	1472 – 1473	136		39	7132 – 7133
	130	12	1557 – 1558		136	40	7200 – 7201
202		13	1764 – 1765		208	41	7278 – 7279
169		14	41 pb prije egzona 14	319		42	7431 – 7432
	364	15	2077 – 2078	256		43	7568 – 7569
	328	16	2420 – 2421		283	44	7721 – 7722
	256	17	13 pb prije egzona 17	148		45	7878 – 7879
350		18	2541 – 2542	274		46	8010 – 8011
	184	19	2731 – 2732		292	47	8054 – 8055
364		20	2840 – 2841	391		47	8116 – 8117
	247	21	2989 – 2990		355	48	8189 – 8190
	172	22	7 pb prije egzona 22	232		49	8292 – 8293
226		23	3347 – 3348	178		50	8410 – 8411
154		24	48 pb nakon egzona 24		202	51	8434 – 8435
	322	25	3495 – 3494	418		52	8669 – 8670
244		26	365 pb prije egzona 26			Stop kodon (egzon 52)	8695 – 8696

NM_00052.4 – referentna sekvenca gena za von Willebrandov faktor; pb – parovi baza

Postupak:

Koncentracije DNA u uzorcima izmjerene su fluorimetrijski na uređaju Qubit 3.0 prema postupku opisanom u poglavlju 4.2.2.2.

Prema izmjerenoj koncentraciji DNA i definiranoj ulaznoj količini DNA od 100 ng izračunan je volumen DNA koji je do 5 µL nadopunjen TE puferom (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA). Za svaki komplet sondi pripremljena je zasebna mješavina.

Tako razrijeđeni uzorci denaturirani su u termobloku MiniAmp Plus Thermal Cycler tijekom pet minuta na 98 ^{o}C i potom ohlađeni na 25 ^{o}C. U svaki uzorak dodano je 3 µL hibridizacijske otopine koja je sadržavala MLPA pufer i komplet specifičnih sondi u omjeru 1 : 1 te je pokrenuta hibridizacija na termobloku MiniAmp Plus Thermal Cycler pod sljedećim uvjetima: jedna minuta na 95 ^{o}C, 16 do 20 sati na 60 ^{o}C.

Nakon isteka, temperatura u termobloku spuštena je na 54 ^{o}C. U svrhu vezanja MLPA sondi u svaki uzorak dodana je mješavina koja se sastojala od 25 µL sterilne vode, 3 µL ligacijskog pufera A, 3 µL ligacijskog pufera B i 1 µL enzima ligaza-65. Takva reakcijska smjesa inkubirana je u termobloku pod sljedećim uvjetima: 15 minuta na 54 ^{o}C, pet minuta na 98 ^{o}C. Nakon što je temperatura spuštena na 20 ^{o}C, dodana je mješavina za PCR koja se sastojala od 7,5 µL sterilne vode, 2 µL SALSA smjese početnica za PCR i 0,5 µL SALSA polimeraze. Umnažanje MLPA sondi provedeno je u termobloku MiniAmp Plus Thermal Cycler pod sljedećim uvjetima: 35 ciklusa od 30 sekundi na 95 ^{o}C, 30 sekundi na 60 ^{o}C i jedne minute na 72 ^{o}C; 20 minuta na 72 ^{o}C; ∞ na 15 ^{o}C.

Dobiveni ulomci razdvojeni su automatiziranom kapilarnom elektroforezom na uređaju ABI-3130xl (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD), a analizi je prethodila denaturacija koja je provedena u termobloku tijekom pet minuta na 86 ^{o}C. Uzorci su pripremljeni tako što je u 0,7 µL PCR produkta dodano 9,2 µL prethodno pripremljene smjese koja se sastojala od 9,0 µL Hi-Di formamida i 0,2 µL standarda DNA ulomaka veličine u rasponu od 35 do 500 nukleotida GeneScan-500 LIZ (Thermo Fisher Scientifics, Waltham, Massachusetts, SAD).

Dobiveni rezultati analizirani su u programu Coffalyser.Net (MRC Holland, Amsterdam, Nizozemska). Analiza se sastoji od dva koraka: fragmentarne analize i usporedne analize uzoraka (engl. *comparative analysis*). Fragmentarnom analizom provjerava se kvaliteta DNA uzorka, same MLPA reakcije, učinkovitost razdvajanja ulomaka kapilarnom elektroforezom i provodi se normalizacija signala svakog uzorka usporedbom vršnih vrijednosti sondi unutar uzorka i između uzoraka. Usporednom analizom produkata

uspoređuje se intenzitet signala ispitivanog uzorka u odnosu na referentne uzorke koji sadržavaju diploidni broj kopija DNA za sve ciljne sekvence. Intenzitet fluorescentnog signala svake sonde određuje količinu PCR produkta svake sonde. Za svaku sondu u svakom uzorku izračunava se konačni udio (engl. *final probe ratio*) koji je omjer signala sonde u ispitivanom i referentnom uzorku. Uredan nalaz je omjer koji iznosi približno 1 (od 0,8 do 1,2), a podrazumijeva prisutnost dviju kopija gena. Omjeri niži od 0,65 upozoravaju na prisutnost delecija, a omjeri viši od 1,3 na prisutnost duplikacija u genu (90).

4.3. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je pomoću statističkog programa MedCalc, verzija 19.5.2 (MedCalc, Ostend, Belgija).

Normalnost raspodjele kvantitativnih podataka (dob, rezultati laboratorijskih testova) analizirana je Shapiro-Wilk testom, a podaci su prikazani medijanima i interkvartilnim rasponima (engl. *interquartile range,* IQR). Kvalitativni podaci (spol, krvna grupa AB0, simptomi krvarenja, primjenjivana terapija) prikazani su kroz postotke i udjele.

Značajnost razlike kvantitativnih podataka između skupina ispitana je neparametrijskim Kruskal-Wallisovim testom za nezavisne uzorke. U slučaju statistički značajne razlike provedena je usporedba između podskupina Conoverovim post-hoc testom. Za potrebe usporedbe rezultata koagulacijskih pretraga, a radi zadovoljavanja uvjeta statističkog testa, rezultatima koji su bili ispod donje ili iznad gornje granice mjernog raspona dodijeljene su vrijednosti donje, odnosno gornje granice mjernog raspona. Značajnost razlike između skupina kvalitativnih podataka testirana je Fisherovim egzaktnim testom i χ^2-kvadrat testom, ovisno o primjenjivosti. Za sve statističke analize $P < 0,05$ smatrao se statistički značajnim.

5. REZULTATI

5.1. Opće osobine ispitanika

U istraživanje su bila uključena 83 ispitanika, od kojih je 29 bilo muškog, a 54 ženskog spola (P < 0,001). Starosna dob ispitanika obuhvatila je raspon od 0 (2 mjeseca) do 75 godina. Bilo je ukupno 29 pedijatrijskih i 54 odrasla ispitanika (P < 0,001). Krvna grupa AB0 bila je poznata za 68 (82 %) ispitanika. Opće osobine ispitanika uključenih u istraživanje prikazane su u Tablici 12.

Tablica 12. Opće osobine ispitanika uključenih u istraživanje

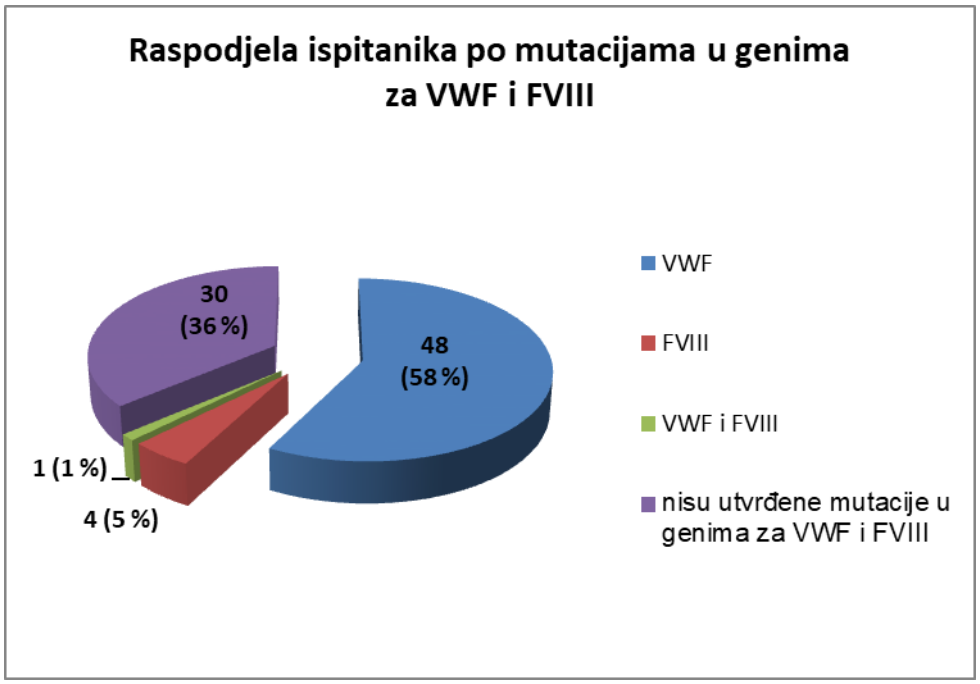
Ispitanici, N	83
• Pedijatrijski, N (%)	29 (35)
• Odrasli, N (%)	54 (65)
Dob, medijan godina (raspon)	26 (0 do 75)
• Pedijatrijski, medijan (raspon)	9 (0 do 17)
• Odrasli, medijan (raspon)	38 (18 do 75)
Spol	
• Muški, N (%)	29 (35)
• Ženski, N (%)	54 (65)
Krvna grupa AB0*	
• 0, N (%)	31 (46)
• A, N (%)	28 (41)
• B, N (%)	8 (12)
• AB, N (%)	1 (1)

*Udio ispitanika izražen je na 68 ispitanika za koliko je bila poznata krvna grupa AB0

Ispitanici pripadaju 60 obitelji. Broj obitelji s više od jednog uključenog ispitanika iznosio je 17, pri čemu je najviše iz jedne obitelji uključeno pet ispitanika, iz po jedne četiri odnosno tri ispitanika, dok je broj obitelji koji je imao po dva ispitanika u istraživanju iznosio 14. Preostalih 43 nije imalo krvnog srodnika među ispitanicima uključenim u ovo istraživanje.

5.2. Vrsta, raspodjela i učestalost mutacija u genima za von Willebrandov faktor i faktor zgrušavanja VIII

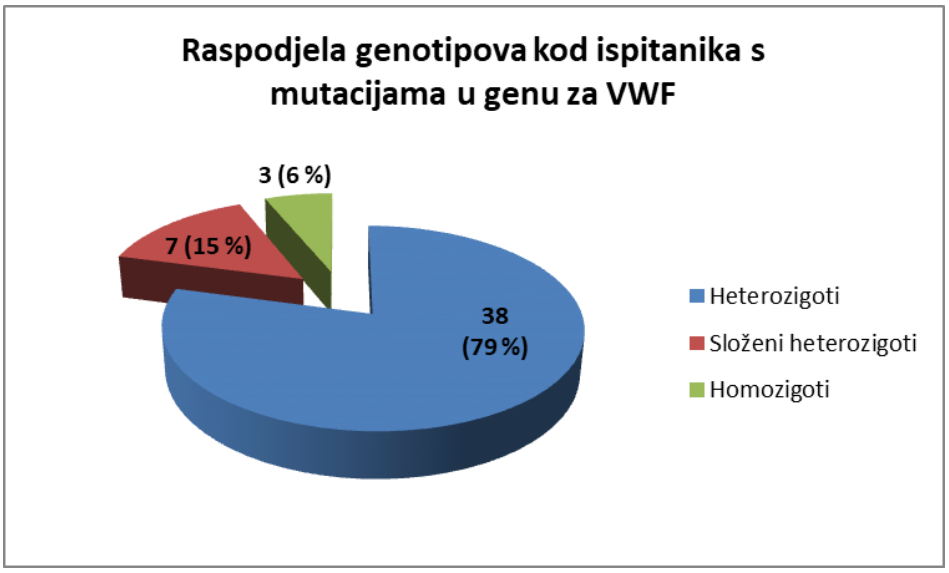
Sekvenciranjem gena za VWF i FVIII tehnologijom NGS i dodatnim pretraživanjem gena za VWF kod odabranih ispitanika tehnologijom MLPA utvrđeno je postojanje mutacija kod ukupno 53 (64 %) ispitanika koji pripadaju 38 obitelji. Tehnologijom NGS-a nađene su mutacije kod 52 ispitanika, dok je kod jednog ispitanika mutacija u genu za VWF otkrivena tehnologijom MLPA. Mutacije u genu za VWF nađene su kod 48 ispitanika, u genu za FVIII kod četiri ispitanika, dok je kod jedne ispitanice utvrđeno postojanje mutacija u oba analizirana gena (Slika 6.). Kod preostalih 30 ispitanika nisu utvrđene mutacije u genima za VWF i FVIII.



Slika 6. Raspodjela ispitanika prema mutacijama u genima za VWF i FVIII

Rezultati su prikazani kao broj ispitanika u pojedinoj skupini i udio (%) u ukupnom broju ispitanika.

Među ukupno 48 ispitanika s pronađenim mutacijama samo u genu za VWF, 38 ispitanika bili su heterozigoti, sedam složeni heterozigoti i tri homozigoti (Slika 7.). Detaljna raspodjela vrsta mutacija prema genotipovima prikazana je u Tablici 13.



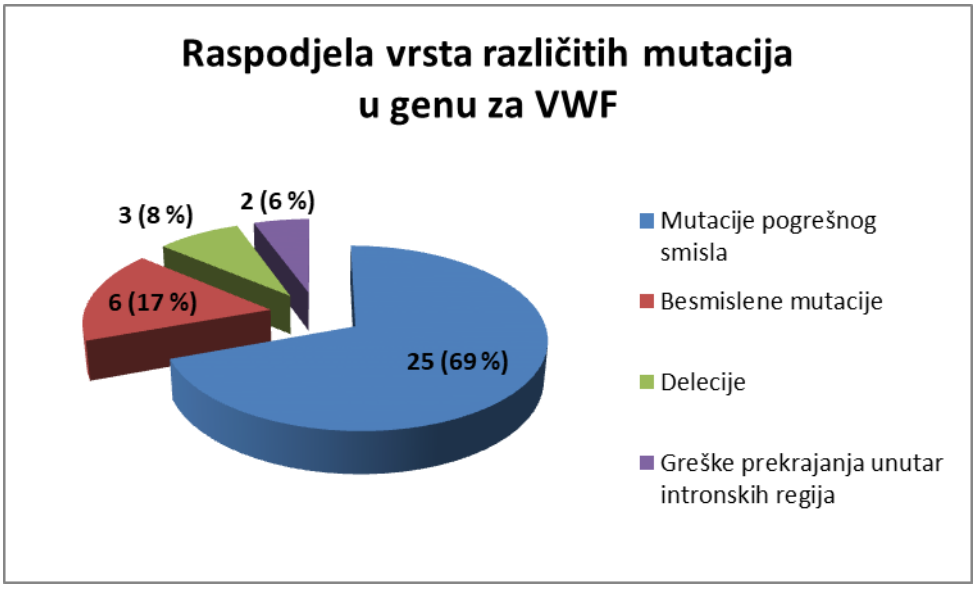
Slika 7. Raspodjela genotipova kod ispitanika s mutacijama u genu za VWF

Rezultati su prikazani kao broj ispitanika s pojedinim genotipom i udio (%) u ukupnom broju ispitanika s mutacijama u genu za VWF.

Tablica 13. Raspodjela vrsta mutacija u genu za VWF ovisno o genotipu

Heterozigoti, N	38
• mutacije pogrešnog smisla, N (%)	29 (76)
• besmislene mutacije, N (%)	5 (14)
• mutacije pomaka okvira čitanja (delecije), N (%)	2 (5)
• greške prekrajanja unutar introna, N (%)	2 (5)
Složeni heterozigoti, N	7
• dvije različite mutacije pogrešnog smisla, N	4/7
• dvije različite besmislene mutacije, N	2/7
• mutacija pogrešnog smisla i besmislena mutacija, N	1/7
Homozigoti, N	3
• mutacije pomaka okvira čitanja (delecije), N	2/3
• besmislene mutacije, N	1/3

Ukupno je utvrđeno 36 različitih mutacija u genu za VWF, od kojih je 25 mutacija pogrešnog smisla, šest besmislenih mutacija, tri mutacije pomaka okvira čitanja i to delecije, dok se dvije mutacije odnose na greške prekrajanja unutar intronskih regija (Slika 8).

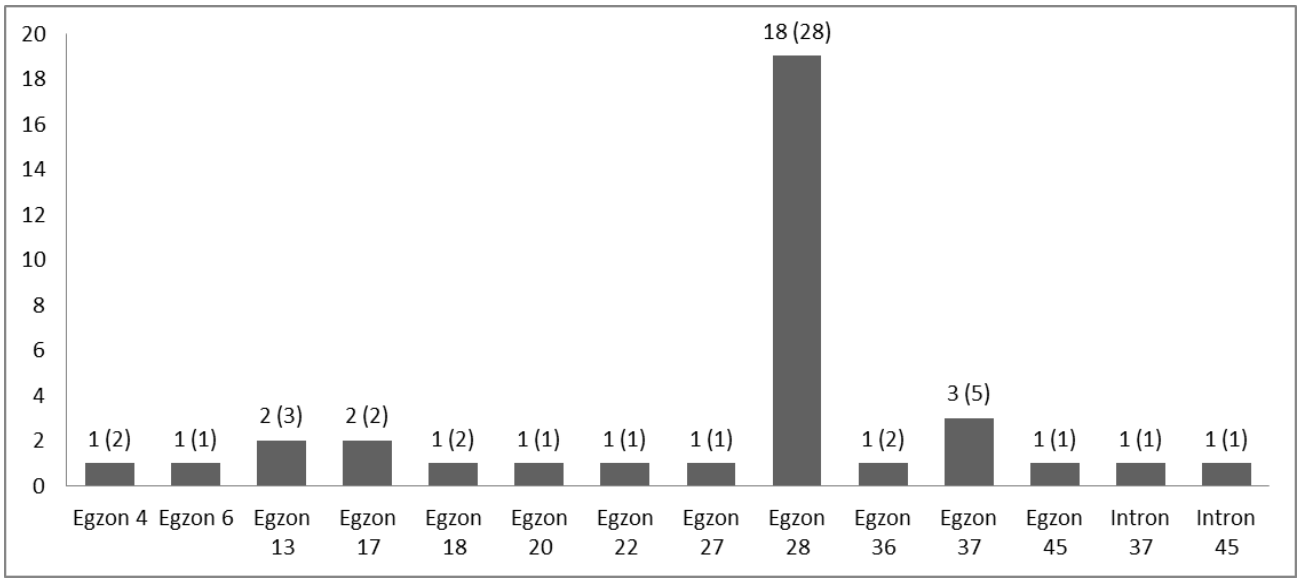


Slika 8. Raspodjela vrsta različitih mutacija unutar gena za VWF

Rezultati su prikazani kao broj različitih mutacija unutar pojedine vrste i udio (%) u ukupnom broju različitih mutacija utvrđenih unutar gena za VWF.

Od 36 mutacija u genu za VWF, 13 (36 %) su novootkrivene, odnosno do sada neopisane u bazi varijanti gena za VWF (40). Od toga, osam mutacija bile su mutacije pogrešnog smisla (c.571T>C, c.1496A>C, c.1531A>C, c.3829G>T, c.3829G>C, c.4471A>G, c.6479A>G, c.6596G>A), tri besmislene mutacije (c.319C>T, c.6151A>T, c.6504C>A), jedna mutacija pomaka okvira čitanja (delecija egzona 1 do 6) i jedna greška prekrajanja unutar introna (c.6599-2A>G).

Slika 9 prikazuje raspodjelu različitih mutacija po pojedinim regijama gena za VWF koje su utvrđene NGS tehnologijom te broj ispitanika kojima su utvrđene mutacije u pojedinoj regiji gena za VWF. Kod najvećeg broja ispitanika, ukupno njih 28, mutacije su nađene unutar egzona 28 gena za VWF, s time da ih je nađeno 18 različitih. Dodatno, heterozigotna delecija utvrđena tehnologijom MLPA kod jednog ispitanika obuhvaćala je područje od egzona 1 do egzona 6 gena za VWF.



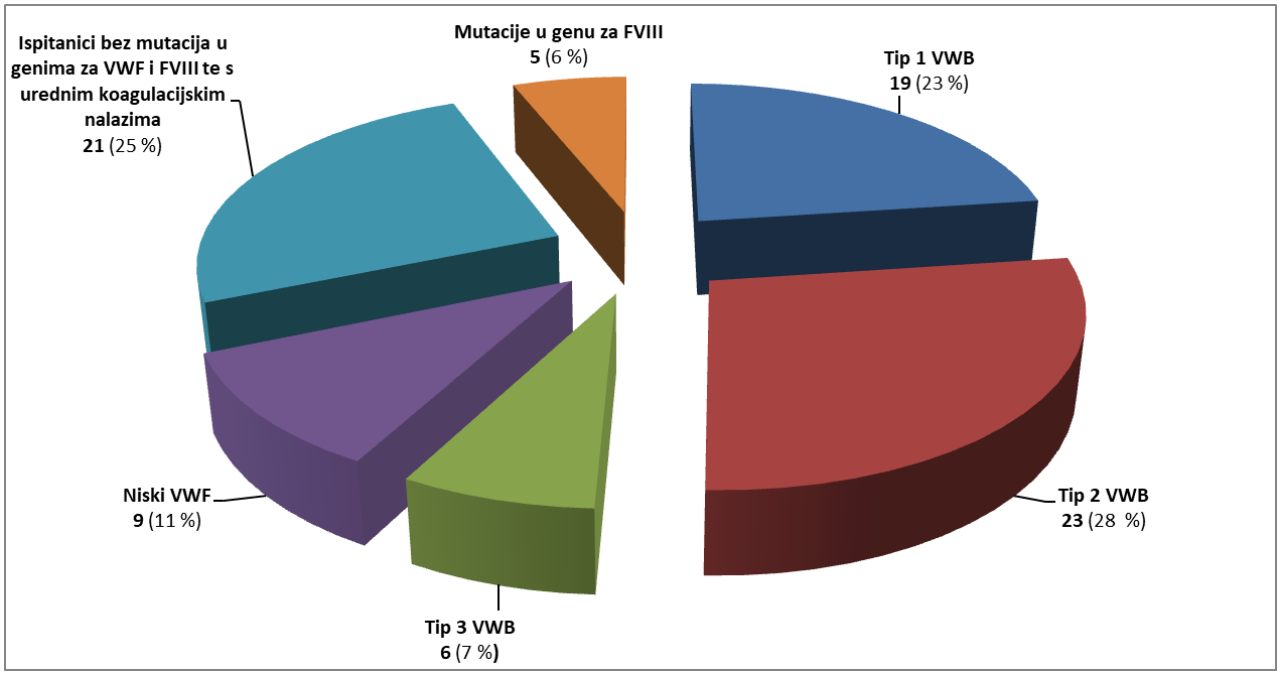
Slika 9. Raspodjela mutacija unutar gena za VWF utvrđenih tehnologijom NGS

Prikazan je broj različitih mutacija unutar pojedine regije gena za VWF, a u zagradi broj ispitanika s mutacijama u pripadajućoj regiji.

Mutacije u genu za FVIII nađene su kod pet ispitanika (tri ženskog i dva muškog spola), pri čemu ukupan broj različitih mutacija u genu za FVIII iznosi tri i u sva tri slučaja radi se o mutacijama pogrešnog smisla. Dvije su mutacije do sada neopisane u bazi varijanti gena za FVIII (76). Kod jedne je ispitanice uz mutaciju u genu za FVIII nađena i mutacija u genu za VWF. Detaljnije karakteristike ovih ispitanika opisane su u poglavlju 5.10.

5.3. Klasifikacija ispitanika na temelju rezultata koagulacijskih pretraga i genetičke analize

Na temelju rezultata koagulacijskih pretraga i genetičke analize, 19 ispitanika klasificirano je kao tip 1, šest kao tip 3 VWB-a dok je, od 23 ispitanika s tipom 2 VWB-a, 15 podklasificirano kao tip 2A, sedam kao tip 2B i jedan kao tip 2N. Devet ispitanika kod kojih nisu utvrđene mutacije u genima za VWF i FVIII, ali su imali VWF:GPIbM ispod 50 %, klasificirani su kao tzv. „niski VWF“. Od četiri slučaja kod kojih su nađene mutacije samo u genu za FVIII, dva su muška ispitanika dijagnosticirana kao blaga hemofilija A, dok su dvije preostale ženske ispitanice otkrivene kao nositeljice hemofilije A. Ispitanica kod koje su utvrđene mutacije u genu za VWF i FVIII smatra se također nositeljicom hemofilije A, a prisutnost mutacije u genu za VWF dodatno doprinosi kliničkoj slici krvarenja. Klasifikacija ispitanika na temelju rezultata koagulacijskih pretraga i genetičke analize prikazana je na Slici 10.



Slika 10. Klasifikacija ispitanika na temelju rezultata koagulacijskih pretraga i genetičke analize

Rezultati su prikazani kao broj ispitanika i njihov udio (%) u ukupnom broju ispitanika koji su sudjelovali u istraživanju.

Opće osobine ispitanika unutar pojedinih skupina prikazane su u Tablici 14.

Tablica 14. Opće osobine ispitanika svrstanih u kategorije na temelju rezultata koagulacijskih pretraga i genetičke analize

	Tip 1 VWB	**Tip 2 VWB**	**Tip 3 VWB**	**Niski VWF**	**Ispitanici bez mutacija i urednih koagulacijskih nalaza**	**Mutacije u genu za FVIII**
Broj ispitanika, N	19	23	6	9	21	5
• pedijatrijski, N	5/19	11/23	0/6	4/9	7/21	2/5
• odrasli, N	14/19	12/23	6/6	5/9	14/21	3/5
Dob, medijan godina (raspon)	33 (4 – 75)	23 (0 – 69)	44 (8 – 54)	18 (5 – 58)	24 (5 – 54)	22 (2 – 35)
Spol						
• muški, N	3/19	7/23	3/6	6/9	8/21	2/5
• ženski, N	16/19	16/23	3/6	3/9	13/21	3/5

VWB – von Willebrandova bolest; VWF – von Willebrandov faktor; FVIII – faktor zgrušavanja VIII

Nije utvrđena statistički značajna razlika u prisutnosti mutacija u genu za VWF ovisno o spolu (M: 13/29; Ž: 36/54; P = 0,053) niti dobi (< 18 godina: 16/29; > 18 godina: 33/54; P = 0,599). Postoji statistički značajna razlika u prisutnosti mutacija u genu za VWF ovisno o krvnoj grupi AB0 (P = 0,030). Veći udio ispitanika s mutacijama u odnosu na one bez mutacija u genu za VWF utvrđen je među ispitanicima s krvnim grupama A (20/28 prema 8/28) i B (7/8 prema 1/8), dok je kod krvne grupe 0 udio ispitanika s mutacijama (13/31) bio niži u odnosu na one bez mutacija (18/31).

5.4. Usporedba rezultata koagulacijskih pretraga

Rezultati koagulacijskih pretraga po pojedinim skupinama ispitanika prikazani su u Tablici 15.

Tablica 15. Rezultati koagulacijskih pretraga u pojedinim skupinama ispitanika

Pretraga	RI	Tip 1 VWB-a (N= 19)	Tip 2 VWB (N= 23)	Tip 3 VWB (N= 6)	Niski VWF (N= 9)	Ispitanici bez mutacija i urednih koagulacijskih nalaza (N= 21)	Mutacije u genu za FVIII (N= 5)
Broj trombocita ($x10^9$/L)	158-424	229 (192-260)	246 (181-302)	269 (223-376)	253 (223-367)	209 (185-303)	259 (216-312)
PV (udjel)	>0.70	1,08 (0,95-1,10)	0,99 (0,95-1,05)	1,03 (0,93-1,07)	0,99 (0,95-1,07)	0,96 (0,91-1,07)	0,99 (0,93-1,02)
APTV (s)	20-30	28,0 (25,9-31,7)	30,9 (28,7-34,6)	52,2 (46,7-54,7)	30,2 (27,8-31,9)	27,1 (25,1-28,8)	34,2 (31,9-35,9)
PFA-200 COL/EPI (s)	80-160	252 (208-284)	299 (260-300)	288 (259-300)	169 (142-212)	140 (126-167)	163 (134-239)
PFA-200 COL/ADP (s)	60-120	184 (143-244)	285 (224-300)	293 (263-300)	121 (113-162)	104 (87-115)	109 (90-167)
VWF:GPIbM (%)	50-187	41,3 (24,9-55,7)	13,4 (8,2-24,7)	<4,0-8,3*	41,4 (33,1-45,8)	77,7 (67,6-99,2)	52,2 (49,1-59,8)
VWF:Ag (%)	50-160	55,4 (25,3-65,0)	47,7 (21,4-58,7)	<4,0- 7,3*	49,8 (37,6-56,6)	83,2 (75,2-103,3)	53,0 (51,1-64,6)
Omjer VWF:GPIbM /VWF:Ag	NP	0,88 (0,76-0,97)	0,48 (0,27-0,66)	NP†	0,79 (0,70-0,90)	0,93 (0,87-1,01)	0,96 (0,94-0,98)
FVIII (%)	50-149	72,0 (47,3-84,8)	44,0 (30,5-63,3)	5,0 (4,0-5,0)	70,0 (49,0-96,5)	89,0 (77-103,3)	23,0 (18,5-28,5)

Tablica 15. (nastavak) Rezultati koagulacijskih pretraga u pojedinim skupinama ispitanika

Pretraga	RI	Tip 1 VWB-a (N= 19)	Tip 2 VWB (N= 23)	Tip 3 VWB (N= 6)	Niski VWF (N= 9)	Ispitanici bez mutacija i urednih koagulacijskih nalaza (N= 21)	Mutacije u genu za FVIII (N= 5)
Omjer FVIII/ VWF:Ag	NP	1,44 (1,16-2,21)	1,23 (0,73-1,47)	NP†	1,54 (1,20-1,64)	1,17 (0,83-1,26)	0,37 (0,35-0,49)
VWF:CB (%)	40 - 250	34,1 (19,6-46,0)	20,9 (14,8-36,7)	<1,0 – 3,5*	38,4 (35,4-46,6)	67,7 (55,7-84,5)	38,6 (37,3-52,3)
Omjer VWF:CB/ VWF:Ag	NP	0,72 (0,66-0,80)	0,63 (0,42- 0,82)	NP†	0,89 (0,69-0,92)	0,83 (0,76-0,86)	0,84 (0,68-0,91)
HMWM (%)	35,0 – 58,5§	55,4 (52,2-60,5)	33,5 (14,2-50,4)	NP‡	57,4 (54,2-62,0)	56,8 (54,5-62,9)	66,5 (50,5-70,2)
IMWM (%)	24,6 – 42,0§	24,3 (16,3-29,4)	23,1 (14,5-32,4)	NP‡	22,3 (20,0-28,6)	26,8 (21,8-29,0)	19,3 (16,5-28,9)
LMWM (%)	11,8 – 23,6§	19,1 (14,7-29,1)	44,4 (27,6-58,7)	NP‡	18,8 (16,6-22,0)	15,1 (13,1-17,4)	17,3 (12,4-19,3)

Rezultati su prikazani kao medijani s pripadajućim interkvartilnim rasponima.

*Rezultati prikazani kao raspon dobivenih vrijednosti.

† Zbog nemjerljivo niskih vrijednosti VWF:GPIbM, VWF:Ag, FVIII i VWF:CB, za ispitanike s tipom 3 VWB-a omjere nije bilo moguće izračunati te nisu uključeni u statističku obradu.

‡ Zbog nemjerljivo niskih vrijednosti VWF:Ag kod ispitanika s tipom 3 VWB-a multimerna analiza nije opravdana te nije provedena.

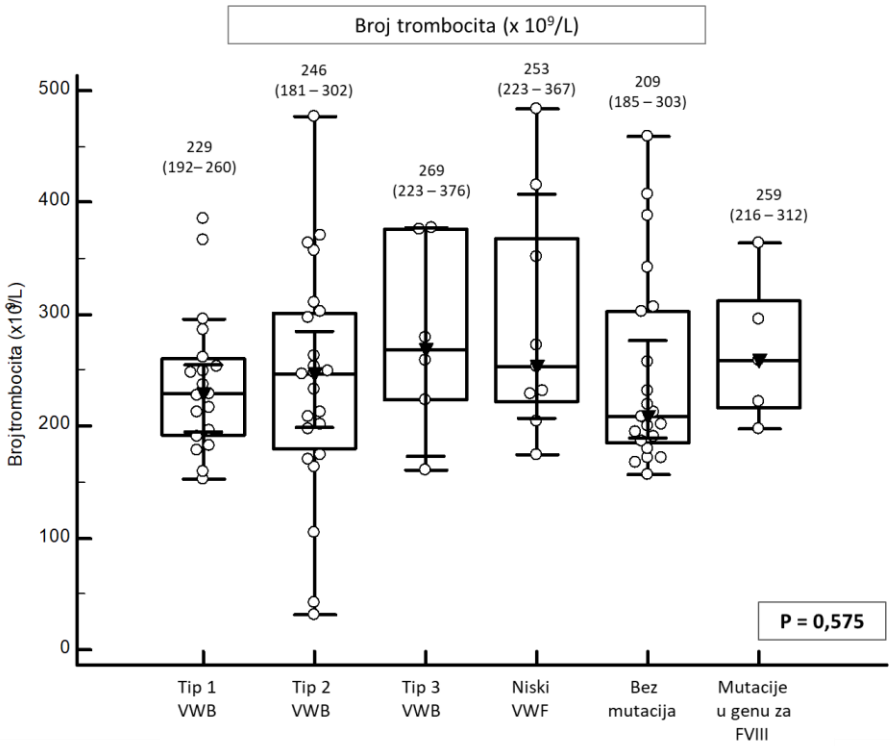
§ Referentni intervali za udjele HMWM, IMWM i LMWM preuzeti su iz (91).

RI – referentni interval; PV – protrombinsko vrijeme; APTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme; PFA COL/EPI, PFA COL/ADP – kapacitet primarne hemostaze ispitan na uređaju PFA-200; VWF:GPIbM – aktivnost von Willebrandova faktora koja se temelji na sposobnosti vezanja GPIb; VWF:CB – test sposobnosti vezanja kolagena; VWF: Ag – antigen von Willebrandova faktora; FVIII – faktor zgrušavanja VIII; HMWM – visokomolekularni multimeri; IMWM – srednjemolekularni multimeri; LMWM – niskomolekularni multimeri; NP – nije primijenjivo

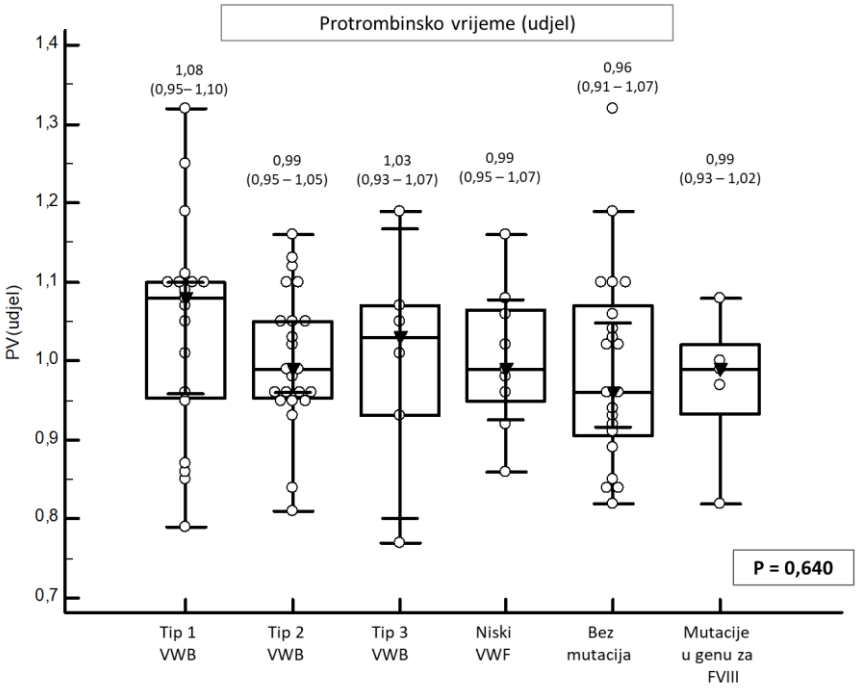
Statistički značajna razlika između skupina nije nađena za broj trombocita (P = 0,575) i PV (P = 0,640). Statistički značajna razlika između skupina, uz P < 0,001, utvrđena je za APTV, VWF:GPIbM, VWF:Ag, VWF:CB i FVIII (Slike 11A-11G), omjere VWF: GPIbM/VWF:Ag (P < 0,001), VWF:CB/VWF:Ag (P = 0,022) i FVIII/VWF:Ag (P = 0,001) (Slike 12A – 12C) te PFA-200 COL/EPI i PFA-200 COL/ADP (P < 0,001) (Slike 13A – 13B). Zbog uglavnom nemjerljivo niskih vrijednosti parametara koji ulaze u izračun omjera ispitanici s tipom 3 VWB-a nisu uključeni u taj dio statističke obrade.

Ispitivanjem kapaciteta primarne hemostaze na uređaju PFA-200 dobiveni su nemjerljivo produljena vremena nastanka ugruška za COL/EPI kod 5/19 ispitanika s tipom 1, 19/23 ispitanika s tipom 2, svih 6/6 ispitanika s tipom 3 VWB-a te kod 2/9 ispitanika kategorizirana kao ,,niski VWF“. Za COL/ADP nemjerljivo produljeni rezultati dobiveni su kod 5/19 ispitanika s tipom 1, 17/23 s tipom 2, svih 6/6 s tipom 3 VWB-a, jednog ispitanika iz skupine ,,niskog VWF-a“ te jedne ispitanice s mutacijom u genu za FVIII. χ^2-kvadrat testom dobivena je statistički značajna razlika u udjelu nemjerljivo produljenih rezultata PFA-200 COL/EPI i COL/ADP za ispitanike s tipom 2 i 3 VWB-a u odnosu na ostale skupine (P < 0,001).

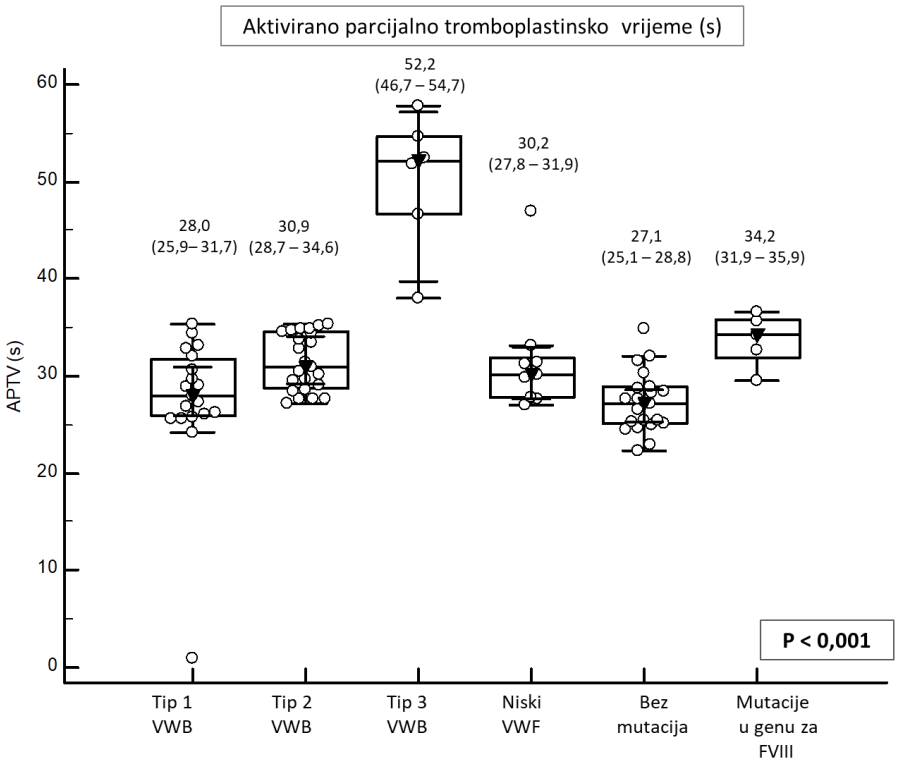
A


Broj trombocita (x 10⁹/L)
Brojtrombocita (x10⁹/L)
500
400
300
200
100
0
229
(192– 260)
246
(181 – 302)
269
(223 – 376)
253
(223 – 367)
209
(185 – 303)
259
(216 – 312)
P = 0,575
Tip 1 VWB
Tip 2 VWB
Tip 3 VWB
Niski VWF
Bez mutacija
Mutacije u genu za FVIII

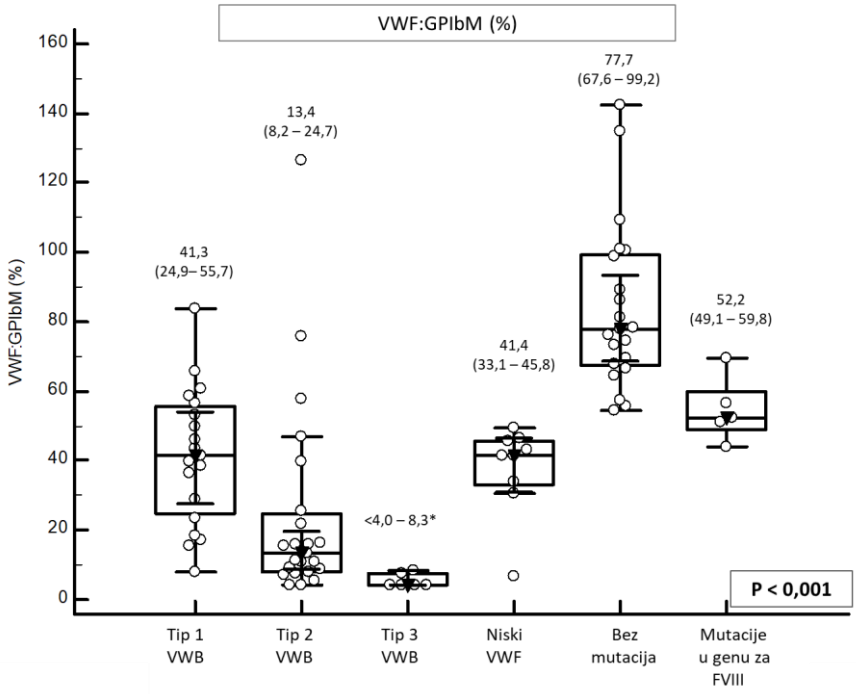
B


Protrombinsko vrijeme (udjel)
PV(udjel)
1,4
1,3
1,2
1,1
1,0
0,9
0,8
0,7
1,08
(0,95– 1,10)
0,99
(0,95 – 1,05)
1,03
(0,93 – 1,07)
0,99
(0,95 – 1,07)
0,96
(0,91 – 1,07)
0,99
(0,93 – 1,02)
P = 0,640
Tip 1 VWB
Tip 2 VWB
Tip 3 VWB
Niski VWF
Bez mutacija
Mutacije u genu za FVIII

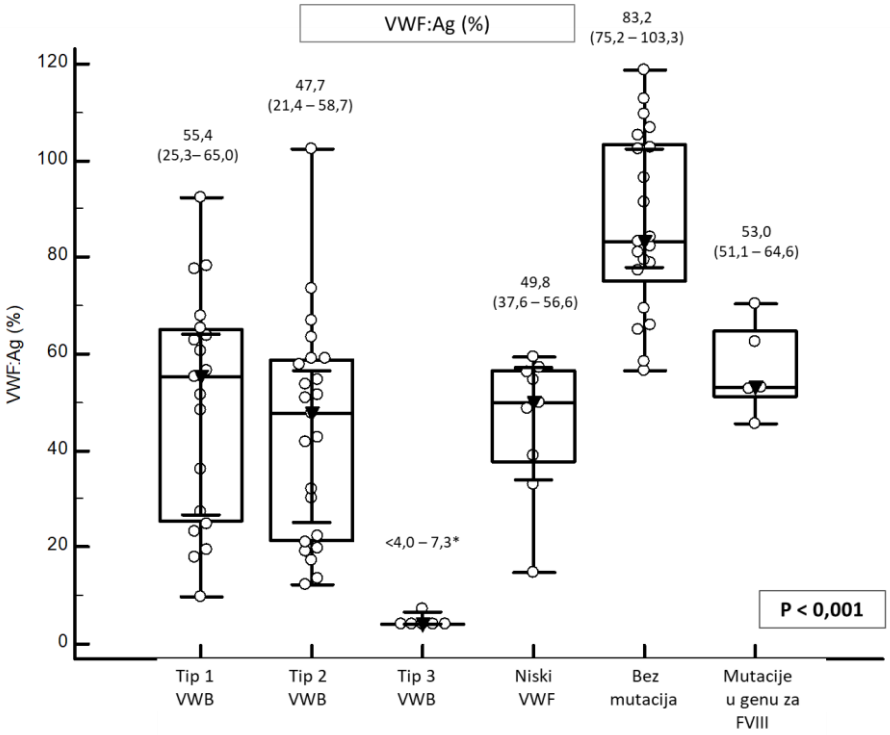
C


Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (s)
APTV (s)
60
50
40
30
20
10
0
28,0
(25,9– 31,7)
30,9
(28,7 – 34,6)
52,2
(46,7 – 54,7)
30,2
(27,8 – 31,9)
27,1
(25,1 – 28,8)
34,2
(31,9 – 35,9)
P < 0,001
Tip 1 VWB
Tip 2 VWB
Tip 3 VWB
Niski VWF
Bez mutacija
Mutacije u genu za FVIII

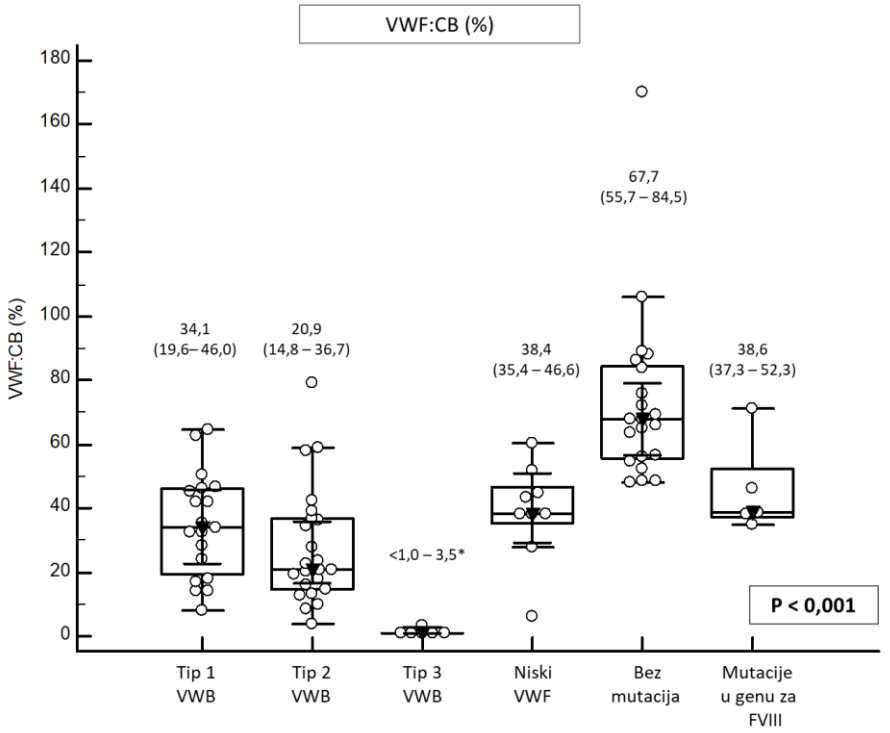
D

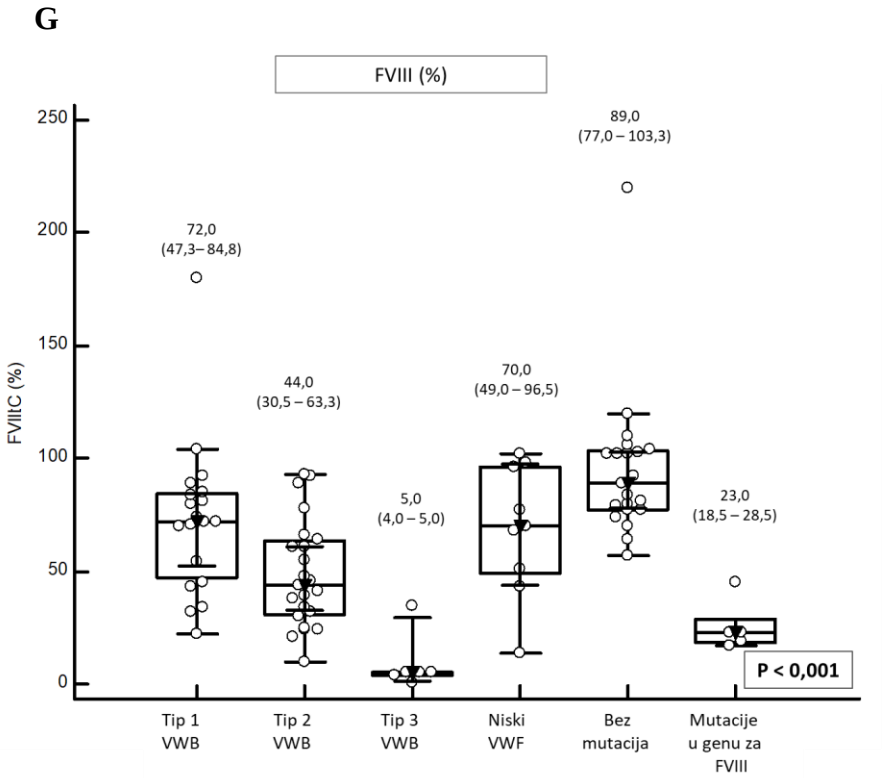

VWF:GPIbM (%)
VWF:GPIbM (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
41,3
(24,9– 55,7)
13,4
(8,2 – 24,7)
<4,0 – 8,3*
41,4
(33,1 – 45,8)
77,7
(67,6 – 99,2)
52,2
(49,1 – 59,8)
P < 0,001
Tip 1 VWB
Tip 2 VWB
Tip 3 VWB
Niski VWF
Bez mutacija
Mutacije u genu za FVIII

E


VWF:Ag (%)
VWF:Ag (%)
120
100
80
60
40
20
0
55,4
(25,3– 65,0)
47,7
(21,4 – 58,7)
<4,0 – 7,3*
49,8
(37,6 – 56,6)
83,2
(75,2 – 103,3)
53,0
(51,1 – 64,6)
P < 0,001
Tip 1 VWB
Tip 2 VWB
Tip 3 VWB
Niski VWF
Bez mutacija
Mutacije u genu za FVIII

F


VWF:CB (%)
VWF:CB (%)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
34,1
(19,6– 46,0)
20,9
(14,8 – 36,7)
<1,0 – 3,5*
38,4
(35,4 – 46,6)
67,7
(55,7 – 84,5)
38,6
(37,3 – 52,3)
P < 0,001
Tip 1 VWB
Tip 2 VWB
Tip 3 VWB
Niski VWF
Bez mutacija
Mutacije u genu za FVIII



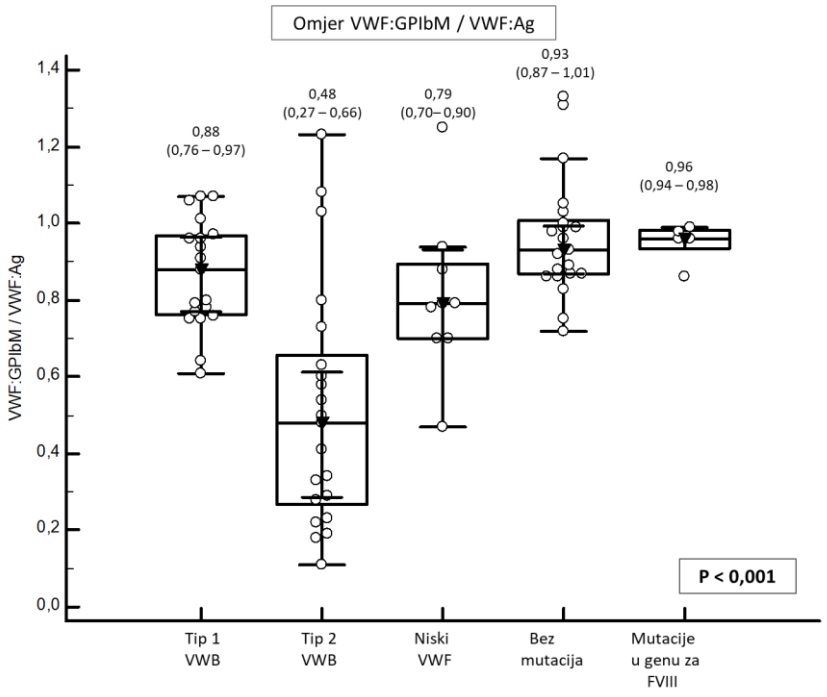
Slika 11. Usporedba rezultata između skupina ispitanika za pretrage: (A) broj trombocita; (B) protrombinsko vrijeme; (C) aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme; (D) VWF:GPIbM; (E) VWF:Ag; (F) VWF:CB; (G) FVIII

Rezultati su prikazani kao medijani s pripadajućim interkvartilnim rasponima.

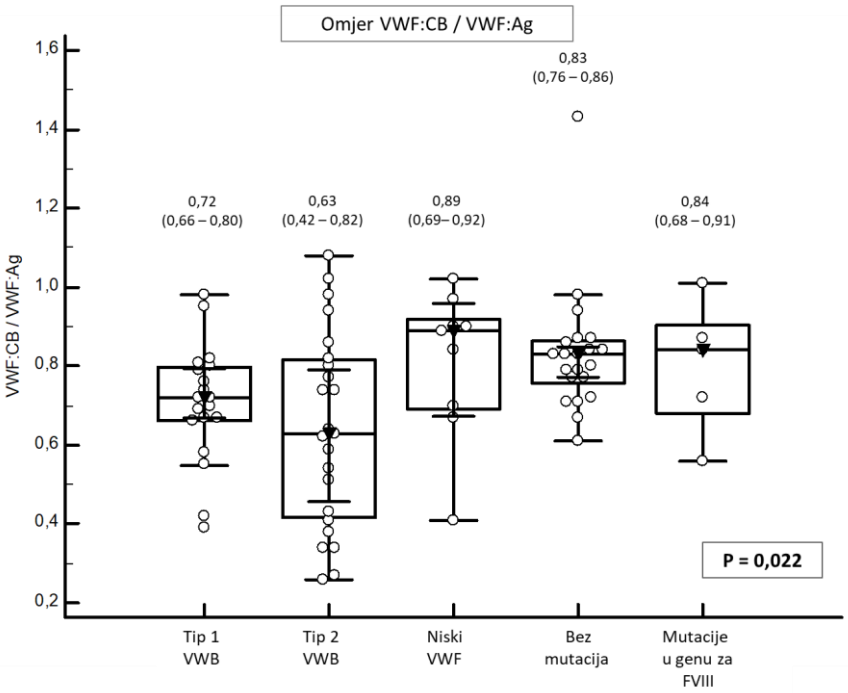
P-vrijednost dobivena je Kruskal-Wallisovim testom, P < 0,05 smatrao se statistički značajnim.

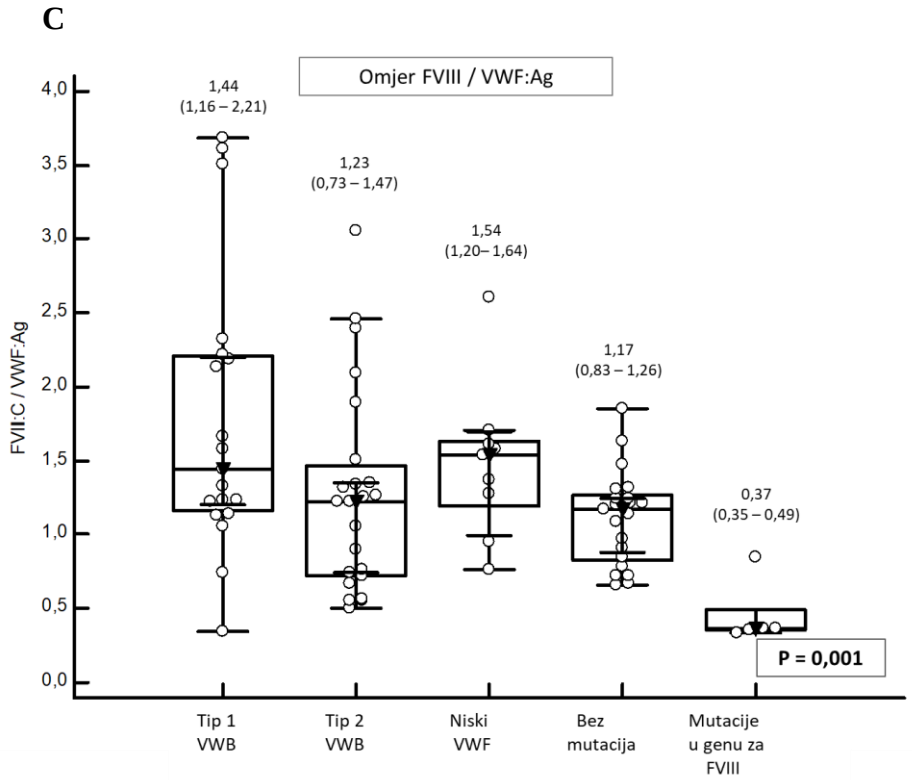
VWF:GPIbM – aktivnost von Willebrandova faktora koja se odnosi na sposobnost vezanja trombocitnog glikoproteina Ib; VWF: Ag – antigen von Willebrandova faktora; VWF:CB – test vezanja kolagena; FVIII – faktor zgrušavanja VIII

A


Omjer VWF:GPIbM / VWF:Ag
VWF:GPIbM / VWF:Ag
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0,88
(0,76 – 0,97)
0,48
(0,27 – 0,66)
0,79
(0,70– 0,90)
0,93
(0,87 – 1,01)
0,96
(0,94 – 0,98)
P < 0,001
Tip 1 VWB
Tip 2 VWB
Niski VWF
Bez mutacija
Mutacije u genu za FVIII

B


Omjer VWF:CB / VWF:Ag
VWF:CB / VWF:Ag
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,72
(0,66 – 0,80)
0,63
(0,42 – 0,82)
0,89
(0,69– 0,92)
0,83
(0,76 – 0,86)
0,84
(0,68 – 0,91)
P = 0,022
Tip 1 VWB
Tip 2 VWB
Niski VWF
Bez mutacija
Mutacije u genu za FVIII



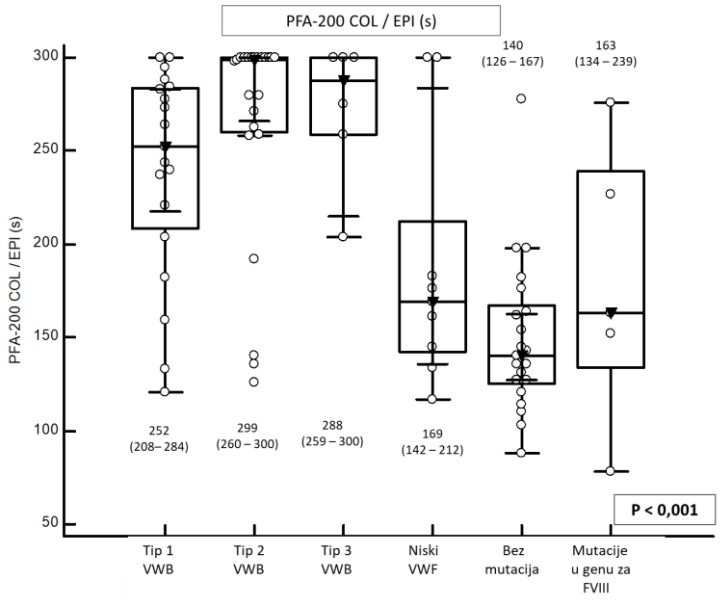
Slika 12. Usporedba rezultata između skupina ispitanika za omjere: (A) VWF:GPIbM/VWF:Ag; (B) VWF:CB/VWF:Ag; (C) FVIII/VWF:Ag

Rezultati su prikazani kao medijani s pripadajućim interkvartilnim rasponima.

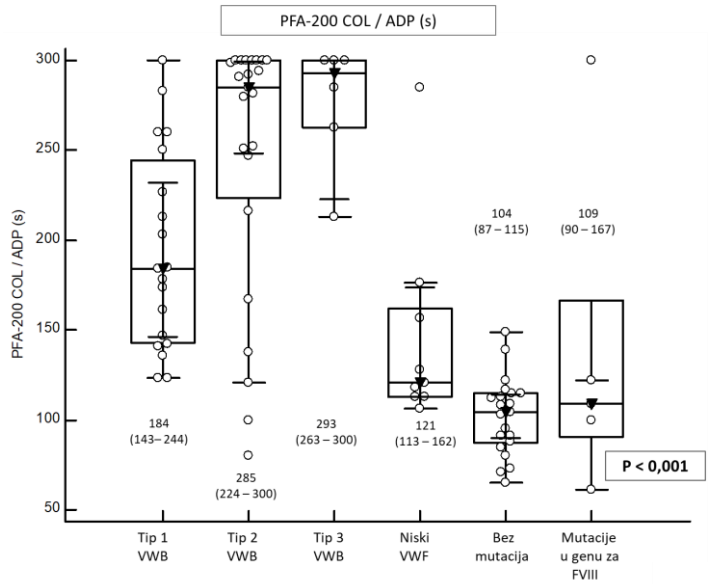
P-vrijednost dobivena je Kruskal-Wallisovim testom, $P < 0,05$ smatrao se statistički značajnim.

VWF:GPIbM – aktivnost von Willebrandova faktora koja se odnosi na sposobnost vezanja trombocitnog glikoproteina Ib; VWF:Ag – antigen von Willebrandova faktora; VWF:CB – test vezanja kolagena; FVIII – faktor zgrušavanja VIII

A



B



Slika 13. Usporedba rezultata između skupina ispitanika za: (A) PFA-200 COL/EPI i (B) PFA-200 COL/ADP

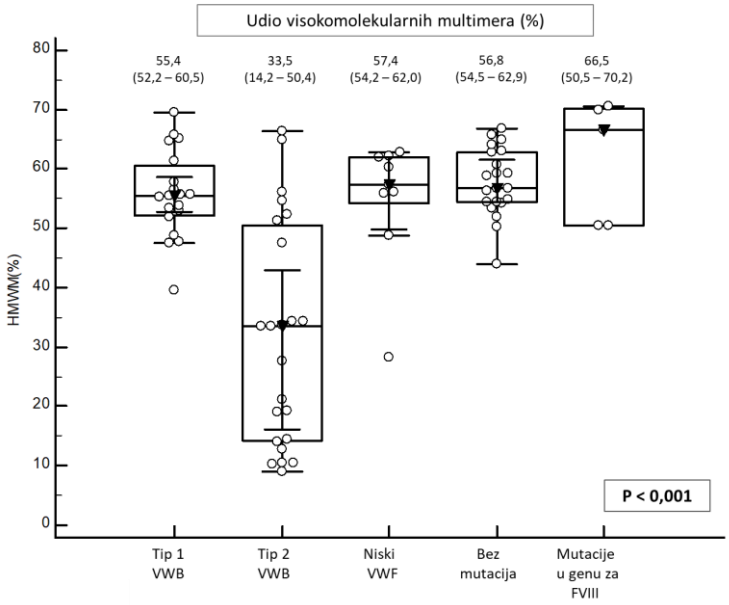
Rezultati su prikazani kao medijani s pripadajućim interkvartilnim rasponima.

P-vrijednost dobivena je Kruskal-Wallisovim testom, $P < 0,05$ smatrao se statistički značajnim.

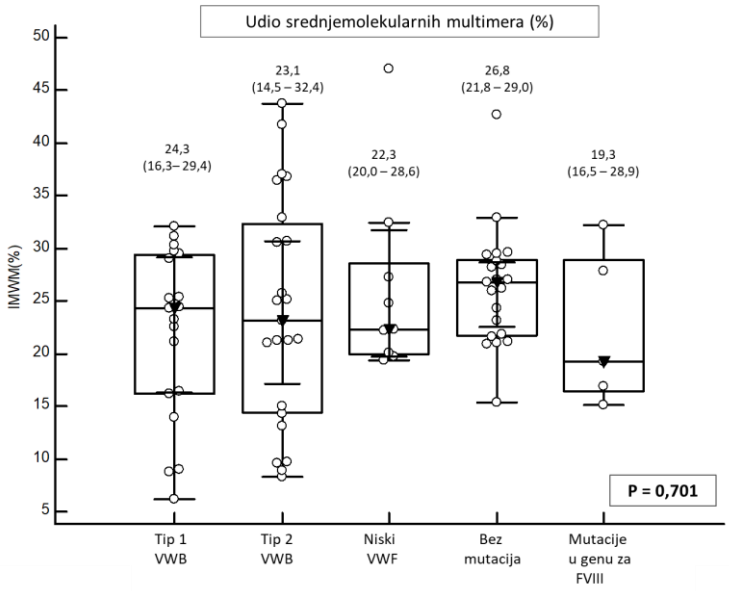
PFA-200 COL/EPI, PFA-200 COL/ADP – kapacitet primarne hemostaze ispitan na uređaju PFA-200 pomoću kolagena te trombocitnih agonista adrenalina i adenozin-difosfata

Usporedbom udjela HMWM-a, IMWM-a i LMWM-a između skupina statistički značajna razlika utvrđena je za HMWM (P < 0,001) i LMWM (P < 0,001), ali ne i za IMWM (P = 0,701) (Slika 14). Zbog uglavnom nemjerljivo niskih razina VWF-a kod ispitanika s tipom 3 VWB-a analiza multimera nije provedena te oni nisu uključeni u ovaj dio statističke obrade.

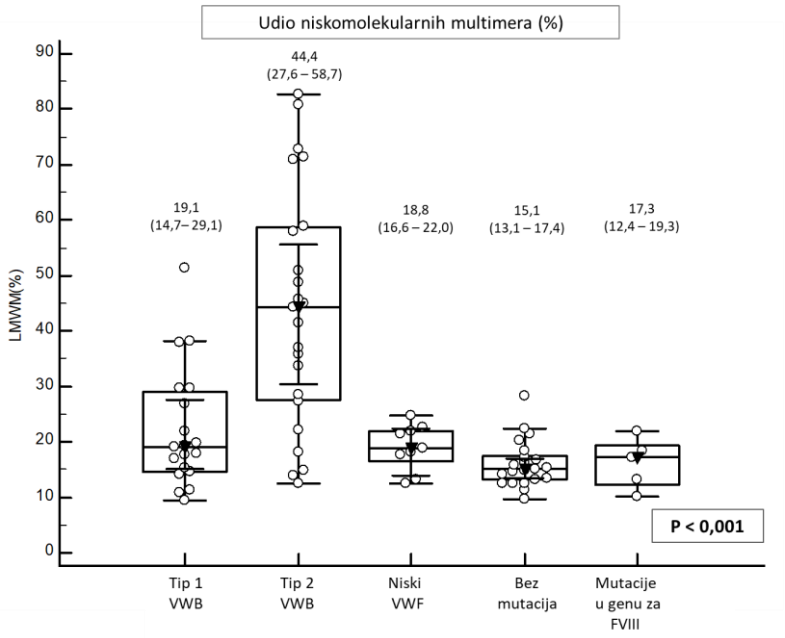
A



B



C



Slika 14. Usporedba rezultata između skupina ispitanika za udjele: (A) visokomolekularnih; (B) srednjemolekularnih i (C) niskomolekularnih multimera

Rezultati su prikazani kao medijani s pripadajućim interkvartilnim rasponima.

P-vrijednost dobivena je Kruskal-Wallisovim testom, $P < 0,05$ smatrao se statistički značajnim.

Rezultati post-hoc analize u svrhu međusobne usporedbe rezultata za koagulacijske pretrage za koje je utvrđena statistički značajna razlika prikazani su u Tablici 16.

Tablica 16. Rezultati post-hoc analize za međusobnu usporedbu između skupina, za koagulacijske pretrage za koje je utvrđena statistički značajna razlika

Skupina	APTV	PFA-200 COL/EPI	PFA-200 COL/ADP	VWF:GPIbM	VWF:Ag	VWF:CB	FVIII	VWF:GPIbM/ VWF:Ag	VWF:CB/ VWF:Ag	FVIII/ VWF:Ag	Udio HMWM	Udio LMWM
Statistički značajna razlika u rezultatima (P < 0,05) utvrđena za:												
Tip 1 VWB (1)	2, 3, HA	BM	Svim skupinama	2, 3, BM	3, BM	3, BM	2, 3, BM, HA	2	BM	2, BM, HA	2	2, BM
Tip 2 VWB (2)	1, 3, BM	Niski, BM, HA	1, Niski, BM, HA	1, 3, BM, HA	3, BM	3, Niski, BM, HA	Svim skupinama	1, Niski, BM, HA	Niski, BM	1, HA	Svim skupinama	Svim skupinama
Tip 3 VWB (3)	1, 2, Niski, BM	Niski, BM, HA	1, Niski, BM, HA	Svim skupinama	Svim skupinama	Svim skupinama	1, 2, Niski, BM	NP	NP	NP	NP	NP
Niski VWF (Niski)	3, BM	2, 3	1, 2, 3, BM	3, BM	3, BM	2, 3, BM	2, 3, BM, HA	2, BM	2	BM, HA	2	2
Bez mutacija (BM)	2, 3, Niski, HA	1, 2, 3	1, 2, 3, Niski	Svim skupinama	Svim skupinama	Svim skupinama	Svim skupinama	2, Niski	1, 2	1, Niski, HA	2	1,2
Mutacije u genu za FVIII (HA)	1, BM	2, 3	1, 2, 3	2, 3, BM	3, BM	2, 3, BM	1, 2, Niski, BM	2	/	1, 2, Niski, BM	2	2

VWB – von Willebrandova bolest; HA – hemofilija A; BM – bez mutacija; PFA COL/EPI, PFA COL/ADP – kapacitet primarne hemostaze ispitan na uređaju PFA-200; VWF – von Willebrandov faktor; VWF:GPIbM: aktivnost von Willebrandova faktora koja se temelji na sposobnosti vezanja GPIb; VWF:CB – test vezanja kolagena; VWF: Ag – antigen von Willebrandova faktora; FVIII – aktivnost faktora zgrušavanja VIII; HMWM – visokomolekularni multimeri; IMWM – niskomolekularni multimeri; NP – nije primjenjivo

5.5. Usporedba simptoma krvarenja i primjenjivane terapije

Simptomi krvarenja svrstani su u 14 kategorija, kao što je definirano u standardiziranom ISTH Upitniku o sklonostima krvarenja (92): epistaksa, krvarenja u kožu, krvarenja iz manjih rana, krvarenja u usnu šupljinu, krvarenja iz probavnog sustava, hematurija, krvarenja pri vađenju zuba, krvarenja pri kirurškim zahvatima, krvarenje u mišić, krvarenja u zglob, krvarenja u središnji živčani sustav te kategorija u koju su svrstana sva ostala krvarenja. Dodatno, kod žena reproduktivne dobi zabilježena je menoragija te, ako su rodile, i obilno poslijeporođajno krvarenje.

Simptomi pojačanog krvarenja utvrđeni su u 76/83 (92 %) ispitanika, od kojih je više oblika krvarenja tijekom života imalo 52/83 (63 %) ispitanika. Tablica 17 prikazuje učestalost pojedinih simptoma krvarenja kod ispitanika uključenih u istraživanje.

Od ukupnog broja ispitanika uključenih u istraživanje, 49 ispitanika primalo je neki oblik terapije povezan s krvarenjima (P = 0,021). Kod svih bolesnika terapija se primjenjivala prema potrebi izuzev jedne bolesnice s tipom 3 VWB-a koja je na kontinuiranoj nadomjesnoj terapiji pripravkom koji sadržava VWF i FVIII (Wilate). Isključivo traneksamičnu kiselinu po potrebi je primalo sedam ispitanika, kod 17 je ispitanika tijekom života primijenjena traneksamična kiselina i nadomjesna terapija pripravcima VWF/FVIII, dok je za 14 ispitanika primijenjena isključivo nadomjesna terapija pripravcima VWF/FVIII. Transfuzija krvi kao i krioprecipitat primijenjeni su kod četiri ispitanika. Pripravke željeza zbog sideropenije uzimalo je 14 ispitanika, pri čemu je statistički veći broj žena (11/14) od muškaraca (3/14), P = 0,003. Devet ispitanika ovog istraživanja podvrgnuto je DDAVP testu, a kod 7/9 utvrđen je dobar odgovor. Tablica 18 prikazuje učestalost primjene pojedinih terapijskih pripravaka i načina liječenja.

Tablica 17. Učestalost simptoma krvarenja kod ispitanika uključenih u istraživanje

Simptom krvarenja	**Broj ispitanika (%)**
Epistakse	35 (42)
Krvarenje u kožu (modrice, petehije, hematomi)	34 (41)
Menoragija	29 (60)*
Produljeno krvarenje iz rana i nakon manjih ozljeda	16 (19)
Produljeno krvarenje nakon vađenja zuba	14 (17)
Produljeno krvarenje nakon kirurškog zahvata	13 (16)
Krvarenje u zglob	10 (12)
Krvarenje u probavni sustav	8 (10)
Krvarenje u usnu šupljinu	7 (8)
Hematurija	2 (2)
Poslijeporođajno krvarenje	2 (17)**
Krvarenje u središnji živčani sustav	2 (2)
Krvarenje u mišić	1 (1)
Ostalo	6 (7)
• subkonjuktivalno krvarenje	2/6
• krvarenje u sinuse	1/6
• postkoitalno krvarenje	1/6
• krvarenje u malu zdjelicu	1/6
• krvarenje iz tonzila	1/6

*udio ženskih ispitanica kod kojih je zabilježena menoragija u ukupnom broju od 48 ispitanica koje su imale menstrualna krvarenja

**udio ženskih ispitanica s obilnim poslijeporođajnim krvarenjem u ukupnom broju od 12 ispitanica koje su rodile

Tablica 18. Primjenjivani terapijski pripravci i načini liječenja kod ispitanika uključenih u istraživanje

Terapijski pristup	Broj ispitanika (%)
Nadomjesna terapija	
• pripravci VWF/FVIII (Wilate, Immunate)	31 (37)
• pripravci FVIII (Haemate P)	2 (2)
Antifibrinolitici	
• traneksamična kiselina (Cyklokapron, Exacyl)	24 (29)
Ostalo	
• pripravci željeza	14 (17)
• hormonska nadomjesna terapija	6 (13)*
• transfuzije eritrocita	5 (6)
• krioprecipitat	4 (5)

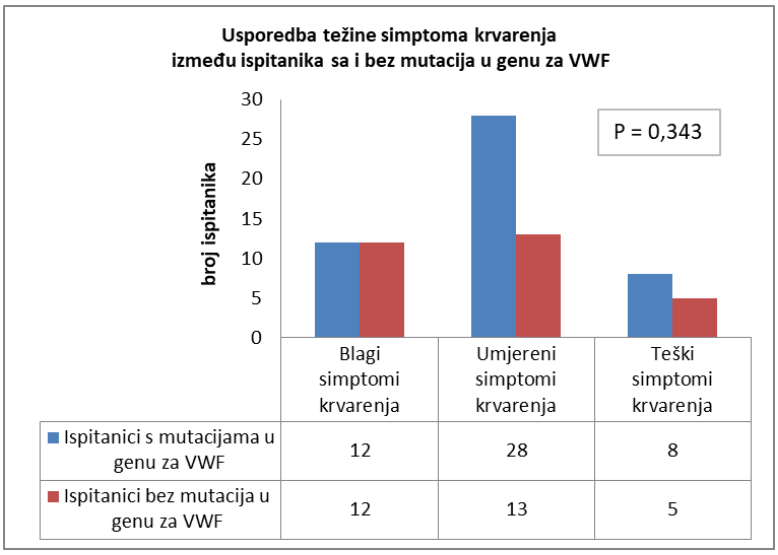
*udio ženskih ispitanica kojima je menoragija regulirana hormonskom nadomjesnom terapijom u ukupnom broju od 48 ispitanica koje su imale menstrualna krvarenja

Simptomi krvarenja dodatno su podijeljeni u tri skupine po težini, kako je prikazano u Tablici 19.

Tablica 19. Podjela simptoma krvarenja po težini

Težina simptoma krvarenja	Uključene vrste krvarenja
Blagi simptomi krvarenja	Epistaksa Krvarenje u kožu (modrice, petehije, hematomi) Produljeno krvarenje iz rana i nakon manjih ozljeda Krvarenje u usnu šupljinu
Umjereni simptomi krvarenja	Krvarenje u probavni sustav Hematurija Krvarenje nakon kirurških zahvata Krvarenje nakon vađenja zuba Menoragija Poslijeporođajno krvarenje
Teški simptomi krvarenja	Krvarenje u mišić Krvarenje u zglobove Krvarenje u središnji živčani sustav

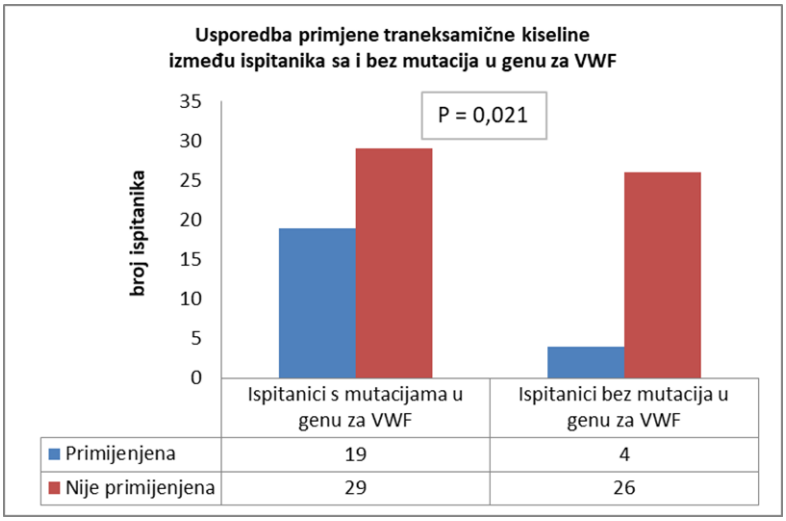
Nema statistički značajne razlike u težini simptoma krvarenja ovisno o prisutnosti mutacija u genu za VWF (P = 0,343), kao što je prikazano na Slici 15.



Slika 15. Usporedba težine simptoma krvarenja između ispitanika s mutacijama i bez njih u genu za von Willebrandov faktor

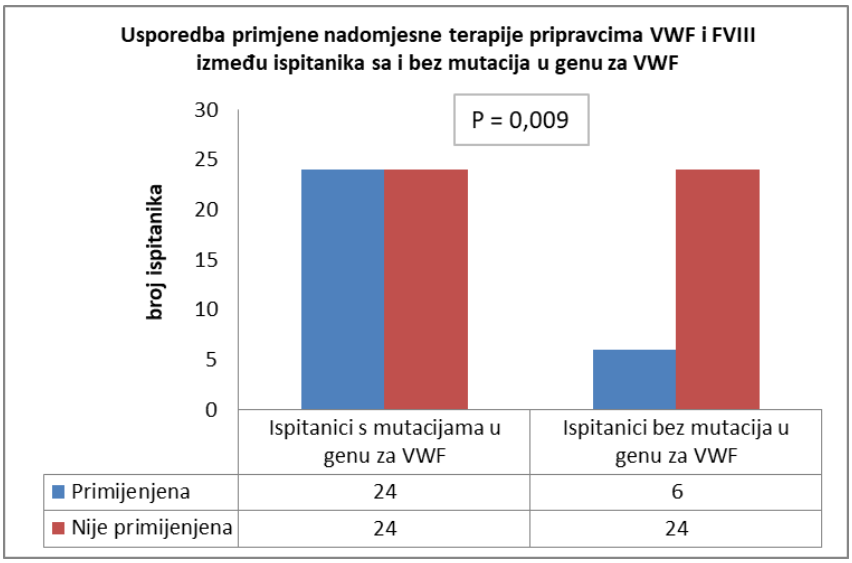
P – vrijednost dobivena je χ^2-testom, P < 0,05 smatrao se statistički značajnim.

Traneksamična kiselina po potrebi je primjenjivana kod statistički većeg broja ispitanika s mutacijama u genu za VWF (P=0,021) u odnosu na one bez mutacija, kako je prikazano na Slici 16, kao i nadomjesna terapija pripravcima VWF i FVIII (P = 0,009) (Slika 17).



Slika 16. Usporedba primjene traneksamične kiseline između ispitanika s mutacijama i bez njih u genu za von Willebrandov faktor

P- vrijednost dobivena je Fisherovim egzaktnim testom, P < 0,05 smatrao se statistički značajnim.



Slika 17. Usporedba primjene nadomjesne terapije pripravcima von Willebrandova faktora i faktora zgrušavanja VIII između ispitanika s mutacijama i bez njih u genu za von Willebrandov faktor

P – vrijednost dobivena Fisherovim egzaktnim testom, P < 0,05 smatrao se statistički značajnim.

Usporedbom simptoma krvarenja između skupina ispitanika prema konačnoj klasifikaciji ustanovljena je statistički značajna razlika u pojavnosti blagih (P = 0,017) i teških simptoma krvarenja (P < 0,001), dok za umjerene simptome krvarenja nije utvrđena statistički značajna razlika (P = 0,190), kako je prikazano u Tablici 20.

Tablica 20. Usporedba pojavnosti simptoma krvarenja prema skupinama ispitanika

Pojavnost	Tip 1 VWB	Tip 2 VWB	Tip 3 VWB	Niski VWF	Uredni nalazi	HA	P
Blagi simptomi krvarenja							
DA	13	9	6	8	16	3	**0,017***
NE	6	14	0	1	5	2	
Umjereni simptomi krvarenja							
DA	12	16	5	5	8	4	0,190
NE	7	7	1	4	13	1	
Teški simptomi krvarenja							
DA	0	3	5	2	3	0	**<0,001***
NE	19	20	1	7	18	5	

VWB – von Willebrandova bolest; VWF – von Willebrandov faktor; HA – hemofilija A

*statistički značajna razlika dobivena χ^2-testom, P < 0,05 smatrao se statistički značajnim

Usporedbom primjene traneksamične kiseline među skupinama ispitanika ovisno o konačnoj klasifikaciji nije utvrđena statistički značajna razlika (P = 0,238), dok je statistički značajna razlika dobivena za primjenu nadomjesne terapije pripravcima VWF i FVIII (P = 0,002) (Tablica 21).

Tablica 21. Usporedba primjene traneksamične kiseline i nadomjesne terapije prema skupinama ispitanika

Primjena	Tip 1 VWB	Tip 2 VWB	Tip 3 VWB	Niski VWF	Uredni nalazi	HA	P
Traneksamična kiselina							
DA	7	10	2	1	3	1	0,238
NE	12	13	4	8	18	4	
Nadomjesna terapija pripravcima VWF i FVIII							
DA	5	13	6	2	4	1	**0,002***
NE	14	10	0	7	17	4	

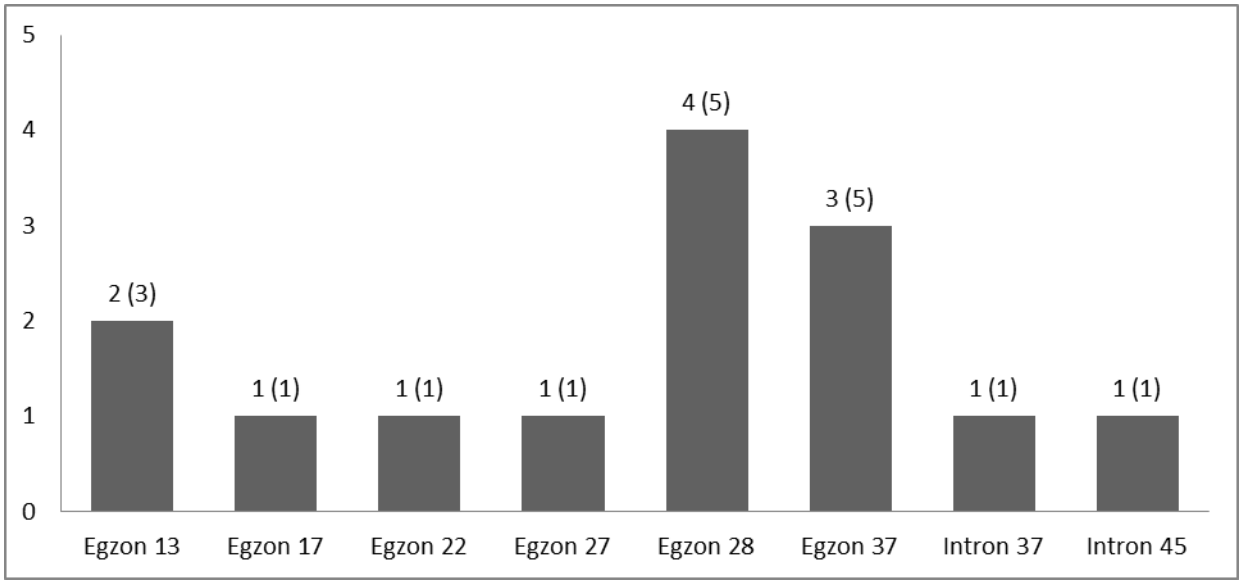
VWB – von Willebrandova bolest; VWF – von Willebrandov faktor; HA – hemofilija A

*statistički značajna razlika dobivena χ^2-testom, P < 0,05 smatrao se statistički značajnim

5.6. Rezultati koagulacijskih pretraga i genetičke analize kod bolesnika s tipom 1 von Willebrandove bolesti

Na temelju rezultata koagulacijskih pretraga i genetičke analize dijagnoza tipa 1 VWB-a postavljena je za 19 ispitanika koji pripadaju 17 obitelji. Mutacije pogrešnog smisla nađene su kod 10 ispitanika, besmislene mutacije kod pet ispitanika, a greške prekrajanja unutar introna i delecije kod po dva ispitanika. Utvrđeno je ukupno 15 različitih mutacija u genu za VWF, od kojih su osam novootkrivene. Svi su ispitanici heterozigoti za mutacije u genu za VWF.

Raspodjela mutacija unutar gena za VWF kod bolesnika s tipom 1 VWB-a koje su dokazane tehnologijom NGS prikazana je na Slici 18. Dodatno je u jednom slučaju nađena delecija egzona 1 do 6 metodom MLPA.



Slika 18. Raspodjela mutacija unutar gena za VWF kod bolesnika s tipom 1 von Willebrandove bolesti koje su dokazane tehnologijom NGS-a

Prikazan je broj različitih mutacija unutar pojedine regije gena za VWF, a u zagradi broj ispitanika s mutacijama u pripadajućoj regiji.

Rezultati usmjerenih koagulacijskih pretraga i genetičke analize prikazani su u Tablici 21. Raspodjela multimera bila je uredna kod svih ispitanika iz ove skupine, a elferogrami su prikazani na Slikama 19 i 20.

Tablica 21. Rezultati usmjerenih koagulacijskih pretraga i genetičke analize kod bolesnika s tipom 1 von Willebrandove bolesti

Ispitanik	Koagulacijske pretrage							Genetička analiza				
	VWF:GPIbM (%)	VWF:Ag (%)	Omjer VWF:GPIbM/ VWF:Ag	FVIII (%)	Omjer FVIII/ VWF:Ag	VWF:CB (%)	Omjer VWF:CB/ VWF:Ag	Regija gena za VWF	Zamjena nukleotida	Promjena aminokiseline	Domena VWF-a	Vrsta mutacije
RI	50-187	50-160	NP	50-149	NP	40-250	NP					
Pedijatrijski ispitanici												
VWB1-1	38,6	36,0	1,07	80	2,22	34,1	0,95	Egzon 13	c.1496A>C*	p.Gln499Pro	D2	Mutacija pogrešnog smisla
VWB1-2	56,5	63,9	0,88	85	1,33	46,2	0,72	Egzon 28	c.4471A>G*	p.Lys1491Glu	A2	Mutacija pogrešnog smisla
VWB1-3	7,8	9,7	0,80	34	3,50	7,8	0,80	Egzon 28	c.4975C>T	p.Arg1659Ter	A2	Besmislena mutacija
VWB1-4	18,3	23,3	0,79	84	3,61	16,8	0,72	Egzon 37	c.6596G>A*	p.Cys2199Tyr	D4	Mutacija pogrešnog smisla
VWB1-5	23,6	24,7	0,96	54	2,19	24,2	0,98	Egzoni 1-6*	NP	NP	D1	Mutacija pomaka okvira čitanja (delecija)
Odrasli ispitanici												
VWB1-6	15,6	19,5	0,80	72	3,69	14,0	0,72	Egzon 13	c.1496A>C*	p.Gln499Pro	D2	Mutacija pogrešnog smisla
VWB1-7	60,8	62,8	0,97	71	1,13	41,9	0,67	Egzon 13	c.1531A>C*	p.Lys511Gln	D2	Mutacija pogrešnog smisla
VWB1-8	41,3	67,8	0,61	72	1,06	50,5	0,74	Egzon 17	c.2269_2270 delCT	p.Leu757Valfs Ter22	D2	Mutacija pomaka okvira čitanja (delecija)
VWB1-9	46,0	60,6	0,76	45	0,74	35,3	0,58	Egzon 22	c.2878C>T	p.Arg960Trp	D3	Mutacija pogrešnog smisla

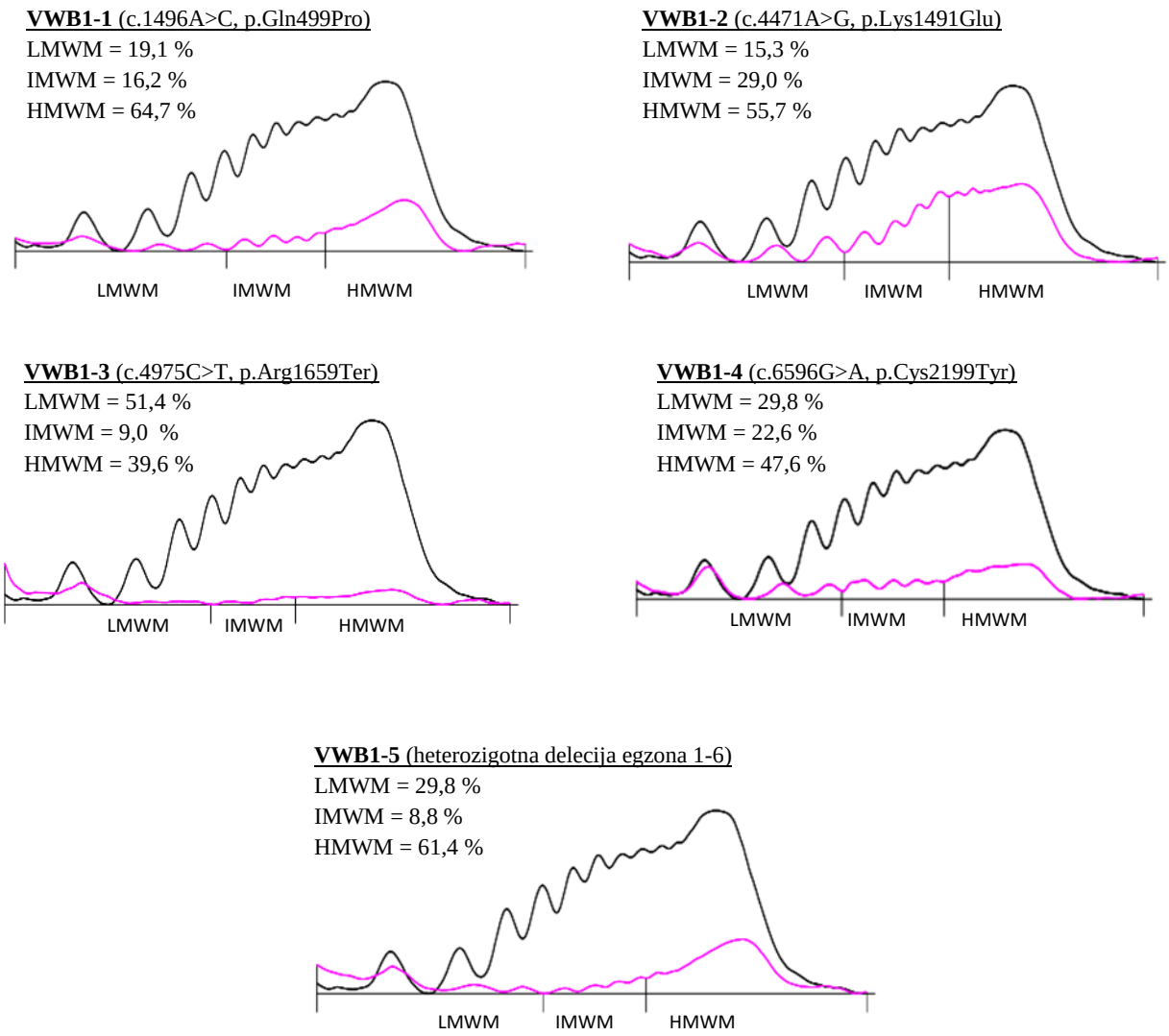
Tablica 21. (nastavak) Rezultati usmjerenih koagulacijskih pretraga i genetičke analize kod bolesnika s tipom 1 von Willebrandove bolesti

Ispitanik	Koagulacijske pretrage							Genetička analiza				
	VWF:GPIbM (%)	VWF:Ag (%)	Omjer VWF:GPIbM/ VWF:Ag	FVIII (%)	Omjer FVIII/ VWF:Ag	VWF:CB (%)	Omjer VWF:CB/ VWF:Ag	Regija gena za VWF	Zamjena nukleotida	Promjena aminokiseline	Domena VWF-a	Vrsta mutacije
RI	50-187	50-160	NP	50-149	NP	40-250	NP					
Odrasli ispitanici												
VWB1-10	17,2	18,0	0,96	22	1,22	14,2	0,79	Egzon 27	c.3614G>A	p.Arg1205His	D3	Mutacija pogrešnog smisla
VWB1-11	53,3	56,5	0,94	70	1,24	46,6	0,82	Egzon 28	c.4696C>T	p.Arg1566Ter	A2	Besmislena mutacija
VWB1-12	83,7	92,3	0,91	32	0,35	64,7	0,70	Egzon 28	c.4751A>G	p.Tyr1584Cys	A2	Mutacija pogrešnog smisla
VWB1-13	43,4	55,4	0,78	92	1,66	42,0	0,76	Egzon 28	c.4975C>T	p.Arg1659Ter	A2	Besmislena mutacija
VWB1-14	58,8	78,1	0,75	89	1,14	62,9	0,81	Egzon 37	c.6479A>G*	p.Tyr2160Cys	D4	Mutacija pogrešnog smisla
VWB1-15	50	77,7	0,64	180	2,32	32,3	0,42	Egzon 37	c.6504C>A*	p.Cys2168Ter	D4	Besmislena mutacija
VWB1-16	36,6	48,5	0,75	104	2,14	32,4	0,67					
VWB1-17	28,7	27,2	1,06	43	1,58	18,0	0,66	Egzon 37	c.6596G>A*	p.Cys2199Tyr	D4	Mutacija pogrešnog smisla
VWB1-18	39,7	51,5	0,77	74	1,44	28,1	0,55	Intron 37	c.6599 -2A>G*	NP	NP	Greška prekrajanja
VWB1-19	65,8	65,3	1,01	81	1,24	45,3	0,69	Intron 45	c.7729 +7C>T	NP	NP	Greška prekrajanja

*****novootkrivene mutacije u genu za VWF

VWB1-1 i VWB1-6, VWB-4 i VWB-17 te VWB-15 i VWB-16 u krvnom su srodstvu.

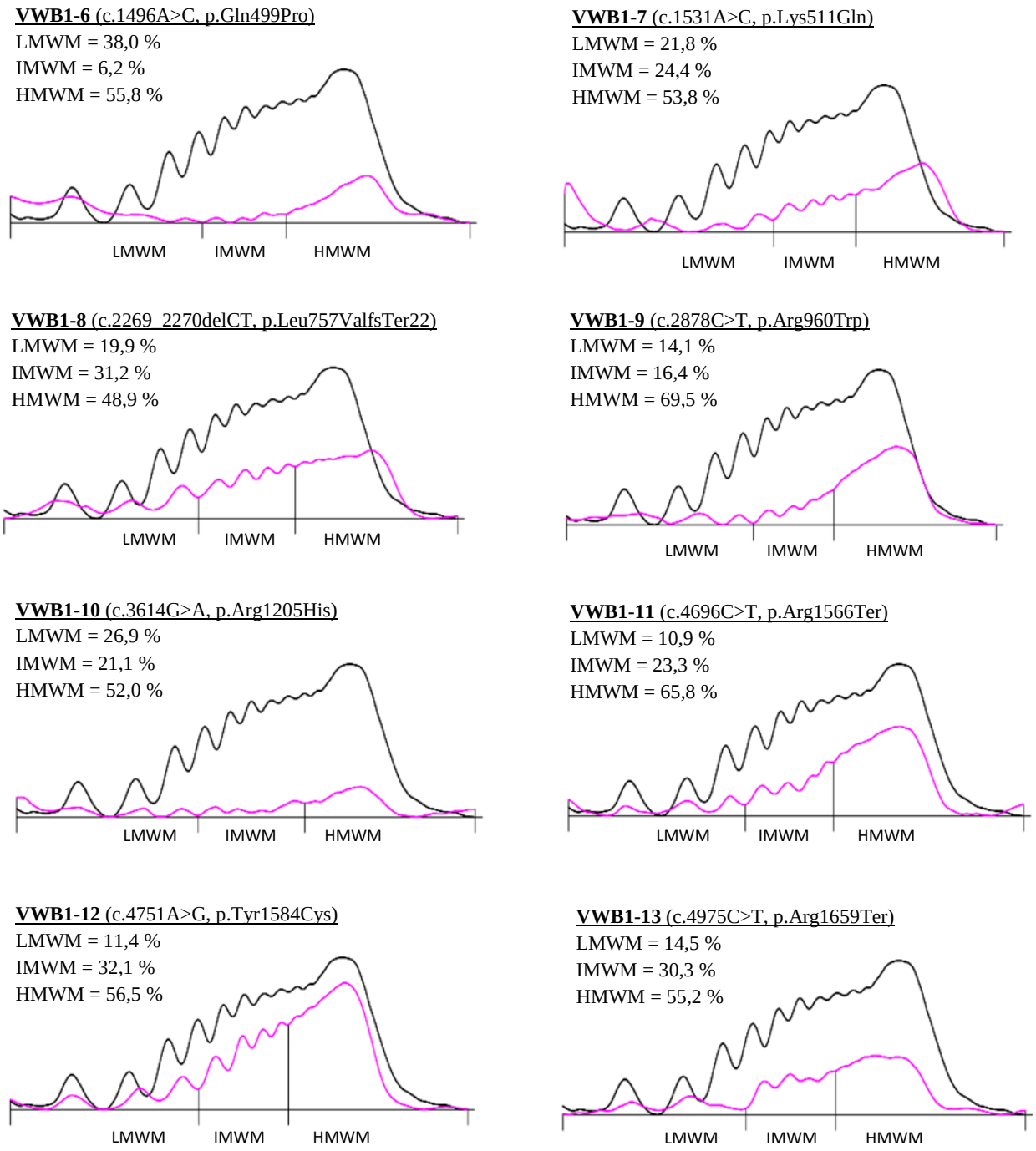
RI – referentni interval; VWB – von Willebrandova bolest; VWF – von Willebrandov faktor; VWF:GPIbM – aktivnost von Willebrandova faktora koja se temelji na sposobnosti vezanja GPIb; VWF:CB: test vezanja kolagena; VWF: Ag – antigen von Willebrandova faktora; FVIII – faktor zgrušavanja VIII



Slika 19. Elferogrami raspodjele multimera kod pedijatrijskih ispitanika s tipom 1 von Willebrandove bolesti

Ružičasta linija označava profil multimera u uzorku ispitanika, a crna u uzorku normalne plazme.

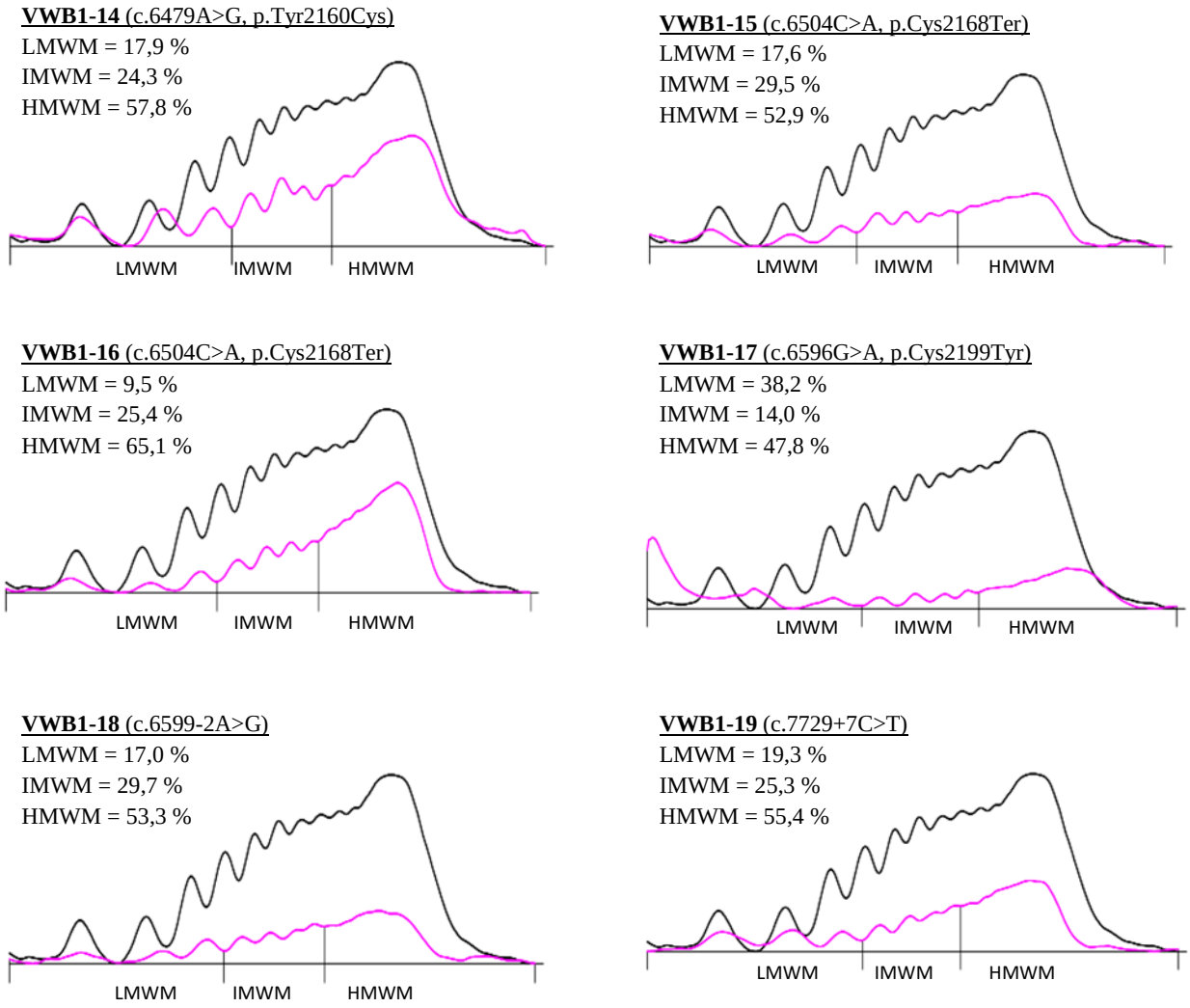
LMWM – niskomolekularni multimeri; IMWM – srednjemolekularni multimeri; HMWM – visokomolekularni multimeri



Slika 20. Elferogrami raspodjele multimera kod odraslih ispitanika s tipom 1 von Willebrandove bolesti

Ružičasta linija označava profil multimera u uzorku ispitanika, a crna u uzorku normalne plazme.

LMWM – niskomolekularni multimeri; IMWM – srednjemolekularni multimeri; HMWM – visokomolekularni multimeri

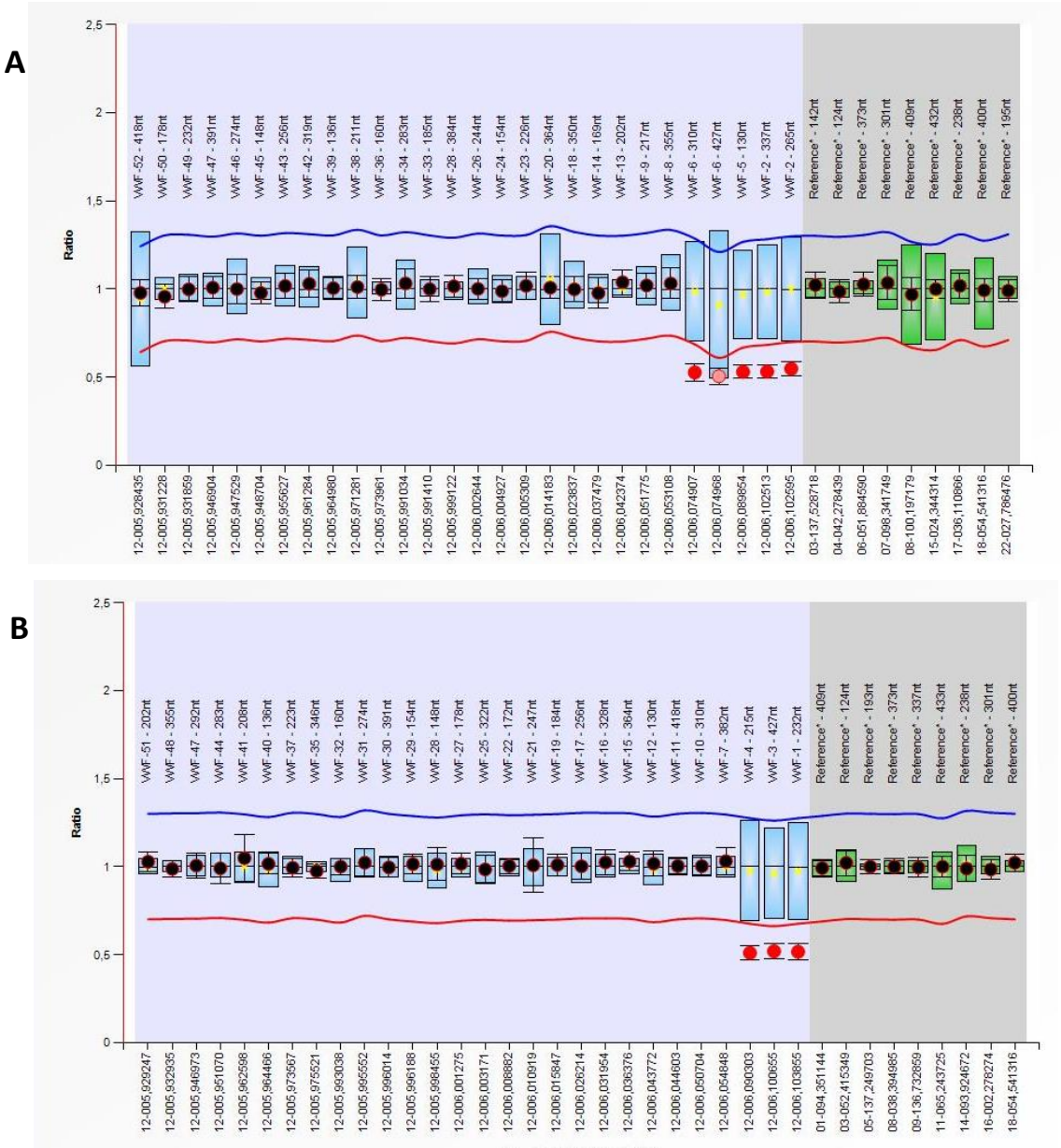


Slika 20. (nastavak) Elferogrami raspodjele multimera kod odraslih ispitanika s tipom 1 von Willebrandove bolesti

Ružičasta linija označava profil multimera u uzorku ispitanika, a crna u uzorku normalne plazme.

LMWM – niskomolekularni multimeri; IMWM – srednjemolekularni multimeri; HMWM – visokomolekularni multimeri

Kod ispitanika VWB1-5 nađena je tehnologijom MLPA jedna kopija gena za VWF u području od egzona 1 do egzona 6, što upućuje na to da se radi o heterozigotnoj deleciji. Slika 21 prikazuje rezultate MLPA analize.

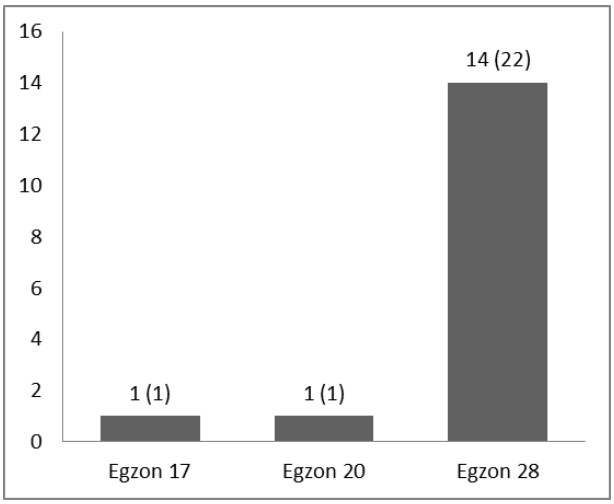


Slika 21. Rezultati MLPA analize za ispitanika VWB1-5 kod kojeg je kompletom sondi SALSA MLPA P011 VWF (A) dokazana jedna kopija gena u području egzona 2, 5 i 6 gena za VWF, a kompletom sondi SALSA MLPA P012 VWF (B) jedna kopija gena u području egzona 1, 3 i 4 gena za VWF

5.7. Rezultati koagulacijskih pretraga i genetičke analize kod bolesnika s tipom 2 von Willebrandove bolesti

Analizom rezultata koagulacijskih pretraga i genetičke analize dijagnoza tipa 2 VWB-a postavljena je za 23 ispitanika koji pripadaju 12 obitelji. Za 15 ispitanika postavljena je dijagnoza 2A, za sedam tipa 2B, a za jednu ispitanicu tipa 2N VWB-a.

Unutar ove skupine ukupno je nađeno 16 različitih mutacija, a raspodjela unutar gena za VWF prikazana je na Slici 22. Kod svih ispitanika iz ove skupine radilo se o mutacijama pogrešnog smisla, sve su se pojavile u heterozigotnom obliku, pri čemu je kod četvero ispitanika (VWB2-1, VWB2-12, VWB2-13, VWB2-19) utvrđen genotip složenih heterozigota. Dvije su mutacije novootkrivene, a radi se o različitim supstitucijama nukleotida na istom mjestu unutar gena (c.3829G>T i c.3829G>C).



Slika 22. Raspodjela mutacija unutar gena za VWF kod bolesnika s tipom 2 von Willebrandove bolesti

Prikazan je broj različitih mutacija unutar pojedine regije gena za VWF, a u zagradi broj ispitanika s mutacijama u pripadajućoj regiji.

U Tablici 22 prikazani su rezultati koagulacijskih pretraga i genetičke analize za bolesnike s tipom 2 VWB-a, dok Slika 23 prikazuje rezultate analize multimera za pedijatrijske, a Slika 24 za odrasle ispitanike.

Tablica 22. Rezultati usmjerenih koagulacijskih pretraga i genetičke analize kod bolesnika s tipom 2 von Willebrandove bolesti

Ispitanik	Koagulacijske pretrage							Genetička analiza					
	VWF:GPIbM (%)	VWF:Ag (%)	Omjer VWF:GPIbM/ VWF:Ag	FVIII (%)	Omjer FVIII/ VWF:Ag	VWF:CB (%)	Omjer VWF:CB/ VWF:Ag	Egzon	Zamjena nukleotida	Promjena aminokiseline	Domena VWF-a	Vrsta mutacije	Podtip VWB-a
RI	50-187	50-160	NP	50-149	NP	40-250	NP						
Pedijatrijski ispitanici													
VWB2-1	75,7	73,5	1,03	93	1,27	59,0	0,80	28	c.3797C>T	p.Pro1266Leu	A1	Mutacija pogrešnog smisla	2B
								28	c.3835G>A	p.Val1279Ile	A1	Mutacija pogrešnog smisla	
VWB2-2	16,3	22,4	0,73	55	2,46	19,3	0,86	28	c.3829G>T*	p.Asp1277Tyr	A1	Mutacija pogrešnog smisla	2A
VWB2-3	7,2	12,4	0,58	38	3,06	12,6	1,02	28					2A
VWB2-4	8,6	21,1	0,41	44	2,09	20,6	0,98	28					2A
VWB2-5	9,3	19,2	0,48	46	2,40	18,0	0,94	28	c.3829G>C*	p.Asp1277His	A1	Mutacija pogrešnog smisla	2A
VWB2-6	47,0	59,1	0,80	78	1,32	36,8	0,62	28	c.3923G>A	p.Arg1308His	A1	Mutacija pogrešnog smisla	2A
VWB2-7	16,1	57,8	0,28	61	1,06	36,4	0,63	28	c.3946G>A	p.Val1316Met	A1	Mutacija pogrešnog smisla	2B
VWB2-8	8,0	42,8	0,19	24	0,56	14,4	0,34	28					2B
VWB2-9	< 4,0	19,8	NP	25	1,26	8,5	0,43	28	c.4517C>T	p.Ser1506Leu	A2	Mutacija pogrešnog smisla	2A

Tablica 22. (nastavak) Rezultati usmjerenih koagulacijskih pretraga i genetičke analize kod bolesnika s tipom 2 von Willebrandove bolesti

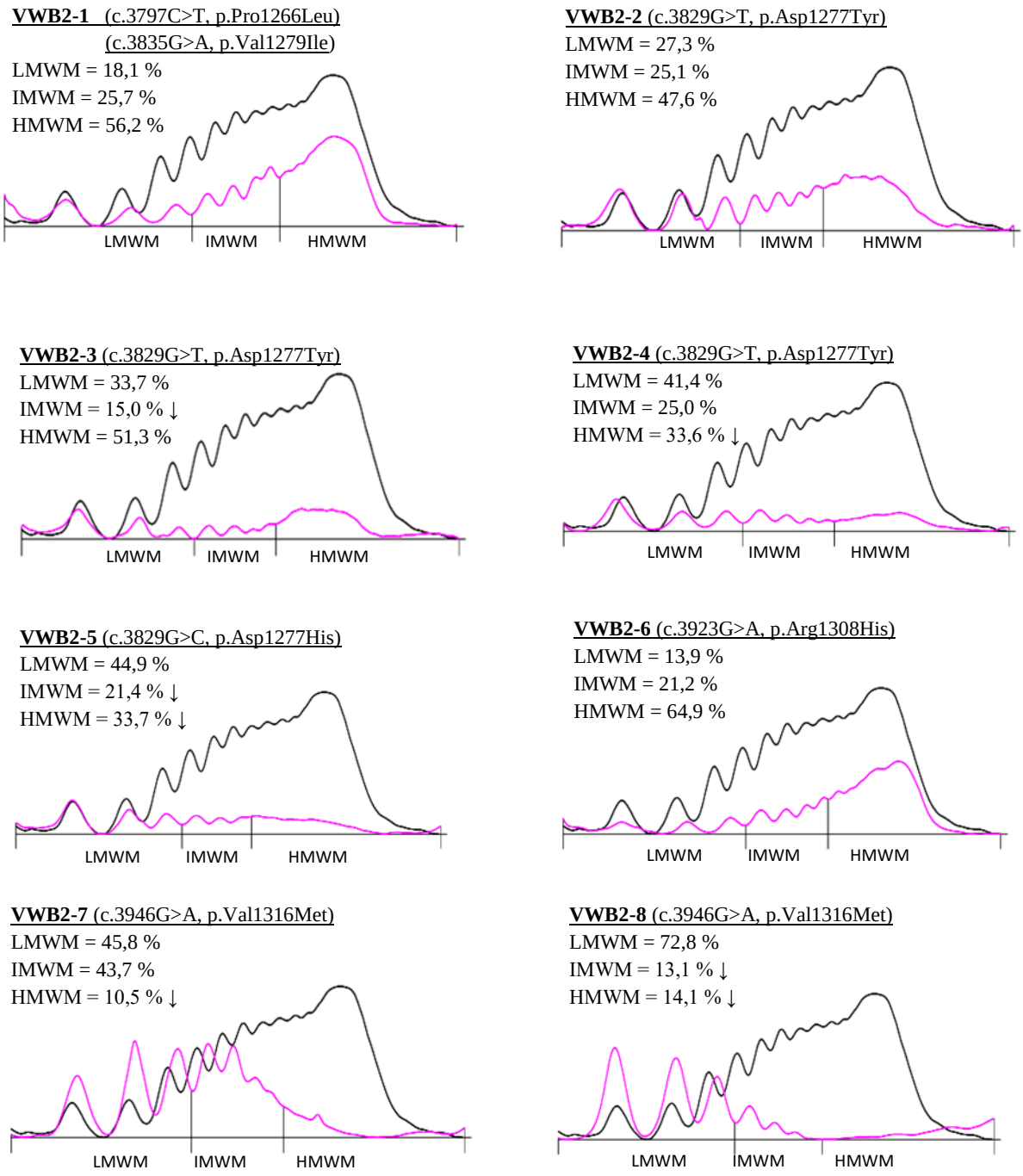
Ispitanik	Koagulacijske pretrage							Genetička analiza					
	VWF:GPIbM (%)	VWF:Ag (%)	Omjer VWF:GPIbM/ VWF:Ag	FVIII (%)	Omjer FVIII/ VWF:Ag	VWF:CB (%)	Omjer VWF:CB/ VWF:Ag	Egzon	Zamjena nukleotida	Promjena aminoksieline	Domena VWF-a	Vrsta mutacije	Podtip VWB-a
RI	50 - 187	50 - 160	NP	50 - 149	NP	40 - 250	NP						
Pedijatrijski ispitanici													
VWB2-10	13,4	59,0	0,23	89	1,51	20,2	0,34	28	c.4645G>A	p.Glu1549Lys	A2	Mutacija pogrešnog smisla	2A
VWB2-11	25,7	47,7	0,54	64	1,34	39,2	0,82	28	c.4717G>A	p.Gly1573Ser	A2	Mutacija pogrešnog smisla	2A
Odrasli ispitanici													
VWB2-12	57,9	53,6	1,08	66	1,23	58,1	1,08	17	c.2278C>T	p.Arg760Cys	D2	Mutacija pogrešnog smisla	2N
								20	c.2561G>A	p.Arg854Gln	D'	Mutacija pogrešnog smisla	
VWB2-13	126,4	102,5	1,23	92	0,90	79,3	0,77	28	c.3797C>T	p.Pro1266Leu	A1	Mutacija pogrešnog smisla	2B
								28	c.3835G>A	p.Val1279Ile	A1	Mutacija pogrešnog smisla	
VWB2-14	10,9	17,2	0,63	21	1,22	10,1	0,59	28	c.3829G>T*	p.Asp1277Tyr	A1	Mutacija pogrešnog smisla	2A
VWB2-15	15,3	30,3	0,50	41	1,35	22,4	0,74						2A

Tablica 22. (nastavak) Rezultati usmjerenih koagulacijskih pretraga i genetičke analize kod bolesnika s tipom 2 von Willebrandove bolesti

Ispitanik	Koagulacijske pretrage							Genetička analiza					
	VWF:GPIbM (%)	VWF:Ag (%)	Omjer VWF:GPIbM/ VWF:Ag	FVIII (%)	Omjer FVIII/ VWF:Ag	VWF:CB (%)	Omjer VWF:CB/ VWF:Ag	Egzon	Zamjena nukleotida	Promjena aminokiseline	Domena VWF-a	Vrsta mutacije	Podtip VWB-a
RI	50-187	50-160	NP	50-149	NP	40-250	NP						
Odrasli ispitanici													
VWB2-16	21,8	63,6	0,34	32	0,50	34,4	0,54	28	c.3946G>A	p.Val1316Met	A1	Mutacija pogrešnog smisla	2B
VWB2-17	16,0	54,6	0,29	30	0,55	27,8	0,51						2B
VWB2-18	39,8	66,8	0,60	48	0,72	42,5	0,64	28	c.4010C>T	p.Pro1337Leu	A1	Mutacija pogrešnog smisla	2B
VWB2-19	10,7	32,1	0,33	61	1,90	23,7	0,74	28	c.4027A>G	p.Ile1343Val	A1	Mutacije pogrešnog smisla	2A
								28	c.4133C>T	p.Ser1378Phe	A1		
VWB2-20	7,7	41,9	0,18	24	0,57	15,8	0,38	28	c.4121G>A	p.Arg1374His	A1	Mutacija pogrešnog smisla	2A
VWB2-21	<4,0	13,5	NP	10	0,74	3,7	0,27	28	c.4517C>T	p.Ser1506Leu	A2	Mutacija pogrešnog smisla	2A
VWB2-22	5,6	51,6	0,11	39	0,76	13,3	0,26	28	c.4645G>A	p.Glu1549Lys	A2	Mutacija pogrešnog smisla	2A
VWB2-23	11,4	51,0	0,22	34	0,67	20,9	0,41	28	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	A2	Mutacija pogrešnog smisla	2A

*novootkrivene mutacije u genu za von Willebrandov faktor; VWB2-2, VWB2-3, VWB2-4, VWB2-14 i VWB2-15; VWB2-1 i VWB2-13; VWB2-7, VWB2-8, VWB2-16 i VWB2-17; VWB2-9 i VWB2-21 te VWB2-10 i VWB2-22 u krvnom su srodstvu.

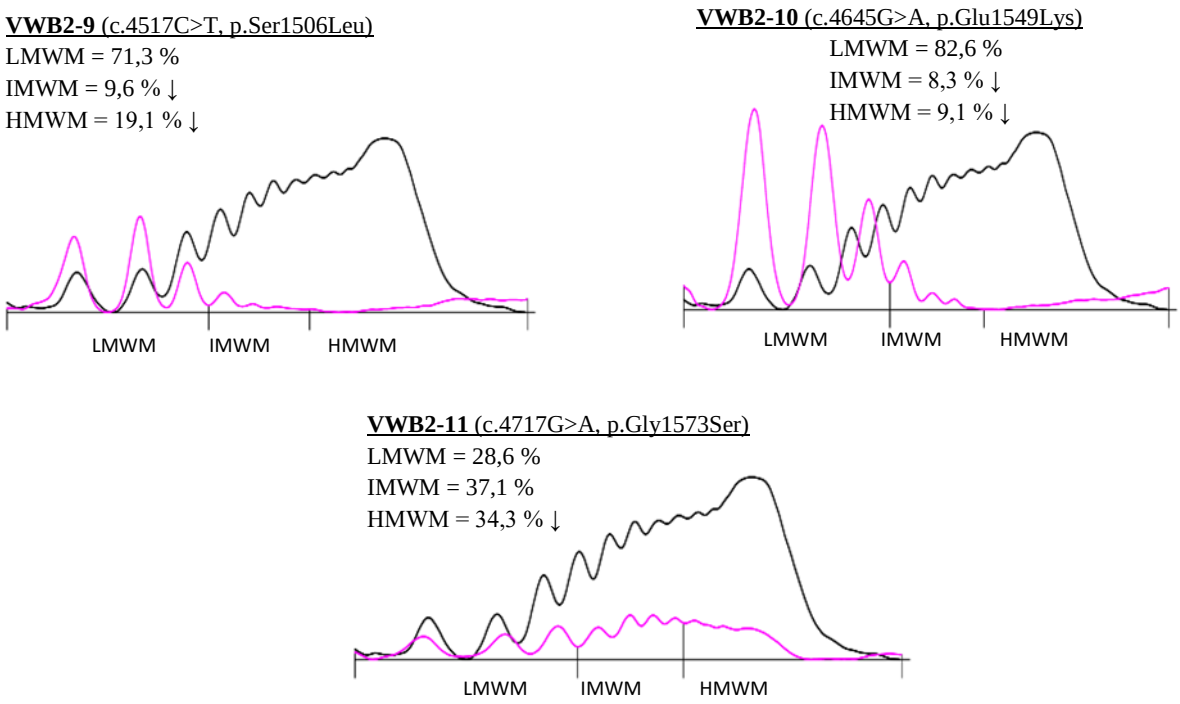
VWB – von Willebrandova bolest; VWF – von Willebrandov faktor; VWF:GPIbM – aktivnost von Willebrandova faktora koja se temelji na sposobnosti vezanja GPIb; VWF:CB – test vezanja kolagena; VWF: Ag – antigen von Willebrandova faktora; FVIII – faktor zgrušavanja VIII



Slika 23. Elferogrami raspodjele multimera kod pedijatrijskih ispitanika s tipom 2 von Willebrandove bolesti

Ružičasta linija označava profil multimera u uzorku ispitanika, a crna u uzorku normalne plazme.

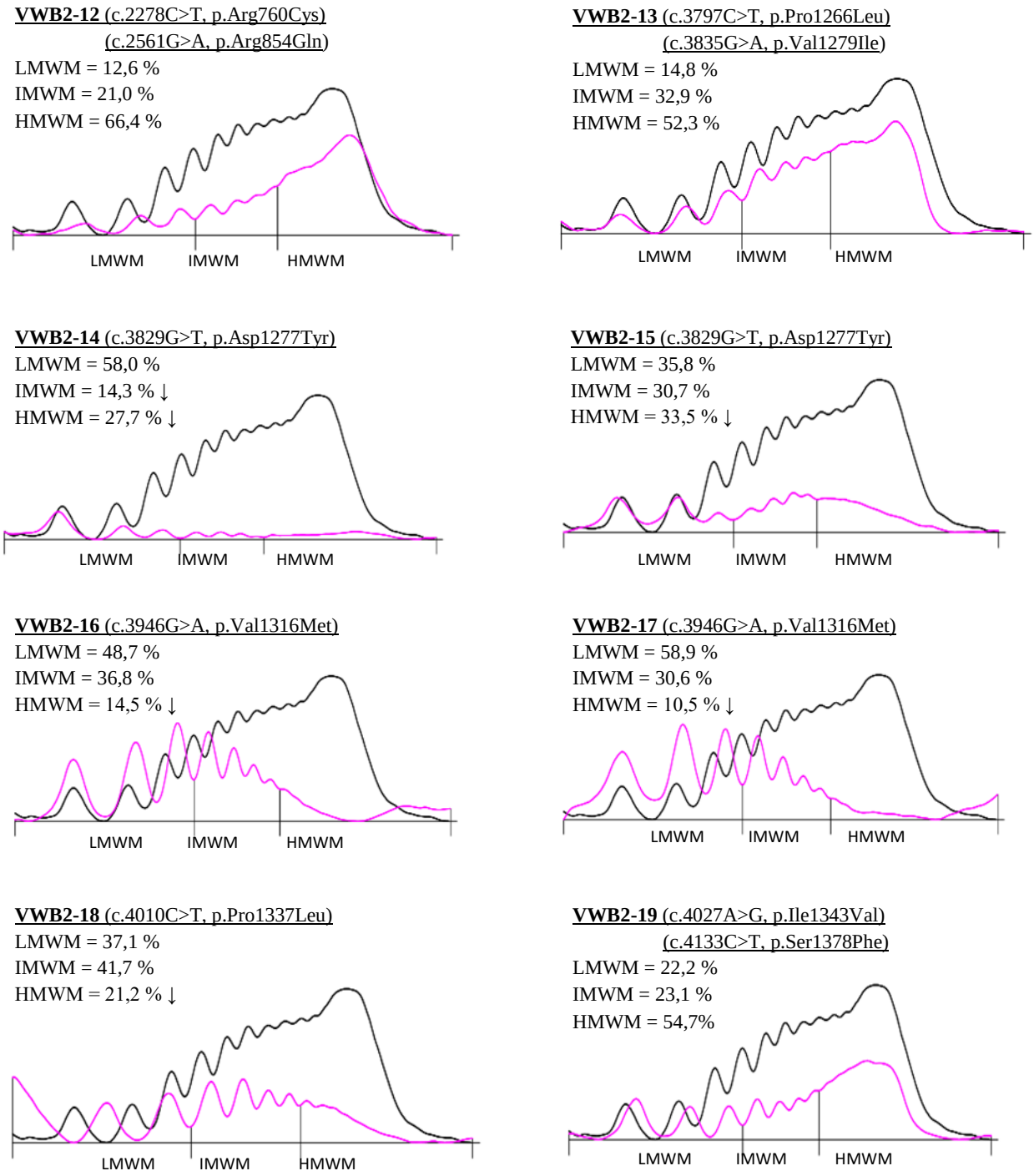
LMWM – niskomolekularni multimeri; IMWM – srednjemolekularni multimeri; HMWM – visokomolekularni multimeri



Slika 23. (nastavak) Elferogrami raspodjele multimera kod pedijatrijskih ispitanika s tipom 2 von Willebrandove bolesti

Ružičasta linija označava profil multimera u uzorku ispitanika, a crna u uzorku normalne plazme.

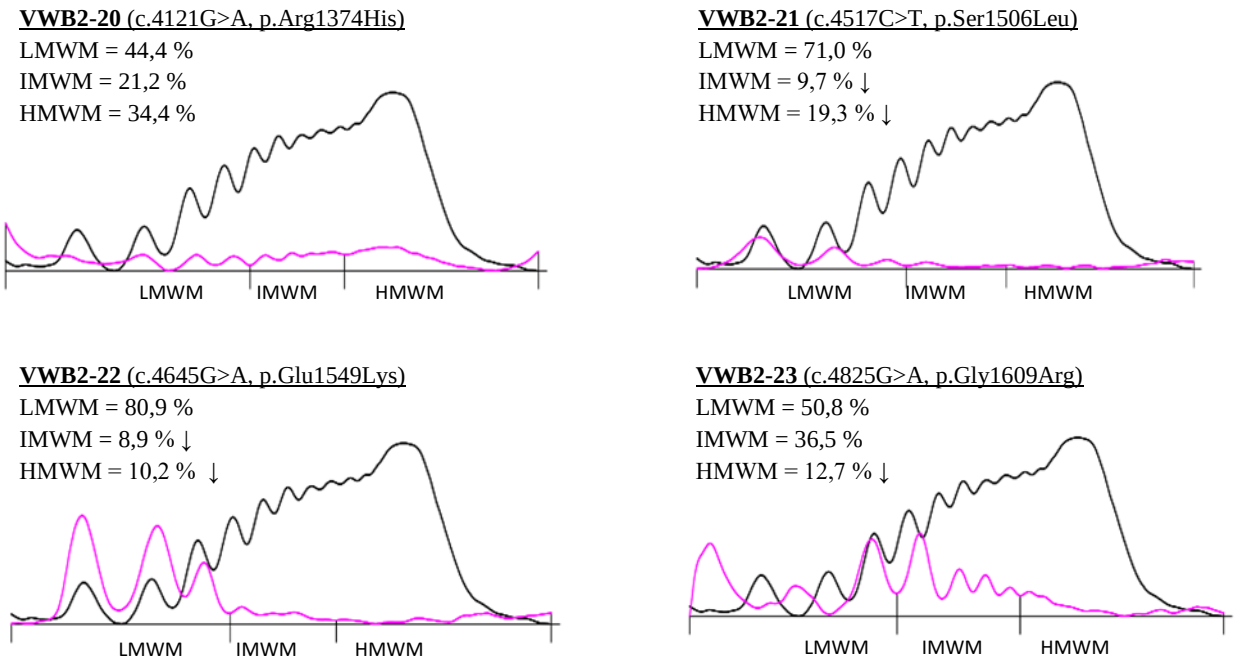
LMWM – niskomolekularni multimeri; IMWM – srednjemolekularni multimeri; HMWM – visokomolekularni multimeri



Slika 24. Elferogrami raspodjele multimera kod odraslih ispitanika s tipom 2 von Willebrandove bolesti

Ružičasta linija označava profil multimera u uzorku ispitanika, a crna u uzorku normalne plazme.

LMWM – niskomolekularni multimeri; IMWM – srednjemolekularni multimeri; HMWM – visokomolekularni multimeri



Slika 24. (nastavak) Elferogrami raspodjele multimera kod odraslih ispitanika s tipom 2 von Willebrandove bolesti

Ružičasta linija označava profil multimera u uzorku ispitanika, a crna u uzorku normalne plazme.

LMWM – niskomolekularni multimeri; IMWM – srednjemolekularni multimeri; HMWM – visokomolekularni multimeri

5.8. Rezultati koagulacijskih pretraga i genetičke analize kod bolesnika s tipom 3 von Willebrandove bolesti

Tablica 23 prikazuje rezultate usmjerenih koagulacijskih pretraga i genetičke analize za šest odraslih ispitanika kojima je dijagnosticiran tip 3 VWB-a. Ispitanici pripadaju pet obitelji.

Ukupno je utvrđeno šest različitih mutacija u genu za VWF, od kojih su tri novootkrivene. Delecija c.2435delC (p.Pro812ArgfsTer31) nađena je u homozigotnom obliku kod dvoje ispitanika koji nisu u krvnom srodstvu. Od troje ispitanika koji su složeni heterozigoti, dvoje su iz iste obitelji (VWB3-4, VWB3-5).

Tablica 23. Rezultati usmjerenih koagulacijskih pretraga i genetičke analize kod bolesnika s tipom 3 von Willebrandove bolesti

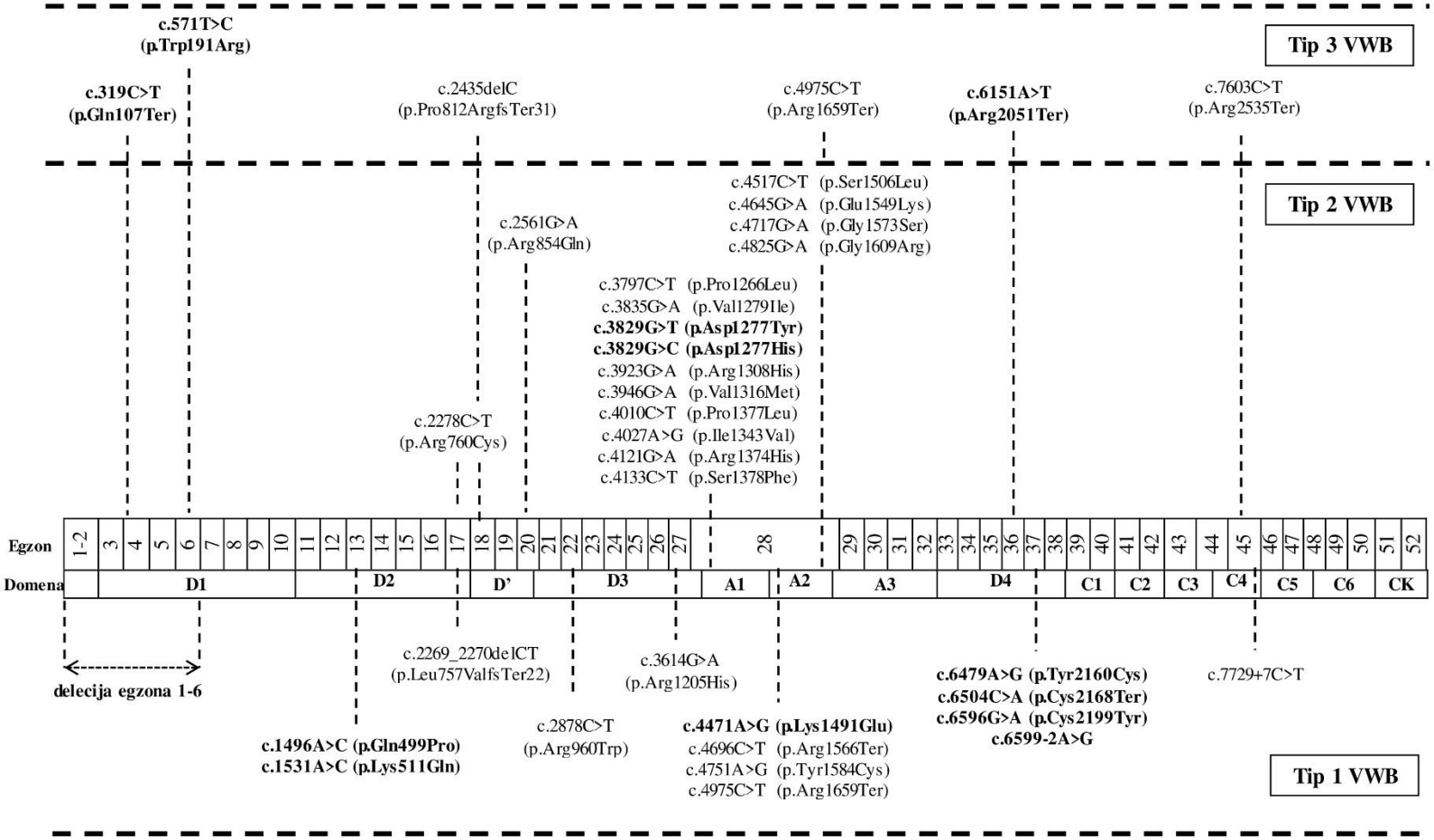
Ispitanik	Koagulacijske pretrage				Genetička analiza					
	VWF:GPIbM (%)	VWF:Ag (%)	FVIII (%)	VWF:CB (%)	Egzon	Zamjena nukleotida	Promjena aminokiseline	Domena VWF-a	Vrsta mutacije	Genotip
RI	50-187	50-160	50-149	40-250						
VWB3-1	7,7	7,3	35	3,5	18	c.2435delC	p.Pro812ArgfsTer31	D'	Mutacija pomaka okvira čitanja (delecija)	Hom
VWB3-2	< 4,0	< 4,0	4	< 1,0						
VWB3-3	< 4,0	< 4,0	5	< 1,0	28	c.4975C>T	p.Arg1659Ter	A2	Besmislena mutacija	Hom
VWB3-4	8,3	< 4,0	5	< 1,0	4	c.319C>T*	p.Gln107Ter	D1	Besmislena mutacija	Het
VWB3-5	< 4,0	< 4,0	0,8	< 1,0	36	c.6151A>T*	p.Arg2051Ter	D4	Besmislena mutacija	Het
VWB3-6	< 4,0	< 4,0	5	< 1,0	6	c.571T>C*	p.Trp191Arg	D1	Mutacija pogrešnog smisla	Het
					45	c.7603C>T	p.Arg2535Ter	C4	Besmislena mutacija	Het

*novootkrivene mutacije u genu za VWF;

VWB3-4 i VWB3-5 u krvnom su srodstvu.

RI – referentni interval; VWB – von Willebrandova bolest; VWF – von Willebrandov faktor; VWF:GPIbM: aktivnost von Willebrandova faktora koja se temelji na sposobnosti vezanja GPIb; VWF:CB – test vezanja kolagena; VWF: Ag – antigen von Willebrandova faktora; FVIII – aktivnost faktora zgrušavanja VIII; Het – heterozigot; Hom – homozigot

5.9. Skupni prikaz utvrđenih mutacija u genu za von Willebrandov faktor



Slika 25. Skupni prikaz svih utvrđenih mutacija u genu za von Willebrandov faktor prema tipovima von Willebrandove bolesti

Masno su otisnute novootkivene mutacije. VWB – von Willebrandova bolest

5.10. Rezultati usmjerenih koagulacijskih pretraga i genetičke analize kod bolesnika kod kojih su utvrđene mutacije u genu za FVIII

Kod pet ispitanika (dva muškog i tri ženskog spola) utvrđene su mutacije u genu za FVIII, od kojih su muški ispitanici braća, a jedna od ženskih ispitanica njihova majka. Muški ispitanici bili su homozigoti te je kod njih postavljena dijagnoza blage hemofilije A, dok su ženske ispitanice imale mutaciju u heterozigotnom obliku i smatraju se nositeljicama hemofilije A. Kod jedne je ispitanice uz mutaciju u genu za FVIII dodatno nađena i mutacija u genu za VWF koja je nađena i kod jednog ispitanika s tipom 1 VWB-a (c.6479A>G). Sve su utvrđene mutacije mutacije pogrešnog smisla, a ukupno su utvrđene tri različite mutacije u genu za FVIII, od kojih su dvije novootkrivene (c.1553A>C i c.6253G>A).

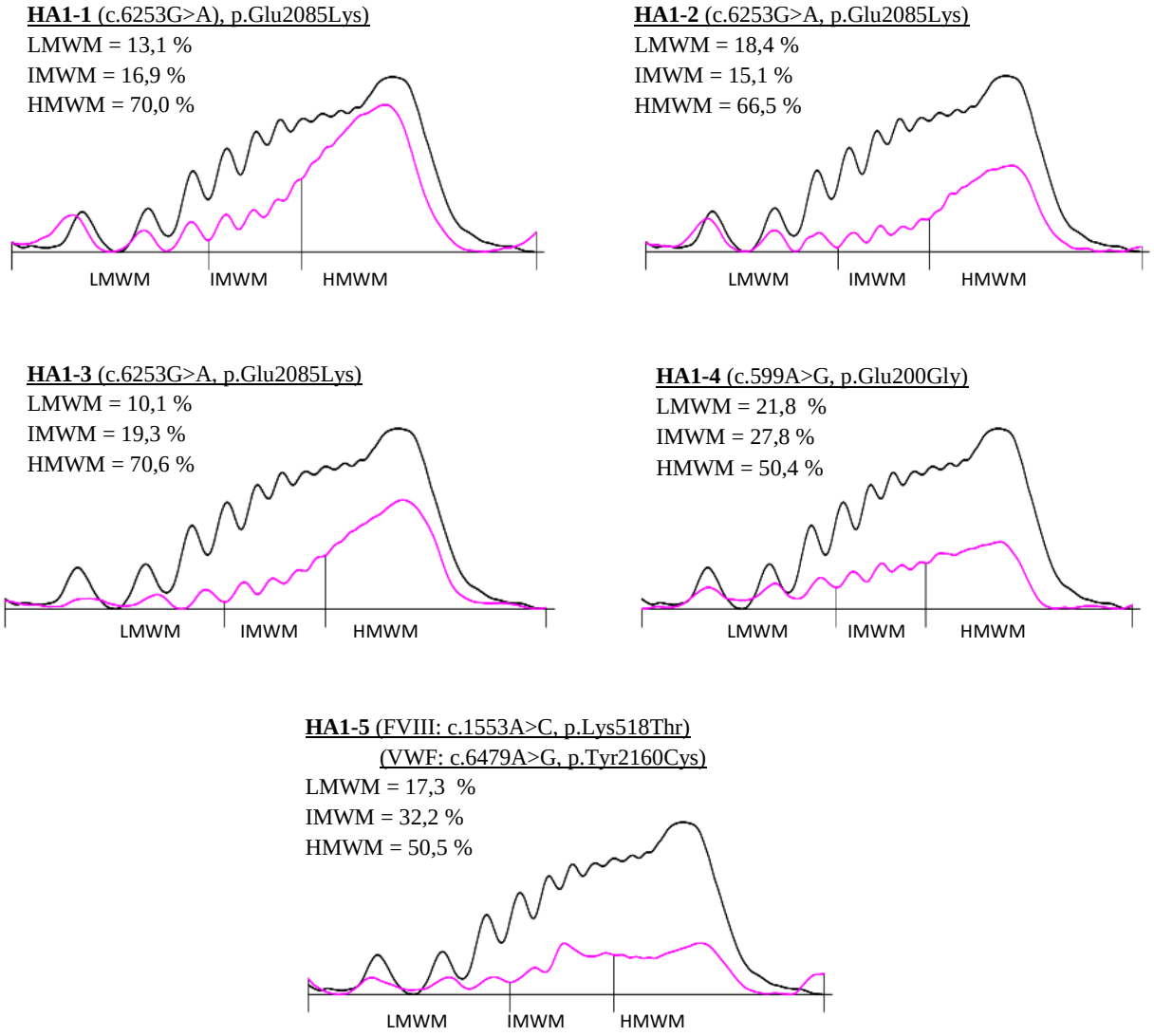
Tablica 24 prikazuje rezultate koagulacijskih pretraga i genetičke analize za ispitanike iz ove skupine, dok su rezultati analize multimera VWF-a prikazani na Slici 26.

Tablica 24. Rezultati usmjerenih koagulacijskih pretraga i genetičke analize kod bolesnika s mutacijama u genu za FVIII

Ispitanik	Spol	Koagulacijske pretrage							Genetička analiza					
		VWF:GPIbM (%)	VWF:Ag (%)	Omjer VWF:GPIbM/ VWF:Ag	FVIII (%)	Omjer FVIII/ VWF:Ag	VWF:CB (%)	Omjer VWF:CB/ VWF:Ag	Gen	Egzon	Zamjena nukleotida	Promjena aminokiseline	Vrsta mutacije	Genotip
RI		50 - 187	50 - 160	NP	50 - 149	NP	40 - 250	NP						
Pedijatrijski ispitanici														
HA-1	M	43,8	45,7	0,96	17	0,37	38,6	0,84	FVIII	21	c.6253G>A*	p.Glu2085Lys	Mutacija pogrešnog smisla	Hom
HA-2	M	69,4	70,5	0,98	23	0,33	71,2	1,01	FVIII					
Odrasli ispitanici														
HA-3	Ž	52,2	52,9	0,99	45	0,85	46,0	0,87	FVIII	21	c.6253G>A*	p.Glu2085Lys	Mutacija pogrešnog smisla	Het
HA-4	Ž	56,6	62,6	0,90	23	0,37	35,1	0,56	FVIII	4	c.599A>G	p.Glu200Gly	Mutacija pogrešnog smisla	Het
HA-5	Ž	50,9	53,0	0,96	19	0,36	38,0	0,72	FVIII	11	c.1553A>C*	p.Lys518Thr	Mutacija pogrešnog smisla	Het
									VWF	37	c.6479A>G*	p.Tyr2160Cys	Mutacija pogrešnog smisla	Het

*novootkrivene mutacije; HA-1, HA-2 i HA-3 su u krvnom srodstvu

RI – referentni interval; HA – hemofilija A; VWF:GPIbM - aktivnost von Willebrandova faktora koja se temelji na sposobnosti vezanja GPIb; VWF:CB - test vezanja kolagena; VWF:Ag – antigen von Willebrandova faktora; FVIII – aktivnost faktora zgrušavanja VIII; Het – heterozigot; Hom – homozigot



Slika 26. Elferogrami raspodjele multimera kod ispitanika s mutacijama u genu za FVIII

Ružičasta linija označava profil multimera u uzorku ispitanika, a crna u uzorku normalne plazme.

HA – hemofilija A; FVIII – faktor zgrušavanja VIII; VWF – von Willebrandov faktor; LMWM – niskomolekularni multimeri; IMWM – srednjemolekularni multimeri; HMWM – visokomolekularni multimeri

5.11. Ispitanici bez mutacija u genima za von Willebrandov faktor i faktor zgrušavanja VIII

Ukupno je nađeno 30 ispitanika bez utvrđenih mutacija u genima za VWF i FVIII. Od toga je devet imalo vrijednosti VWF:GPIbM ispod 50 %, zbog čega su svrstani u kategoriju tzv. ,,niskog VWF-a“.

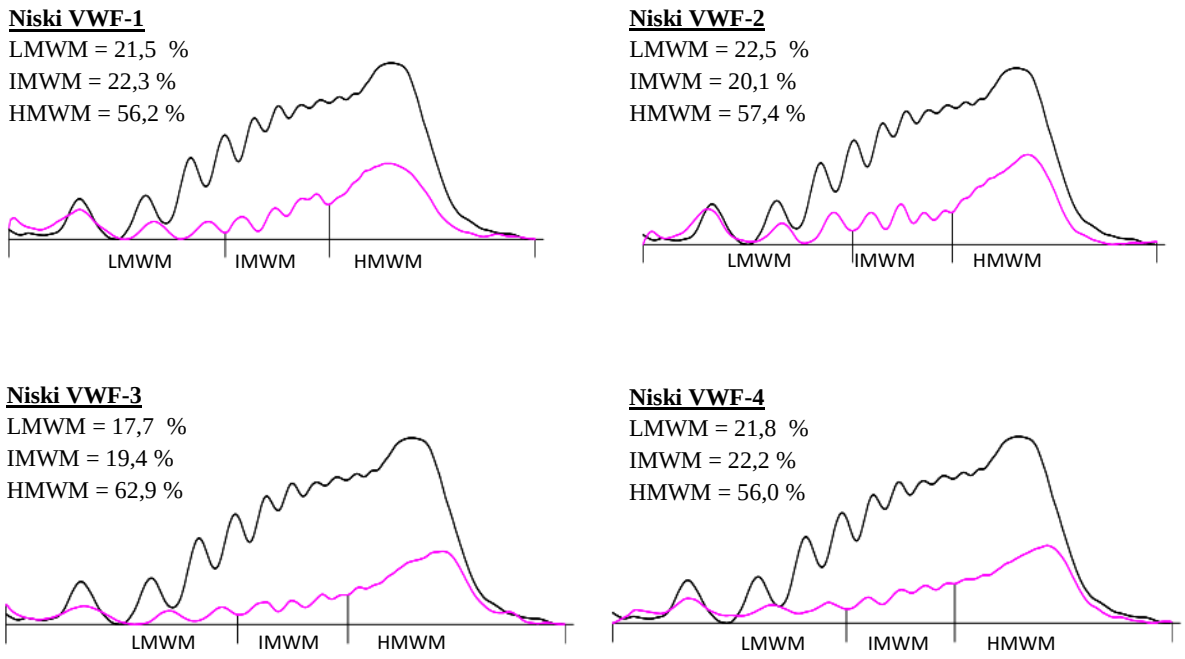
5.11.1. Ispitanici klasificirani kao ,,niski VWF“

U Tablici 25 prikazani su rezultati usmjerenih koagulacijskih pretraga za devet ispitanika klasificiranih kao ,,niski VWF“, a Slike 27 i 28 prikazuju rezultate analize multimera za pedijatrijske, odnosno odrasle ispitanike iz ove skupine.

Tablica 25. Rezultati usmjerenih koagulacijskih pretraga kod ispitanika koji su kategorizirani kao ,,niski VWF“

Ispitanik	VWF:GPIbM (%)	VWF:Ag (%)	Omjer VWF:GPIbM/ VWF:Ag	FVIII (%)	Omjer FVIII/ VWF:Ag	VWF:CB (%)	Omjer VWF:CB/ VWF:Ag
Referentni interval	50-187	50-160	NP	50-149	NP	40-250	NP
Pedijatrijski ispitanici							
Niski VWF-1	33,9	48,6	0,70	77	1,58	43,2	0,89
Niski VWF-2	41,4	59,5	0,70	96	1,61	60,5	1,02
Niski VWF-3	43,0	54,6	0,79	70	1,28	38,4	0,70
Niski VWF-4	46,7	49,8	0,94	68	1,37	44,9	0,90
Odrasli ispitanici							
Niski VWF-5	6,9	14,7	0,47	14	0,95	6,1	0,41
Niski VWF-6	30,6	39,1	0,78	102	2,61	38,0	0,97
Niski VWF-7	41,4	33,1	1,25	51	1,54	27,8	0,84
Niski VWF-8	45,5	57,3	0,79	98	1,71	51,7	0,90
Niski VWF-9	49,6	56,3	0,88	43	0,76	38,0	0,67

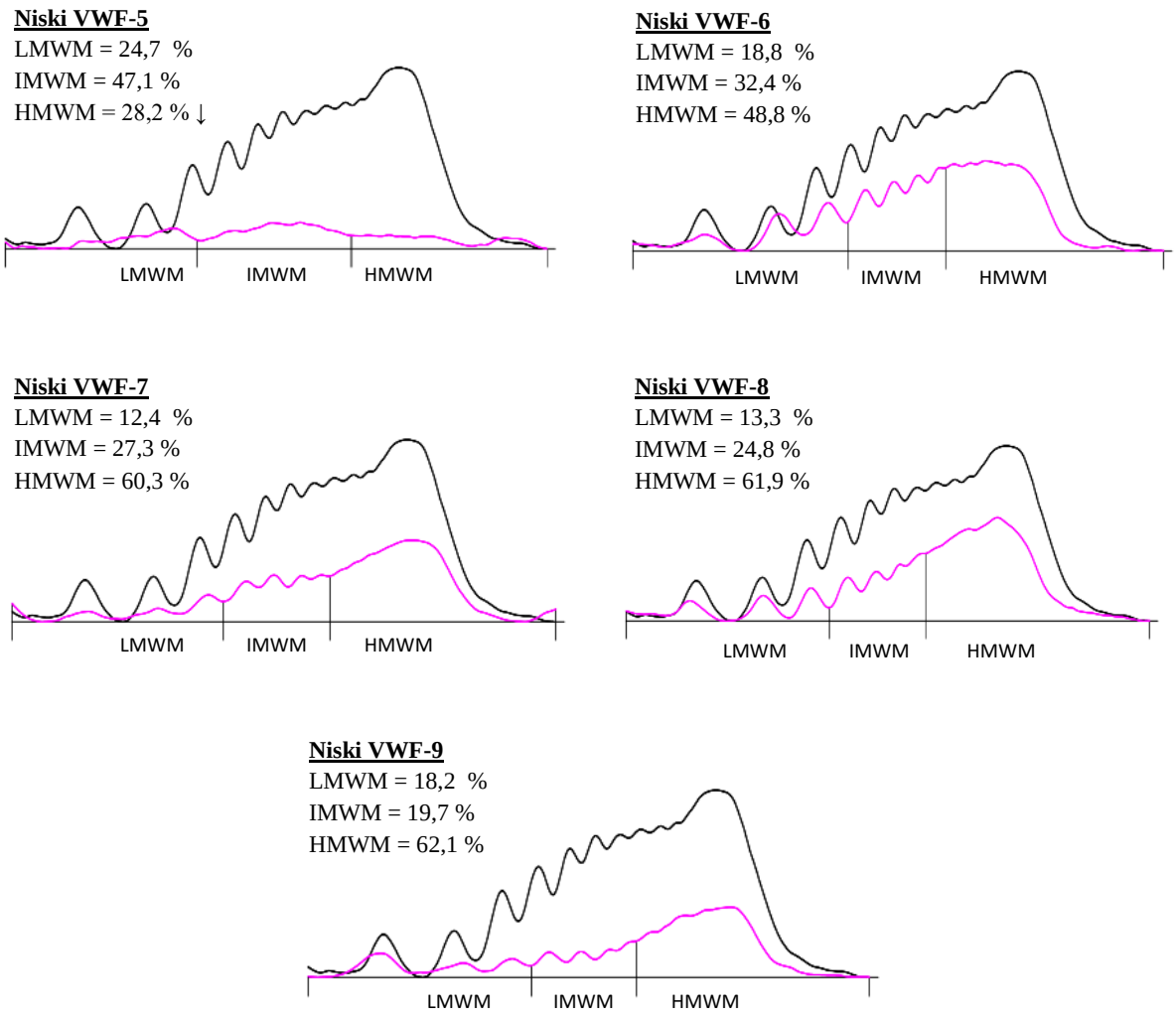
VWF – von Willebrandov faktor; NP – nije primjenjivo; VWF:GPIbM - aktivnost von Willebrandova faktora koja se temelji na sposobnosti vezanja GPIb; VWF:CB - test vezanja kolagena; VWF: Ag – antigen von Willebrandova faktora; FVIII – aktivnost faktora zgrušavanja VIII



Slika 27. Elferogrami raspodjele multimera za pedijatrijske ispitanike klasificirane kao ,,niski VWF“

Ružičasta linija označava profil multimera u uzorku ispitanika, a crna u uzorku normalne plazme.

VWF – von Willebrandov faktor; LMWM – niskomolekularni multimeri; IMWM – srednjemolekularni multimeri; HMWM – visokomolekularni multimeri



Slika 28. Elferogrami raspodjele multimera za odrasle ispitanike klasificirane kao ,,niski VWF“

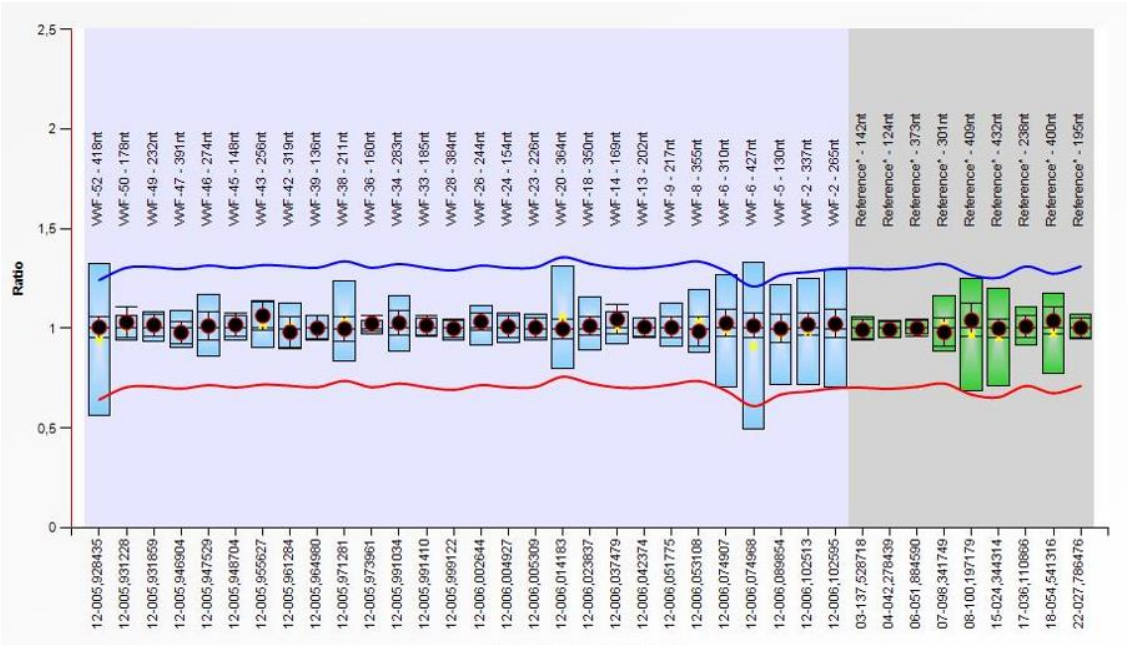
Ružičasta linija označava profil multimera u uzorku ispitanika, a crna u uzorku normalne plazme.

VWF – von Willebrandov faktor; LMWM – niskomolekularni multimeri; IMWM – srednjemolekularni multimeri; HMWM – visokomolekularni multimeri

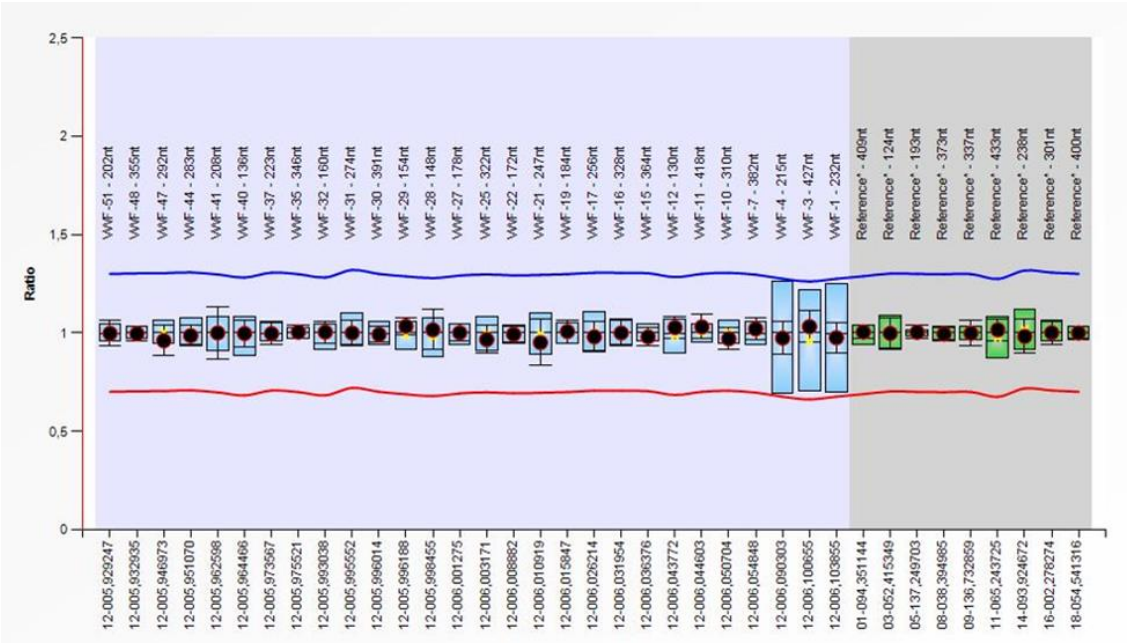
Svim ispitanicima iz skupine ,,niskog VWF-a“ dodatno je napravljena genetička analiza tehnologijom MLPA, međutim kod svih je utvrđen uredan broj kopija svih egzona gena za VWF.

Slika 29A prikazuje uredan nalaz MLPA analize učinjene kompletom sondi P011 VWF, dok Slika 29B prikazuje rezultat dobiven kompletom sondi P012 VWF kod ispitanika Niski VWF-5, koji je od svih ispitanika iz ove skupine imao najniže vrijednosti VWF:GPIbM, VWF:Ag, VWF:CB i FVIII.

A



B



Slika 29. Rezultati MLPA analize za ispitanika Niski VWF-5 dobiveni kompletima sondi SALSA MLPA P011 VWF (A) i P012 VWF (B). U svim egzonima dokazane su dvije kopije gena za VWF.

5.11.2. Ostali ispitanici bez mutacija u genima za von Willebrandov faktor i faktor zgrušavanja VIII

Preostali 21 ispitanik bez mutacija u genima za VWF i FVIII imali su rezultate broja trombocita, PV-a, VWF:GPIbM, VWF:Ag, VWF:CB, FVIII unutar referentnih intervala te urednu raspodjelu multimera VWF-a. Blago produljen APTV utvrđen je kod četiri ispitanika, PFA-200 COL/EPI bio je produljen kod šest ispitanika, od kojih je kod dvoje bio produljen i COL/ADP, dok je jedna ispitanica imala produljen samo COL/ADP. Skupni rezultati svih koagulacijskih pretraga za ove ispitanike prikazani su u Tablici 15. poglavlja 5.4.

6. RASPRAVA

U ovom je istraživanju prvi put u hrvatskoj populaciji primijenjen cjelovit pristup u dijagnostici VWB-a koji se sastoji od probirnih i specifičnih koagulacijskih pretraga te molekularnih analiza svih sljednih varijanti u genima za VWF i FVIII. Dobiveni rezultati upozorili su na znatnu laboratorijsku, kliničku i genetičku heterogenost VWB-a, omogućili jednoznačno postavljanje dijagnoze VWB-a, pravilnu klasifikaciju prema podtipovima bolesti te diferencijalno dijagnostičko razlučivanje VWB-a od blage hemofilije A.

Od ukupno 83 ispitanika, 54 su bile žene, a takav nerazmjer spolova očekivan je s obzirom na to da se, zbog fizioloških krvarenja tijekom života, žene generativne dobi učestalije javljaju liječnicima te dijagnostički provjeravaju u smislu prisutnosti VWB-a, a time i dvostruko češće dobivaju dijagnozu VWB-a nego muškarci (2).

Prisutnost mutacija u genu za VWF potvrđena je kod 48 ispitanika. Rezultati genetičke analize upotpunjeni su koagulacijskih pretragama koje odražavaju funkcionalne i strukturne promjene VWF-a te je u konačnici dijagnoza tipa 1 VWB-a postavljena kod 19 ispitanika, tipa 2 kod 23 ispitanika, a tipa 3 kod šest ispitanika. Kod dva muška ispitanika postavljena je dijagnoza blage hemofilije A na temelju prisutnosti mutacije u genu za FVIII u homozigotnom obliku, dok su tri ispitanice zbog prisutnosti heterozigotnih mutacija u genu za FVIII klasificirane kao nositeljice hemofilije A. Kod jedne je fenotip krvarenja dodatno kompliciran prisutnošću mutacije u genu za VWF.

Heterogenost genetičke osnove posebice je izražena kod bolesnika s tipom 1 VWB-a zbog rasprostranjenosti mutacija duž čitavog gena za VWF, što je dokazano u više neovisnih istraživanja u populacijama iz različitih geografskih područja (82, 93, 94). Najčešće se radi o mutacijama pogrešnog smisla koje su prisutne kod oko 75 % bolesnika, dok se manji udio odnosi na male insercije i delecije (5 %), greške prekrajanja unutar intronskih regija (7 %), besmislene mutacije (2 %), a utvrđene su i mutacije unutar promotorske regije (11 %). Vrsta mutacije i lokalizacija unutar gena određuju vrstu i stupanj poremećaja VWF-a, a što se odražava izrazito varijabilnim kliničkim slikama krvarenja, od neprimjetnih i vrlo blagih fenotipova do teških oblika bolesti koji zahtijevaju redovno praćenje, prilagodbu uobičajenih aktivnosti i učestale primjene terapijskih pripravaka. U skladu s time su i rezultati koagulacijskih pretraga koji se kreću od vrlo blagog manjka VWF-a preko umjerenog manjka do izrazito sniženih razina VWF-a. Bez obzira na vrstu mutacije, bolesnici s tipom 1 VWB-a gotovo su bez iznimke heterozigoti (73, 95). Među uključenim ispitanicima s tipom 1 VWB-a

također je utvrđen isključivo heterozigotni genotip i velika raspršenost mutacija unutar gena za VWF koja je obuhvatila područja od egzona 1 do 37 te dva introna. Najveći udio u vrsti mutacije odnosi se na mutacije pogrešnog smisla koje su nađene kod deset ispitanika, dok su besmislene mutacije utvrđene kod pet, delecije kod dva ispitanika i greške prekrajanja unutar introna kod dvije ispitanice. Rezultati VWF:GPIbM, VWF:Ag, FVIII i VWF:CB bili su uredni kod čak šest ispitanika, što dodatno upućuje na otežano prepoznavanje blagih oblika tipa 1 VWB-a samo na temelju jedne laboratorijske obrade. Stres, upala, tjelesna aktivnost i ostali čimbenici koji povisuju reaktante akutne faze mogu prikriti blagi manjak VWF-a. Zbog toga se kod bolesnika kod kojih postoji jasna klinička slika krvarenja VWB ne smije isključiti samo na temelju jednoga urednog nalaza koagulacijskih pretraga. Prema preporukama, potrebno je provesti dva neovisna uzorkovanja uz pridavanje odgovarajuće pozornosti predanalitičkim zahtjevima i pravilnoj pripremi bolesnika za uzorkovanje krvi (2, 54).

Od ukupno 15 različitih mutacija kod ispitanika s tipom 1 VWB-a, osam je novootkrivenih. Među ranije poznatim mutacijama, u jednom je slučaju nađena mutacija pogrešnog smisla c.4751A>G (p.Tyr1584Cys) koja je u više istraživanja na populacijama iz različitih geografskih područja bila najzastupljenija mutacija povezana s tipom 1 VWB-a. Istraživanje autora O'Brien i sur. (96) na kohorti kanadskih ispitanika s tipom 1 VWB-a dokazalo je prisutnost ove mutacije kod 15 % uključenih obitelji, dok su rezultati multicentričnog istraživanja Goodeve i sur. (93) provedenog u 14 centara iz devet europskih država pokazala učestalost među bolesnicima s tipom 1 VWB-a u Europi od 8 %. Pojedinačnim istraživanjima u europskim zemljama dokazana je učestalost od 8,7 % u švedskoj populaciji bolesnika s tipom 1 VWB-a (97), dok je u istraživanju provedenom među obiteljima iz Velike Britanije iznosila čak 25 % (98). Istraživanje autora Vangenechten i sur. (99) na češkim bolesnicima s VWB-om utvrdilo je prisutnost ove mutacije kod 7,2 % bolesnika svrstavši je na drugo mjesto po učestalosti u sveukupnoj populaciji bolesnika s VWB-a, dok je u istovjetnom istraživanju u Belgiji bila najučestalija (100). Ova mutacija dovodi do unutarstaničnog zadržavanja VWF-a i povećane osjetljivosti na proteolizu posredovanu s ADAMTS-13 (96, 101). Iako bi bilo očekivano da pojačana proteoliza uzrokuje selektivni gubitak multimera, kod ispitanika s ovom mutacijom raspodjela je multimera uredna. S obzirom na to da navedena mutacija nema utjecaja na sintezu VWF-a, smatra se da je razlog tomu postojanje učinkovitoga kompenzacijskog otpuštanja novosintetiziranog VWF-a ili blago pojačana podložnost proteolizi (102). Također, njezina penetrantnost nije potpuna i prema literaturnim podacima iznosi 70 %, pa su kod nositelja ove

mutacije zabilježene najčešće blago snižene aktivnosti VWF-a koje iznose oko 40 %, ali mogu biti i uredne (73, 93) kao što je vidljivo i iz rezultata ovog istraživanja.

Među uključenim ispitanicima s tipom 1 VWB-a u jednom je slučaju nađena mutacija pogrešnog smisla koja se naziva Vicenza varijantom c.3614G>A (p.Arg1205His), a koja je s visokom učestalošću dokazana u svakom do sada provedenom istraživanju genetičke osnove VWB-a (93, 94, 97-100, 103). U istraživanju koje je uključivalo 556 španjolskih bolesnika s VWB-om ova je mutacija bila najučestalija unutar skupine bolesnika s tipom 1 VWB-a, a ti su bolesnici imali ujedno i najniže razine VWF-a među ispitanicima s navedenim tipom bolesti (82). Vicenza varijanta pokazuje 100-postotnu penetrantnost i uzrokuje teški oblik tipa 1 VWB-a s izrazito sniženim razinama VWF-a koje su uvijek ispod 30 %, a uglavnom i niže od 15 % (73, 104). Ovaj se oblik naziva još i tip 1C VWB-a, a naziv mu potječe od mehanizma poremećaja koji podrazumijeva ubrzano uklanjanje (engl. *clearance*) VWF-a iz cirkulacije. Poluvrijeme života tako mutiranog VWF-a skraćuje se na manje od tri sata (73, 104, 105), što je dokazano u istraživanju Gézsi i sur. (106) koji su uspoređivali pad razine mutiranog Vicenza VWF-a u odnosu na divlji tip VWF-a iz egzogenog pripravka, a nakon primjene DDAVP-a. Zbog ubrzanog uklanjanja VWF-a iz cirkulacije omjer FVIII/VWF:Ag uobičajeno iznosi blizu vrijednosti jedan (106). Uz proporcionalno izrazito snižene vrijednosti aktivnosti i antigena VWF-a, prema podacima Casonata i sur. (104) jedno od ključnih laboratorijskih obilježja tipa 1C VWB-a jest i prisutnost UMWM-a. U ovom su istraživanju kod ispitanice s Vicenza varijantom dobivene vrijednosti VWF:GPIbM od 17,2 % i VWF:Ag od 18,0 %, ali uz urednu raspodjelu multimera i neizraženu prisutnost UMWM-a. Varijacije u prisutnosti i udjelu UMWM-a kod bolesnika s Vicenza varijantom VWF-a ovise o stupnju skraćenja poluvremena života VWF-a. Gézsi i sur. (106) dokazali su da je kod ispitanika s poluvremenom života VWF-a oko 1,2 sata udio UMWM-a bio znatan, dok je kod VWF-a s poluvremenom života od 4 do 6 sati prisutnost UMWM-a bila neznatna i raspodjela multimera nije se mogla razlikovati od normalne. Dodatno, veličina multimera ovisi i o drugim čimbenicima, od kojih je najvažnija aktivnost proteaze ADAMTS13 (106).

Mutacija c.2878C>T (p.Arg960Trp) dosad je opisana u jednom slučaju tipa 3 VWB-a u homozigotnom obliku, uz nemjerljivo niske vrijednosti VWF:RCo, VWF:Ag i FVIII (40). U ovom je istraživanju po prvi put nađena u heterozigotnom obliku, uz blago snižene vrijednosti VWF:GPIbM (46,0 %), VWF:CB (35,3 %) i FVIII (45 %) te urednu raspodjelu multimera, što upućuje na to da se radi o blagom kvantitativnom poremećaju koji odgovara tipu 1 VWB-a.

U provedenom se istraživanju laboratorijski vrlo slično, uz samo blago snižene rezultate usmjerenih koagulacijskih pretraga te bez promjena u multimernoj strukturi i raspodjeli, pojavio i slučaj s besmislenom mutacijom c.4696C>T (p.Arg1566Ter). U istraživanju autora Schneppenheim i sur. (107) ova je mutacija utvrđena kod dvaju ispitanika u heterozigotnom obliku s jednako neupadljivim laboratorijskim nalazima, dok je u jednom slučaju dodatno nađena i mutacija pogrešnog smisla c.2384A>G (p.Tyr795Cys), što je rezultiralo složenim heterozigotnim genotipom i fenotipom karakterističnim za tip 2N VWB-a. U tu je svrhu provedena analiza i VWF:FVIIIB. U ovom istraživanju nije korištena navedena pretraga te je na temelju dostupnih nalaza koagulacijskih pretraga, izostanka druge mutacije i blage kliničke slike krvarenja postavljena dijagnoza tipa 1 VWB-a.

Očitovanje besmislene mutacije c.4975C>T (p.Arg1659Ter) ovisi o genotipu, a u ovom istraživanju nađena je u heterozigotnom obliku kod dvije ispitanice koje nisu rodbinski povezane (VWB1-3 i VWB1-13) čime je pretpostavljena kao uzrok tipa 1 VWB-a, dok se u homozigotnom obliku u slučaju VWB3-3 očitovala fenotipom tipa 3 VWB-a. Međutim, u spomenutim dvama slučajevima tipa 1 VWB-a uočen je vrlo različit laboratorijski fenotip. Kod VWB1-3 utvrđen je teški oblik tipa 1 VWB-a s vrijednostima VWF:GPIbM od 7,8 % i VWF:Ag 9,7 %, dok je u slučaju VWB1-13 laboratorijski fenotip bio blag, uz VWF:GPIbM od 43,4 % te VWF:Ag 55,4 %. Uzroci ovakve neujednačenosti mogu biti višestruki. U oba slučaja radi se o ženskim ispitanicama, ali niže razine VWF-a kod VWB1-3 mogu biti posljedica dječje dobi i krvne grupe 0, za razliku od ispitanice VWB1-13 koja je odrasla i ima krvnu grupu A, što fiziološki povisuje VWF. Ovisnost očitovanja ove mutacije o genotipu prvi su put opisali Zhang i sur. (108) 1992. godine u istraživanju koje je obuhvatilo bolesnike s tipom 3 VWB-a i članove njihovih obitelji, dok daljnja provedena istraživanja uglavnom opisuju mutaciju c.4975C>T u homozigotnom ili složenom heterozigotnom obliku kao uzrok tipa 3 VWB-a (82, 109-111).

Osim navedenih mutacija, među ispitanicima s tipom 1 VWB-a nađeno je i pet dosad neopisanih mutacija pogrešnog smisla (c.1496A>C, c.1531A>C, c.4471A>G, c.6479A>G, c.6596G>A) te jedna besmislena mutacija (c.6504C>A). Vrijedno je istaknuti da su mutacije c.1496A>C (p.Gln499Pro) i c.6504C>A (p.Cys2168Ter) nađene kod po dvoje članova iste obitelji, dok je mutacija c.6596G>A (p.Cys2199Tyr) otkrivena kod dvoje ispitanika koji nisu rodbinski povezani. Otkriće novih mutacija među osobama za koje nije poznato da su krvni srodnici upućuje na prisutnost jedinstvenih genskih promjena unutar hrvatske populacije bolesnika s VWB-om. Dodatno, mutacija c.6479A>G (p.Tyr2160Cys) je, osim kod ispitanika

VWB1-14, utvrđena i kod jedine ispitanice ovog istraživanja koja ima i mutaciju u genu za FVIII (HA-5). Svim su ovim ispitanicima zajednička obilježja uredna raspodjela multimera te omjer VWF:GPIbM/VWF:Ag veći od 0,6. Međutim, postoji znatna varijabilnost u rezultatima ostalih koagulacijskih pretraga, čak i među ispitanicima s istom mutacijom. Takav je slučaj uočen kod mutacije c.1496A>C u egzonu 13 koja je nađena u dva slučaja iz iste obitelji, pri čemu su kod majke (VWB1-6) dobivene znatno niže vrijednosti VWF:GPIbM, VWF:Ag i VWF:CB, u odnosu na kćer (VWB1-1). Za razliku od toga, uredne vrijednosti svih koagulacijskih pretraga dobivene su kod ispitanice s mutacijom c.1531A>C, a radi se o promjeni koja je samo 35 pb udaljena i jednako zahvaća D2 domenu VWF-a. Nejednak učinak na rezultate laboratorijskih pretraga vidljiv je i među ispitanicima s bliskim mutacijama unutar egzona 37 (c.6479A>G, c.6504C>A, c.6596G>A), a koje sve dovode do aminokiselinskih promjena u domeni D4 VWF-a. Istraživanje autora Michiels i sur. (112) pokazalo je da kod bolesnika s tipom 1 VWB-a uzrokovanim mutacijama koje zahvaćaju domenu D4, multimerna struktura ostaje uglavnom očuvana, a omjer FVIII/VWF:Ag najčešće je veći od 2, što upućuje na poremećaj u otpuštanju VWF-a. Među navedenim ispitanicima u ovom istraživanju taj je omjer bio u rasponu od 1,14 do 3,61, a kod tri od pet ispitanika iznad 2. Klinička je slika krvarenja blaga, a zbog poremećaja u otpuštanju VWF-a odgovor je na DDAVP suboptimalan.

Mutacije pomaka okvira čitanja u literaturi se rijetko povezuju s tipom 1 VWB-a (73), no u ovoj kohorti utvrđene su kod dva ispitanika i u oba slučaja radi se o heterozigotnim delecijama. Mala delecija dvaju nukleotida c.2269_2270delCT nađena je tehnologijom NGS, uz blagi laboratorijski fenotip. Ova je mutacija ranije opisana samo u dva slučaja i to u sklopu složenoga heterozigotnog genotipa s intronskom varijantom c.7729+7C>T, odnosno duplikacijom jednog nukleotida c.7130dupC, što je rezultiralo nul-alelom i fenotipom tipa 3 VWB-a (38, 109). Zanimljivo je da su u ovom istraživanju ove dvije mutacije (c.7729+7C>T i c.2269_2270delCT) nađene po prvi put samostalno u heterozigotnom obliku kod dvaju ispitanika koji nisu u rodbinskoj vezi i u oba su se slučaja pokazale povezane s fenotipom tipa 1 VWB-a. U drugom slučaju mutacije pomaka okvira čitanja radi se o velikoj heterozigotnoj deleciji koja zahvaća područje od egzona 1 do egzona 6. Prema dostupnim saznanjima ova specifična delecija egzona nije do sada zabilježena u literaturi. Velike heterozigotne delecije nije moguće detektirati tehnologijom NGS-a zbog prisutnosti urednog slijeda nukleotida jednog alela u PCR produktu te je ova delecija otkrivena tek naknadnom analizom tehnologijom MLPA koja se temelji na vezanju specifičnih sondi i njihovu umnažanju. Ako

postoji delecija određene regije gena, neće doći do vezanja, a samim time ni umnažanja, što se kod heterozigotnih delecija zbog prisutnosti samo jedne kopije gena uočava kao omjer signala sonde u referentnom i ispitivanom uzorku koji iznosi oko 0,5 (113). Pretraživanje na velike delecije uglavnom je provedeno na skupinama bolesnika s tipom 3 VWB-a te je dokazano da se kod njih pojavljuju u homozigotnom obliku (114). S druge strane, velika multicentrična istraživanja u Europi i Kanadi (93, 94, 98) na bolesnicima s tipom 1 VWB-a nisu uključila pretraživanje na delecije pa se smatra da je rijetka pojavnost delecija kod tipa 1 VWB-a posljedica metodoloških nedostatnosti takvih istraživanja zbog kojih je procijenjena znatno rjeđom nego što jest (115). To potvrđuju i rezultati ovog istraživanja gdje je velika heterozigotna delecija utvrđena kod ispitanika s umjereno sniženim rezultatima koagulacijskih pretraga: VWF:GPIbM 23,6 %, VWF:Ag 24,7 % i VWF:CB 24,2 %. Slične rezultate pokazali su u svom radu Sutherland i sur. (116) koji su ispitivali prisutnost delecije egzona 4 i 5 u skupini bolesnika s tipom 3 VWB-a i članovima njihovih obitelji te dodatno kod bolesnika s tipom 1 VWB-a. Rezultati su pokazali da su homozigoti imali laboratorijski fenotip karakterističan za tip 3 VWB-a, a delecija je u heterozigotnom obliku dokazana i kod članova njihovih obitelji te dvaju bolesnika s tipom 1 VWB-a kod kojih ranijim sekvenciranjem gena nije dokazana uzročna mutacija. Kod heterozigotnih nositelja ove delecije aktivnosti VWF-a bile su uglavnom umjereno snižene, u rasponu od 11 % do 43 %, što je u skladu s rezultatima dobivenim za ispitanika u ovom istraživanju. Dodatno, kod jednog bolesnika dobivene su nemjerljivo niske vrijednosti, a kod drugog potpuno uredna vrijednost od 105 % (116), što upućuje na varijabilno očitovanje ovakvih genskih promjena. Iz svega navedenog jasno je da je primjena MLPA analize kod bolesnika kod kojih mutacije nisu utvrđene sekvenciranjem gena tehnologijom NGS korisna ne samo kod bolesnika s teškim fenotipom, već i kod blagih oblika VWB-a jer oni mogu biti uzrokovani heterozigotnim mutacijama pomaka okvira čitanja.

Složenost genetičke osnove tipa 1 VWB-a potvrđena je i otkrivanjem uzročnih mutacija unutar introna u dva slučaja. Varijante unutar intronskih regija čine 10 % uzročnih mutacija kod tipa 1 VWB-a, a smatra se da one na pozicijama +1, -1, +2 i -2 dovode do pogrešnog prekrajanja. Prema prediktivnim modelima za procjenu patogenosti koji su korišteni u ovom istraživanju, takav učinak ima do sada neopisana varijanta c.6599-2A>G unutar introna 37 koja je nađena u slučaju VWB1-18. Druga intronska varijanta nađena je u intronu 45 (c.7729+7C>T) i kao što je ranije navedeno, prethodno nije opisana samostalno već samo u sklopu složenih heterozigotnih genotipova u dva slučaja, i to uz deleciju

c.2269_2270delCT te mutaciju pogrešnog smisla c.1926G>A (40). Prema autorima Mancuso i sur. (117), smatra se da se radi o mogućem mjestu prekrajanja. S obzirom na složenost i veličinu gena za VWF, mjesta prekrajanja unutar gena za VWF brojna su i nalaze se blizu 5' kraja domena B1, D2 i D4, te 3' kraja domena A3, B1, B2, C1, C2, D1, D2 i D4, ali mogu se naći i unutar dijelova gena koji kodiraju ponavljajuće B, C i D domene. Istraživanje autora Borràs i sur. (118) na 480 španjolskih bolesnika s VWB-om dokazalo je rasprostranjenost varijanti unutar različitih introna, s različitim učinkom na fenotip, pa su intronske varijante prisutne kod svih tipova VWB-a. Dodatno, utvrđena je i prisutnost intronskih varijanti u sklopu složenih heterozigotnih genotipova, što učestalo rezultira fenotipom tipa 3 VWB-a. Slično je pokazano i u radu autora Liang i sur. (119) koji su utvrdili da se intronske varijante u heterozigotnom obliku očituju blagim oblikom tipa 1 VWB-a, a mogu biti i fenotipski neupadljive. Kod bolesnika s greškama prekrajanja u homozigotnom ili složenom heterozigotnom obliku javlja se fenotip tipa 3 VWB-a s teškim znakovima krvarenja. Intronske varijante povezuju se i s tipom 2 VWB-a, premda rijetko i isključivo u slučajevima kada uzrokuju funkcionalne poremećaje VWF-a.

Iz svega navedenog jasno je da kod tipa 1 VWB-a postoji izrazita raznolikost kliničkih simptoma i znakova krvarenja, rezultata koagulacijskih pretraga te genetičke osnove. Pravilnu dijagnostiku dodatno otežava nepotpuna penetrantnost pojedinih mutacija, znatna interindividualna varijabilnost u rezultatima koagulacijskih pretraga čak i kod nositelja istih mutacija te učinak brojnih fizioloških, patofizioloških, predanalitičkih i analitičkih čimbenika na rezultate koagulacijskih pretraga. Stoga je ponekad, i uz dostupnost svih postojećih laboratorijskih pretraga, teško razlučiti radi li se zaista o poremećaju uvjetovanim genskom promjenom.

Za razliku od toga, kod tipa 2 VWB-a prisutni su tipičniji obrasci promjena koagulacijskih nalaza, a poremećaji VWF-a posljedica su jasnih genskih promjena. Poremećaj koji pojedina mutacija uzrokuje ovisi o području VWF-a koje zahvaća i njegovoj funkciji. Do sada je u međunarodnoj bazi varijanti opisano preko 200 različitih genskih varijanti koje uzrokuju neki od podtipova tipa 2 VWB-a (40). U ovom istraživanju dijagnoza tipa 2 VWB-a kod većine bolesnika bila je jasna već na temelju koagulacijskih pretraga, a genetičkom analizom otkrivena je uzročna mutacija odgovorna za fenotipski poremećaj. Međutim, čak i na temelju svih provedenih laboratorijskih analiza u nekim je slučajevima uočeno razilaženje dobivenih rezultata u odnosu na tipične nalaze za pojedini podtip, odnosno neslaganje s podtipom koji je toj mutaciji pridružen u međunarodnoj bazi varijanti (40).

Dosadašnje spoznaje upućuju da su mutacije povezane s tipom 2 VWB-a pretežno lokalizirane unutar najvećeg egzona 28 (42, 43, 120), što je potvrđeno i u ovom istraživanju. Mutacije unutar egzona 28 nađene su kod svih ispitanika s tipom 2 VWB-a s iznimkom jednog slučaja složenoga heterozigotnog genotipa s varijantama u egzonima 17 i 20. Dobivena raspodjela po podtipovima također je u skladu s prevalencijom podtipova tipa 2 VWB-a pri čemu najveći udio otpada na tip 2A. Kombinacija rezultata koagulacijskih pretraga i genetičke analize upućuje na tip 2A kod 15 ispitanika koji pripadaju osam obitelji. Od toga, uz do sada neopisanu mutaciju pogrešnog smisla c.3829G>T (p.Asp1277Tyr) dokazanu u petero članova iste obitelji, kod ispitanice koja s njima nije rodbinski povezana nađena je druga mutacija na istoj poziciji (c.3829G>C, p.Asp1277His), što upozorava na učestalost pojave mutacije na tom specifičnom mjestu unutar gena za VWF u hrvatskoj populaciji bolesnika s VWB-om. Iako nije službeno zavedena unutar međunarodne baze varijanti, mutacija c.3829G>C (p.Asp1277His) identificirana je još jedino u španjolskoj populaciji i kao najvjerojatniji dodijeljen joj je tip 2A VWB-a (118). Očekivano, ove se dvije mutacije fenotipski očituju vrlo slično, uz snižen omjer VWF:GPIbM/ VWF:Ag, djelomični gubitak HMWM-a i/ili IMWM-a te snižen VWF:CB. Ipak, usporedbom koagulacijskih nalaza među ispitanicima s tipom 2A uočavaju se razlike u stupnju gubitka sposobnosti vezanja trombocitnog GPIb što je vidljivo iz nalaza VWF:GPIbM, omjera VWF:GPIbM/VWF:Ag koji je u dva slučaja viši čak i od 0,7 te stupnju gubitka HMWM-a i IMWM-a. Tip 2A može biti posljedica poremećaja u različitim domenama VWF-a, uključujući propeptidni dio (D1, D2) te domene D3, A1, A2 i CK, pa fenotipske promjene mogu nastati zbog poremećaja dimerizacije i multimerizacije, stvaranja disulfidnih veza, prekomjernoga unutarstaničnog zadržavanja, poremećaja vezanja FVIII ili ubrzane proteolize (121). Unutar uključene skupine ispitanika, u jednom slučaju nađena je mutacija c.3923G>A (p.Arg1308His) koja se u međunarodnoj bazi povezuje s tipom 2A (39), a prema podacima iz istraživanja autora Meyer i sur. (122). Međutim, rezultati koagulacijskih pretraga ne upozoravaju jednoznačno na fenotipske promjene povezane s kvalitativnim poremećajem VWF-a zbog omjera VWF:GPIbM/VWF:Ag od 0,80 te uredne raspodjele multimera. Ipak, blago snižen omjer VWF:CB/VWF:Ag koji iznosi 0,62 upućuje na to da bi u podlozi mogao biti blaži kvalitativni poremećaj koji primarno utječe na vezanje VWF-a na kolagen, a manje na GPIb. Uzevši u obzir sve navedeno, kao i mjesto navedene zamjene aminokiseline unutar domene A1, u ovom je slučaju dvojbeno radi li se doista o tipu 2A ili ovaj fenotip odgovara tipu 2M. Očuvana struktura i raspodjela multimera ključni je pokazatelj da bi se moglo raditi o tipu 2M. Upravo

se ograničena primjena analize multimera VWF-a, uz neujednačenost ostalih laboratorijskih i kliničkih kriterija, smatra ključnim razlogom neujednačenih učestalosti tipa 2M među provedenim istraživanjima. Favaloro i sur. (123) ističu da je tip 2M nedovoljno dijagnosticiran oblik VWB-a koji se nerijetko zamjenjuje s tipom 2A ili tipom 1 VWB-a ako se postavljanje dijagnoze temelji samo na određivanju aktivnosti VWF-a, VWF:Ag i FVIII. U slučaju nemogućnosti provedbe analize multimera, navedeni autori predlažu prošireni laboratorijski pristup koji uključuje dodatno određivanje VWF:CB i time posredno utvrđivanje manjka HMWM-a, na temelju omjera VWF:RCo/VWF:Ag i VWF:CB/VWF:Ag. Sniženje obaju omjera upućuje na gubitak HMWM-a i tip 2A, dok snižen omjer VWF:RCo/VWF:Ag uz uredan omjer VWF:CB/VWF:Ag povezuju s tipom 2M VWB-a. Ipak, kako bi takav pristup bio valjan potrebno je koristiti VWF:CB koji je osjetljiv na manjak HMWM-a, no i u tom slučaju nije uvijek moguće jednoznačno razlikovati tip 2A od 2M. Razlog je tomu činjenica da određeni broj mutacija povezanih s tipom 2M dovodi do poremećaja vezanja kolagena i sniženja VWF:CB/VWF:Ag (124).

Dodatno, izazov u razlikovanju podtipova tipa 2 VWB-a jest i činjenica da zamjena različitih nukleotida na istom mjestu u genu može rezultirati različitim kvalitativnim poremećajima koji su u literaturi povezani s različitim podtipovima tipa 2 VWB-a (123). Jedan je takav primjer upravo zamjena nukleotida na mjestu 3923, koja je u slučaju zamjene gvanina s adeninom, kao kod jednog ispitanika u ovom istraživanju, povezana s tipom 2A, dok se smatra da zamjena gvanina citozinom (c.3923G>C, p.Arg1308Pro) uzrokuje tip 2B VWB-a (124). Slična varijabilnost tipova VWB-a ovisno o promjeni na istom mjestu zabilježena je za c.4121. U ovom istraživanju kod jedne ispitanice nađena je mutacija pogrešnog smisla c.4121G>A (p.Arg1374His), a dobiveni rezultati koagulacijskih pretraga u skladu su s prethodno opisanim nalazima kod bolesnika s istom mutacijom i obuhvaćaju neproporcionalno snižen VWF:GPIbM u odnosu na VWF:Ag, uz njihov omjer koji iznosi 0,18, snižen VWF:CB i njegov omjer s VWF:Ag (0,38) te snižene udjele HMWM-a i IMWM-a, što su karakteristični nalazi za tip 2A VWB-a. Međutim, kada dođe do supstitucije gvanina timinom (c.4121G>T) te posljedične zamjene aminokiseline arginina citozinom (p.Arg1374Cys), fenotipsko očitovanje može upućivati ne samo na tip 2A, već i tip 2M, 2B i tipove 1 VWB-a različite težine (121). Također, zabilježeni su slučajevi da se ista mutacija očituje fenotipom različitog podtipa tipa 2 VWB-a, kao što je to primjer s mutacijom c.4010C>T (p.Pro1377Leu) koja se uglavnom povezuje s tipom 2B, ali je pokazano da se u slučaju njezina nasljeđivanja u složenom heterozigotnom genotipu s nekom drugom

mutacijom pogrešnog smisla bolest fenotipski očituje kao tip 2A (123,125,126). U provedenom je istraživanju ova mutacija nađena u jednom slučaju, a dobiveni su blago sniženi omjeri VWF:GPIbM/VWF:Ag (0,60) i VWF:CB/VWF:Ag (0,64). Zbog selektivnog gubitka samo HMWM-a u ovom je slučaju vjerojatnija dijagnoza tipa 2B VWB-a.

Iako su mutacije c.4027A>G (p.Ile1343Val) i c.4133C>T (p.Ser1378Phe) pojedinačno ranije zabilježene (40), ne postoje podaci o njihovoj prisutnosti u obliku složenoga heterozigotnog genotipa. Obje mutacije zahvaćaju domenu A1 VWF-a, a rezultati koagulacijskih pretraga upozoravaju na kvalitativni poremećaj vezanja GPIb i kolagena koji nije uzrokovan selektivnim manjkom HMWM-a. Stoga, unatoč literaturnim podacima koji govore u prilog tipu 2A (40), prema kombinaciji laboratorijskih nalaza i lokalizacije mutacija unutar područja odgovornog za vezanje GPIb moguće je da se radi o poremećaju koji uzrokuje tip 2M VWB-a.

Suprotno tomu, mutacija c.4645G>A (p.Glu1549Lys) u domeni A2 VWF-a koja je nađena kod dvaju krvnih srodnika dovela je do gotovo potpunog gubitka HMWM-a i IMWM-a, uz neproporcionalno snižene VWF:GPIbM i VWF:CB u odnosu na VWF:Ag, što je karakteristično za tip 2A. Navedena mutacija ranije je dokazana jedino u istraživanju Guglielmone i sur. (127) kod pet članova obitelji iz Argentine i navodi se da uzrokuje tip 2M VWB-a iako sukladno dostupnim literaturnim izvorima analiza multimera nije provedena ili rezultati nisu objavljeni. S obzirom na to da se radi o ključnoj pretrazi za razlikovanje tipa 2A i 2M, a koja je izvedena u sklopu ovog istraživanja, spoznaja o selektivnom nedostatku HMWM-a i IMWM-a kod bolesnika s mutacijom c.4645G>A doprinosi razumijevanju podložnoga uzročnog mehanizma sniženih VWF:GPIbM i VWF:CB te upućuje na to da se radi o poremećaju koji uzrokuje tip 2A VWB-a.

Najniže vrijednosti VWF:GPIbM i VWF:CB kod bolesnika s tipom 2 VWB-a, pri čemu su rezultati VWF:GPIbM bili ispod donje granice mjerenja analitičke metode, dobivene su kod obaju ispitanika s mutacijom c.4517C>T (p.Ser1506Leu), što je posljedica potpunog nedostatka HMWM-a i znatnog smanjenja IMWM-a s obzirom na to da oni sadržavaju najveći broj veznih mjesta za GPIb i kolagen. Podaci iz ranije provedenih istraživanja upozoravaju na prisutnost ove mutacije među bolesnicima s tipom 2A VWB-a u Španjolskoj i Turskoj, s ujednačenim fenotipskim karakteristikama koje uključuju znatno smanjenje HMWM-a i izrazito sniženu VWF:RCo (40,118,128). Preostale dvije mutacije koje zahvaćaju domenu A2, c.4717G>A (p.Gly1573Ser) i c.4825G>A (p.Gly1609Arg), također su pokazale karakteristike tipa 2A, ali su bile praćene blažim laboratorijskim fenotipom i umjerenim

gubitkom HMWM-a i IMWM-a, što još jednom upozorava na različito očitovanje bolesti unutar istih podtipova.

Tip 2B uzrokovan mutacijom c.3946G>A (p.Val1316Met) utvrđen je kod četiri člana iste obitelji, a ova je mutacija prethodno dokazana u velikom broju istraživanja (40). Karakteristični nalazi za tip 2B VWB-a dobiveni su za sva četiri ispitanika u ovom istraživanju, a uključuju neproporcionalno snižen VWF:GPIbM u odnosu na VWF:Ag, uz omjer od 0,19 do 0,34, umjereno snižen VWF:CB uz omjer VWF:CB/VWF:Ag do 0,63, a utvrđena je i trombocitopenija u tri slučaja, uz broj trombocita 105, 32 i $42x10^9$/L. Usto, kod svih je ispitanika analizom multimera jasno utvrđen selektivni gubitak HMWM-a. Prema dostupnim podacima ovo je jedna od pet najčešćih mutacija koje uzrokuju tip 2B VWB-a (122), a nađene su u populacijama različitih europskih zemalja, uključujući Španjolsku (118), Portugal (129) i Mađarsku (130).

Izrazitu heterogenost rezultata koagulacijskih pretraga unutar istog podtipa VWB-a potvrđuju i uredni rezultati svih provedenih koagulacijskih pretraga kod dvoje rodbinski povezanih ispitanika kod kojih je utvrđena prisutnost mutacije c.3797C>T (p.Pro1266Leu) uz mutaciju c.3835G>A (p.Val1279Ile). Prema literaturnim podacima ove dvije mutacije pogrešnog smisla nasljeđuju se kao haplotip, a s obzirom na to da obje odgovaraju slijedu nukleotida parcijalnog pseudogena na kromosomu 22 smatra se da nastaju kao posljedica konverzije gena za VWF i njegova pseudogena unutar ulomka koji je kraći od 100 slijedova nukleotida. Drugi mogući mehanizam nastanka ove promjene odnosi se na samu regiju koju zahvaća, a koja je izrazito metilirana, pa ova pretvorba može nastati i zbog supstitucije metiliranog citozina tirozinom (mC→T) na CT dinukleotidu (95). Iako se radi o kombinaciji mutacija koja je nađena još kod bolesnika iz prve identificirane obitelji s Ålandskog otočja (131), postoje neujednačeni podaci u literaturi i bazi varijanti u genu za VWF u smislu tipa VWB-a koji uzrokuje (40). Promjene zahvaćaju domenu A1 te uzrokuju pojačano vezanje VWF-a za trombocitni GPIb, što je karakteristično za tip 2B VWB-a. Klinički se bolest očituje vrlo neupadljivo, pri čemu pojačana krvarenja izostaju ili su vrlo blaga, dok se laboratorijski uočavaju uredne ili blago snižene vrijednosti aktivnosti i antigena VWF-a, uz omjer koji prelazi 0,6, urednu raspodjelu multimera te odsutnost trombocitopenije, što je pak tipično za tip 1 VWB-a. Jedino što se ističe kod takvih bolesnika pojačan je odgovor na RIPA već kod niskih koncentracija ristocetina od 0,5 mg/mL, što je dokazano na staničnim linijama. U izostanku određivanja RIPA, a na temelju urednih nalaza svih provedenih koagulacijskih pretraga te nezamjetne kliničke slike krvarenja, takvi su bolesnici klasificirani kao tip 1

VWB-a u velikim istraživanjima na kanadskoj, belgijskoj i češkoj populaciji (94,132). Međutim, pravilna klasifikacija bolesnika s tom kombinacijom varijanti rijedak je oblik tipa 2B Malmö/New York (133, 134). Ipak, pokazano je da većina bolesnika ima dostatan odgovor na DDAVP, a njegovom primjenom ne dolazi do trombocitopenije, što je oprečno u odnosu na bolesnike s klasičnim tipom 2B VWB-a (135). Temeljem svega navedenog ostaje nerazjašnjeno radi li se o vrlo blagom obliku tipa 2B, o tipu 1 VWB-a ili o normalnim genskim varijantama koje uzrokuju pojačanu agregaciju trombocita potaknutu ristocetinom *in vitro,* dok *in vivo* nemaju utjecaja na hemostazu (102). Dodatno, varijanta c.3797C>T (p.Pro1266Leu) može tvoriti haplotip i s drugim varijantama, primjerice c.3789G>A (p.Ser1263=) te c.3853G>A (p.Arg1315His), a za takve kombinacije nije utvrđena pojačana agregacija trombocita potaknuta ristocetinom (93). Tumačenje nalaza genetičke analize i previđanje mogućeg učinka neke mutacije na fenotip dodatno može otežati nejednoznačna prosudba patogenosti utvrđene varijante (136). Sukladno korištenom bioinformatičkom alatu i prediktivnom modelu c.3835G>A svrstava se kao varijanta neutvrđenog značenja ili vjerojatno benigna varijanta, a o potonjoj se kao takvoj ne bi trebalo ni izvještavati.

Tip 2N nasljeđuje se autosomno recesivno ili u složenom heterozigotnom obliku (137,138), a uzrokuju ga mutacije pogrešnog smisla u egzonima 18 do 27 koje kodiraju domene D' i D3 VWF-a (137, 138). U provedenom istraživanju tip 2N VWB-a dokazan je u jednom slučaju složenoga heterozigotnog genotipa koji je uključivao najčešću poznatu mutaciju povezanu s tipom 2N c.2561G>A (p.Arg854Gln) te mutaciju c.2278C>T (p.Arg760Cys). Iako se radi o ranije opisanim mutacijama, prema dostupnim spoznajama ova kombinacija do sada u literaturi nije opisana. Istraživanje autora Borràs i sur. (118) pokazalo je da se mutacija c.2561G>A znatno češće pojavljuje kao dio složenoga heterozigotnog u odnosu na homozigotni genotip i u takvom se obliku očituje urednim ili blago sniženim vrijednostima aktivnosti i antigena VWF-a, a i aktivnost FVIII učestalo je uredna ili samo blago snižena. Ključna laboratorijska pretraga u diferencijalnoj dijagnostici tipa 2N jest VWF:FVIIIB koji je kod složenih heterozigota s ovom mutacijom također učestalo uredan ili blago snižen, za razliku od slučajeva s ostalim mutacijama koje uzrokuju tip 2N kod kojih je izrazito snižen (139). Klinička slika tipa 2N uzrokovanog ovom genskom varijantom vrlo je blaga te se smatra najblažim oblikom tipa 2N VWB-a (140). Stoga, iako u ovom istraživanju analiza VWF:FVIIIB nije provedena, što se može smatrati jednim od ograničenja ove studije, prema dostupnim podacima vjerojatno je da provedba ove pretrage ne bi znatno doprinijela razlučivanju dijagnoze tipa 2N. U tu je svrhu prije svega potrebno poznavati područje koje

mutacija zahvaća, kao i funkciju VWF-a na koju utječe. Dok mutacija c.2561G>A (p.Arg854Gln) zahvaća domenu D' koja je odgovorna za vezanje FVIII na VWF, mutacija c.2278C>T (p.Arg760Cys) nalazi se unutar propeptida i utječe na proteolitičko cijepanje enzimom furinom. Prema rezultatima istraživanja u kojem se provodila transfekcija bubrežnih stanica hrčka s mutiranim VWF-om, prisutnost arginina četiri aminokiseline uzvodno od mjesta cijepanja pro-VWF ključna je za učinkovito prepoznavanje supstrata enzima furina. Zbog navedene mutacije ne dolazi do uklanjanja VWFpp, što je nužno za interakciju VWF i FVIII (141). Također je dokazano da zadržavanje VWFpp-a ne utječe na multimernu strukturu, što je potvrđeno i u opisanom slučaju gdje je utvrđen uredan sastav multimera. Manje promjene u multimernoj raspodjeli koje podrazumijevaju nepotpuno razdvajanje pojedinih frakcija oligomera mogu biti posljedica prisutnosti dodatnog cisteina koji sudjeluje u stvaranju disulfidnih mostova (141). Sličan slučaj opisan je kod bolesnika u Francuskoj kod kojeg je uz c.2561G>A (p.Arg854Gln) dokazana i mutacija c.2287A>G (p.Arg763Gly) koja zahvaća posljednju aminokiselinu propeptida VWF-a (139). Mutacija c.2561G>A (p.Arg854Gln) ograničena je na bijelu rasu, što pokazuju i rezultati istraživanja na kineskoj populaciji gdje ta mutacija nije utvrđena (142).

Ispitanici s tipom 3 VWB-a u ovom su istraživanju bili homozigoti ili složeni heterozigoti za besmislene mutacije i/ili mutacije pogrešnog smisla, što je u skladu sa spoznajama o genetičkoj osnovi tipa 3 VWB-a koji je povezan s najtežim laboratorijskim i kliničkim fenotipom. Iako se u početku pretpostavljalo da je tip 3 VWB-a uzrokovan samo velikim delecijama, već su prva opsežnija istraživanja genetičke osnove VWB-a pokazala da tip 3 VWB-a može nastati i zbog prisutnosti manjih, točkastih mutacija. Kao što je ranije objašnjeno, mutacija c.4975C>T (p.Arg1659Ter) u heterozigotnom je obliku kod dvije ispitanice uzrokovala fenotip tipa 1 VWB-a, dok se u homozigotnom obliku očitovala vrlo teškim laboratorijskim fenotipom, uz nemjerljivo niske vrijednosti VWF:GPIbM, VWF:Ag, i VWF:CB, te izrazito nisku aktivnost FVIII od 5 %. Ova mutacija otkrivena je u sklopu istraživanja autora Zhang i sur. (108) koje je obuhvatilo analizu 11 CGA argininskih kodona koji sadržavaju CpG dinukleotide i smatraju se primarnim mjestom eukariotske DNA metilacije, što dovodi do nastanka TpG mutacijskog produkta. Mutacija p.Arg1659Ter je uz p.Arg2535Ter najčešća besmislena uzročna mutacija tipa 3 VWB-a i otkrivena je u populacijama različitih geografskih područja, uključujući Grčku, Italiju, Finsku, Japan, Iran, Indiju, Švedsku i Španjolsku (108-111, 118, 143), a ovim je istraživanjem potvrđena njezina prisutnost i u hrvatskoj populaciji. Također je kod dvaju ispitanika koji nisu rodbinski

povezani nađena najčešća mutacija među stanovništvom središnje i sjeverne Europe koja uzrokuje tip 3 VWB-a, a to je delecija c.2435delC (p.Pro812ArgfsTer31) (143). Radi se o deleciji koja je nađena i među članovima Ålandske obitelji (131). Smatra se da je podrijetlo ove mutacije slavensko što potkrijepljuje njezinu prisutnost među hrvatskim bolesnicima, a njezino daljnje širenje po Europi posljedica je migracija stanovništva (144). Do sada je otkrivena u Španjolskoj (118), Mađarskoj (145), Češkoj (99), Njemačkoj, Italiji i Finskoj (146). Teški fenotip koji uključuje izrazito niske, pa čak i nemjerljive razine VWF-a, te prisutnost teških oblika krvarenja i učestale potrebe za nadomjesnom terapijom posljedica je preuranjenog prekida sinteze VWF-a i njegova gotovo potpunog nedostatka u cirkulaciji (147). Uobičajeno su vrijednosti VWF:GPIbM, VWF:Ag i VWF:CB nemjerljivo niske, uz također znatno sniženu aktivnost FVIII kao što je u slučaju ispitanika VWB3-2. Za razliku od toga, kod slučaja VWB3-1 dobivene su niske, ali mjerljive vrijednosti VWF:GPIbM, VWF:Ag i VWF:CB te aktivnost FVIII od 35 %, što može biti posljedica činjenice da se radilo o jedinoj bolesnici koja je zbog izrazito teških krvarenja tijekom života u vrijeme uključivanja u ovo istraživanje istodobno bila uključena i u kliničko ispitivanje kontinuirane, profilaktičke primjene nadomjesne terapije pripravkom VWF-a i FVIII Wilate. Tri slučaja složenih heterozigota očitovala su se jednako teškim laboratorijskim fenotipom i kliničkim slikama krvarenja koja su obuhvaćala obilne epistakse, krvarenja iz probavnog sustava uz pojavu melene, krvarenja u zglobove, a u jednom slučaju i u središnji živčani sustav. Usto, sva su tri bolesnika zbog učestalih krvarenja razvila sideropeničnu anemiju. Kod dvaju ispitanika iz iste obitelji obje pronađene mutacije pripadaju u skupinu besmislenih mutacija i nisu ranije opisane, a nalaze se u egzonu 4 i 36 te zahvaćaju domene D1 i D4 VWF-a. U trećem slučaju radi se o novootkrivenoj mutaciji pogrešnog smisla c.571T>C (p.Trp191Arg) koja također zahvaća domenu D1, dok je druga besmislena mutacija c.7603C>T (p.Arg2535Ter) poznata i nalazi se u egzonu 45 te zahvaća domenu C4. Prema podacima autora James i Goodeve (43) takav genotip prisutan je kod otprilike 20 % bolesnika s tipom 3 VWB-a, a iako točkaste mutacije mogu biti rasprostranjene duž čitavog gena najvećim se dijelom se nalaze unutar područja D1-D2 (egzoni 3-11) te D4-CK (egzoni 37-52).

Istodobno sekvenciranje gena za VWF i FVIII omogućilo je jednoznačno razlikovanje bolesnika s VWB-om od oboljelih i nositeljica hemofilije A, a koji se na temelju laboratorijskih nalaza i kliničke slike krvarenja nisu mogli jasno razlikovati. Od pet ispitanika koliko je identificirano s mutacijama u genu za FVIII, troje su iz iste obitelji i radi se o majci i dva sina. Kod svih troje nađena je do sada neopisana mutacija pogrešnog smisla c.6253G>A

(p.Glu2085Lys), pri čemu su sinovi homozigoti i stoga oboljeli od hemofilije A, dok je majka kao heterozigot nositeljica hemofilije A. Iz rezultata koagulacijskih pretraga kod oboljelih od hemofilije A treba izdvojiti sniženu aktivnost FVIII (17 % i 23 %) koja je unutar raspona koji odgovara bolesnicima s blagom hemofilijom A (5 – 40 %), a u slučaju HA-1 uočavaju se i blago snižene vrijednosti VWF:GPIbM, VWF:Ag i VWF:CB. Njihova majka (HA-3) ima samo blago sniženu aktivnost FVIII koja iznosi 45 % u trenutku uključivanja u ovo istraživanje. Preostale dvije nositeljice hemofilije A također su imale uredne vrijednosti VWF:GPIbM i VWF:Ag, ali uz blago snižen VWF:CB te sniženu aktivnost FVIII. Ovakvi nejednoznačni obrasci promjena koagulacijskih nalaza kod nositeljica hemofilije A, uz izostanak podatka o mutaciji u genu za FVIII, mogu dovesti do dvojbi radi li se o poremećaju krvarenja uzrokovanom mutacijom u genu za FVIII ili o tipu 2N VWB-a. Vrijednost sekvenciranja gena za VWF i FVIII kod bolesnika s VWB-om i hemofilije A ranije je dokazana u nekoliko istraživanja. Bastida i sur. (75) su na temelju istodobnog sekvenciranja gena za VWF, FVIII i faktor zgrušavanja IX kod bolesnika za koje se na temelju koagulacijskih pretraga smatralo da boluju od hemofilije A i B sedam bolesnika naknadno reklasificirali kao tip 1 VWB-a, tip 2N VWB-a, odnosno nositelje mutacija za tip 2N VWB-a. Također, Fidalgo i sur. (129) tehnologijom NGS-a dokazali su prisutnost mutacija u genu za VWF i potvrdili dijagnozu tipa 2N VWB-a kod dvaju bolesnika ranije dijagnosticirana kao blaga hemofilija A. U istraživanju autora Boylan i sur. (78) sekvenciranjem gena za VWF kod bolesnika s blagom hemofilijom A dijagnoza VWB-a potvrđena je u četiri od 37 ispitanika kod kojih nije nađena mutacija u genu za FVIII, dok su kod čak 22 ispitanika dodatno utvrđene abnormalnosti fenotipa i/ili genotipa VWF-a koje mogu doprinijeti kliničkoj slici kod blage HA. Takav slučaj uočen je kod ženske ispitanice HA-5 kod koje je, uz novootkrivenu mutaciju c.1553C>A (p.Lys518Thr) u genu za FVIII, dodatno utvrđena i mutacija pogrešnog smisla c.6479A>G (p.Tyr2160Cys) u genu za VWF, a koja je samostalno nađena i kod ispitanika s tipom 1 VWB1-14.

U ovom istraživanju, jednako kao i u svim prethodnim istraživanjima genetičke osnove VWB-a (4, 118, 142), kod određenog broja ispitanika nisu utvrđene mutacije u genu za VWF. Od ukupno 30 ispitanika bez utvrđenih mutacija, devet je imalo vrijednosti VWF:GPIbM ispod 50 %. Takav rezultat u skladu je sa spoznajama da je samo 65 % slučajeva sniženog VWF-a povezano s prisutnošću mutaciju u genu za VWF, a vjerojatnost da je sniženi VWF posljedica postojanja mutacije raste što je razina VWF-a niža (2). Zbog toga se bolesnici s vrijednostima VWF-a od 30 do 50 % i bez uzročne mutacije izdvajaju kao

zasebni entitet koji se naziva tzv. ,,niski VWF“. Prema zajedničkim smjernicama Američkog društva za hematologiju (engl. *American Hematology Association,* ASH), ISTH, Nacionalne zaklade za hemofiliju (engl. *National Hemophilia Foundation,* NHF) i Svjetske federacije za hemofiliju (engl. *World Federation of Hemophilia,* WFH), kod bolesnika sa sniženim rezultatima aktivnosti i antigena VWF-a koje upućuju na tip 1 VWB-a za postavljanje dijagnoze koristi se granična vrijednost od 30 % neovisno o postojanju simptoma krvarenja, te 50 % ako bolesnik ima jasne simptome krvarenja (33). Također, bolesnici s vrijednostima VWF-a od 30 do 50 % dijagnosticiraju se kao tip 1 VWB-a u slučaju pozitivne obiteljske anamneze. Dijagnozu kod takvih slučajeva s graničnim vrijednostima VWF-a dodatno otežava nepotpuna penetrantnost genskih varijanti i varijabilni izražaj, kao i utjecaj upale koji može prikriti blagi manjak VWF-a i otežati prosudbu nalaza koagulacijskih pretraga. Dodatno, na kliničku sliku krvarenja i sniženu razinu VWF-a mogu utjecati i mutacije u drugim genima te je uputno razmotriti i poremećaje funkcije trombocita kao moguće uzroke (33). Od devet ispitanika s vrijednostima VWF-a ispod 50 % i bez nađene mutacije u genu za VWF, osam je imalo VWF:GPIbM između 30 i 50 %, dok su u jednom slučaju odraslog ispitanika dobivene izrazito niske vrijednosti VWF:GPIbM (6,9 %), VWF:Ag (14,7 %), FVIII (14 %) te VWF:CB (6,1 %). Analizom multimera nađen je selektivni manjak HMWM-a, što je u skladu sa sniženim omjerima VWF:GPIbM/VWF:Ag (0,47) i VWF:CB/VWF:Ag (0,41) koji upućuju na gubitak veznih mjesta za GPIb i kolagen kao posljedicu strukturnih i funkcionalnih poremećaja VWF-a. Dodatnom genskom analizom tehnologijom MLPA nije nađen promijenjen broj kopija gena ni u jednom egzonu gena za VWF. Na temelju svih nalaza koagulacijskih pretraga i genetičke analize, negativne obiteljske anamneze na VWB, starije dobi (61 godina), komorbiditete koji uključuju urogenitalnu malignu bolest i ulcerozni kolitis te dugotrajne primjene kortikosteroida i biološke terapije, u ovog je bolesnika moguće da se radi o stečenom von Willebrandovu sindromu.

Preostalih 21 ispitanika bez mutacija u genu za VWF imali su uredne nalaze svih usmjerenih koagulacijskih pretraga. Unutar ove skupine sedam slučajeva odnosi se na pedijatrijsku populaciju, a za dodatnih troje, koji su u trenutku uključivanja u istraživanje bili već odrasli, dijagnoza VWB-a također je postavljena tijekom djetinjstva. Mogući razlog izostanka potvrde dijagnoze kod bolesnika za koje se prethodno smatralo da imaju VWB upravo je postavljanje dijagnoze u dječjoj dobi. Dijagnostika VWB-a u pedijatrijskoj populaciji posebno je izazovna. S jedne strane, VWB može biti premalo dijagnosticiran u ranom djetinjstvu ako nije bilo događaja koji su mogli izazvati produljeno krvarenje, dok je s

druge strane zbog učestalijih pojava modrica i krvarenja iz nosa u djetinjstvu te fiziološki nižih razina VWF-a moguće i pogrešno postavljanje dijagnoze VWB-a (148). U ispitanika bez mutacija u genu za VWF i urednih svih koagulacijskih nalaza dijagnoza VWB-a može se isključiti, ali zbog povijesti bolesti koja uključuje prolazno sniženje VWF-a ranije u životu i/ili znakova produljenog krvarenja uputno ih je detaljnije obraditi u slučajevima operacijskih zahvata ili nekih drugih postupaka kod kojih postoji povećana opasnost od krvarenja. Posebnu pažnju i dodatnu obradu zahtijevaju ispitanici kod kojih je utvrđeno produljenje probirnih pretraga, APTV-a te vremena stvaranja ugruška testovima PFA-200 COL/EPI i COL/ADP. Ovakvi nalazi upućuju da može postojati neki drugi blaži poremećaj primarne ili sekundarne hemostaze koji uzrokuje kliničku sliku krvarenja, a zbog kojeg su se ovi ispitanici javili liječniku.

Između svih probirnih laboratorijskih pretraga provedenih u ovom istraživanju, upravo su se rezultati APTV-a te kapaciteta primarne hemostaze ispitanog pomoću testova PFA-200 COL/EPI i COL/ADP znatno razlikovali između skupina ispitanika ovisno o postavljenoj dijagnozi. Produljenje APTV-a očekuje se kod bolesnika s VWB-om s izraženije sniženom razinom VWF-a, a sekundarno i sniženim FVIII (ispod 30 – 40 %) (43), što je potvrđeno i u ovom istraživanju. U usporedbi s gornjom granicom referentnog intervala koji odgovara kombinaciji reagensa i analizatora na kojem se analiza provodila i iznosi 20 do 30 sekundi, APTV kod bolesnika s tipom 2 VWB-a bio je blago produljen, s medijanom od 30,9 s (IQR: 28,7 – 34,6), a kod bolesnika s tipom 3 uočeno je znatnije produljenje, pri čemu je medijan APTV-a iznosio 52,2 s (IQR: 46,7 – 54,7). Kod ispitanika s mutacijama u genu za FVIII koji su klasificirani kao oboljeli ili nositelji blage hemofilije A, APTV (medijan 34,2; IQR: 31,9 – 35,9) se nije statistički razlikovao od APTV-a kod tipa 2 i tipa 3 VWB-a, čime je potvrđena ograničena primjena ove globalne koagulacijske pretrage u diferencijalnoj dijagnostici VWB-a i blage hemofilije A. Također je potvrđeno da će kapacitet primarne hemostaze ispitan na uređaju PFA-200 biti nemjerljiv ili produljen kod svih bolesnika s tipom 2 i tipom 3 VWB-a, što potvrđuje da se radi o vrijednoj probirnoj pretrazi u dijagnostici VWB-a (149). Jedina su iznimka ispitanici s genskom osnovom tipa 2B Malmö/New York kod kojih je bio produljen samo COL/EPI dok je COL/ADP uredan, što može biti posljedica neupadljivoga laboratorijskog fenotipa i uredne raspodjele multimera. Određivanje VWF:GPIbM i VWF:Ag osnova je laboratorijske obrade bolesnika sa sumnjom na VWB, a u ovom je istraživanju potvrđeno da se na temelju nemjerljivo niskih rezultata može jednoznačno postaviti dijagnoza tipa 3 VWB-a bez potrebe za daljnjom laboratorijskom obradom. Također, njihovo

određivanje ključno je za početno razlikovanje kvalitativnih poremećaja povezanih s tipovima 2 VWB-a od kvantitativnog tipa 1 VWB-a. Ipak, iako se pojedini tipovi VWB-a najčešće prepoznaju u tipičnim obrascima promjena koagulacijskih nalaza, u ovom je istraživanju pokazano da ponekad čak i uz sve dostupne laboratorijske pretrage i genetičku analizu nije moguće jednoznačno diferencijalno dijagnostički definirati podtip VWB-a. To je posljedica veličine i složenosti molekule VWF-a, velikog broja različitih mutacija koje čak i ako se nalaze unutar iste domene mogu različito utjecati na klinički i laboratorijski fenotip, te predanalitičkih, analitičkih i fizioloških čimbenika koji mogu utjecati na rezultate laboratorijskih pretraga.

Prilikom postavljanja dijagnoze VWB-a važno je uzeti u obzir podatak o krvnoj grupi AB0, ako je poznat, s obzirom na fiziološki niže razine VWF-a kod osoba krvne grupe 0 u odnosu na ostale. Dostupni literaturni podaci upozoravaju da zbog utjecaja krvne grupe AB0 postoji znatno prevladavanje tipa 1 VWB-a među osobama krvne grupe 0 koje nije u skladu s uobičajenom učestalošću krvnih grupa AB0 u općoj populaciji (150). U istraživanju autora Nitu-Whalley i sur. (151) provedena je reevaluacija dijagnoze tipa 1 VWB-a na temelju graničnih vrijednosti za aktivnost VWF-a prilagođenih krvnoj grupi te osobne i obiteljske anamneze krvarenja. U skupini od 246 ispitanika pokazano je da se temeljem tih kriterija samo kod 59 % njih može potvrditi dijagnoza tipa 1 VWB-a, dok je kod ostalih upitno radi li se o mogućem VWB-u, bolesnicima koji pripadaju skupini tzv. ,,niskog VWF-a“ ili samo granično sniženim aktivnostima kao posljedici krvne grupe 0. Ovo istraživanje, iako provedeno na znatno manjem broju ispitanika, također upozorava na to da se tip 1 VWB-a dijagnosticira učestalije među bolesnicima s krvnom grupom 0. Među ispitanicima krvne grupe 0 mutacije su potvrđene u statistički manjem udjelu ispitanika u odnosu na krvne grupe A i B.

Učestalost težine pojedinih simptoma krvarenja nije se statistički razlikovala ovisno o prisutnosti mutacije u genu za VWF, ali statistički značajna razlika utvrđena je za pojavnost simptoma krvarenja prema podskupinama ispitanika ovisno o konačno dodijeljenoj dijagnozi. Očekivano, pojavnost teških simptoma krvarenja zabilježena je u najvećem udjelu kod bolesnika s tipom 3 VWB-a, dok su blagi simptomi krvarenja koji uključuju epistakse, krvarenja u kožu, produljena krvarenja iz rana već nakon manjih ozljeda te krvarenja u usnu šupljinu u najvećem udjelu utvrđena kod bolesnika s tipom 1 VWB-a te ispitanicima s urednim koagulacijskim nalazima i bez mutacija u genu za VWF. S obzirom na činjenicu da su svi simptomi krvarenja zabilježeni na temelju subjektivne procjene ispitanika, jasno da je

kod blagih simptoma najteže razlučiti gdje se točno nalazi granica između fiziološkoga i produljenog krvarenja. Povećana sklonost krvarenjima zahtijeva i primjenu terapije, pa je tako u statistički većem broju bolesnika s mutacijama u genu za VWF primjenjivana traneksamična kiselina, ali nije utvrđena statistički značajna razlika u primjeni traneksamične kiseline među podskupinama na temelju konačne dijagnoze. Nadomjesna terapija pripravcima VWF i FVIII statistički je češće primjenjivana kod ispitanika s mutacijama u genu za VWF u odnosu na one kod kojih mutacije nisu nađene, a u najvećem udjelu bolesnika unutar pojedine podskupine primjenjivala se kod bolesnika s težim oblicima VWB-a, tipom 2 i tipom 3. Uočena ujednačena primjena traneksamične kiseline neovisno o konačnoj dijagnozi, kao i nepovezanost pojave blagih simptoma krvarenja s prisutnosti mutacija u genu za VWF upotpunjuje dosadašnje znanstvene spoznaje povezane s rezultatima koagulacijskih pretraga i genetičkim analizama koje su upozorile na zahtjevnost postavljanja pravilne dijagnoze VWB-a, posebice kod blagih poremećaja krvarenja.

Provedenim istraživanjem unaprijeđen je diferencijalno dijagnostički algoritam VWB-a u istraženoj kohortnoj skupini bolesnika u Republici Hrvatskoj. Postojeći laboratorijski pristup proširen je odabranim specifičnim koagulacijskim pretragama te je dobiven detaljan uvid u strukturna i funkcionalna svojstva VWF-a kod svakog ispitanika. Molekularna dijagnostika koja je uključila istodobnu analizu čitavih gena za VWF i FVIII visokopropusnom i preciznom molekularnom metodom NGS-a, uz dodatno ciljano pretraživanje duplikacija i delecija metodom MLPA, omogućila je jednoznačnu identifikaciju genske osnove fenotipa krvarenja, pravilno postavljanje dijagnoze VWB-a te diferencijalno dijagnostičko razlučivanje od blage hemofilije A čime je potvrđena postavljena hipoteza istraživanja. Ovim istraživanjem osigurana je osnova za pravilno liječenje i skrb za bolesnike. Analizom genotipa i fenotipa razjašnjeni su molekulsko-patofiziološki procesi koji su u podlozi fenotipa krvarenja u ovoj skupini ispitanika.

Blagi poremećaji krvarenja ostaju trajni izazov u dijagnostici bolesti hemostaze. Kao što je dokazano i u ovom istraživanju, izostanak mutacije ne mora nužno značiti izostanak kvantitativnog manjka VWF-a, jednako kao što su kod određenog broja bolesnika pronađene mutacije u genu za VWF, uz uredne koagulacijske nalaze. Čak i primjenom svih danas dostupnih dijagnostičkih pristupa ponekad nije moguće precizno etiološki definirati i razlučiti patofiziološku osnovu kliničke slike blagih poremećaja krvarenja (34).

7. ZAKLJUČCI

1. Ovim je istraživanjem po prvi put u Republici Hrvatskoj proveden cjelovit pristup u dijagnostici VWB-a koji je uključivao probirne, usmjerene i visokodiferentne koagulacijske pretrage kojima su ispitana funkcionalna i strukturna svojstva VWF-a te molekularnu dijagnostiku koja se odnosi na analizu gena za VWF i FVIII tehnologijom NGS-a i dodatnu gensku analizu s ciljem detekcije velikih delecija i duplikacija metodom MLPA.
2. Utvrđena je znatna heterogenost genetičke osnove VWB-a u hrvatskoj populaciji. U kohortnoj skupini od 83 ispitanika utvrđeno je ukupno 36 različitih mutacija u genu za VWF. Od toga je 25 mutacija pogrešnog smisla, šest besmislene mutacije, tri mutacije pomaka okvira čitanja i to delecije, dok se dvije mutacije odnose na greške prekrajanja unutar intronskih regija.
3. Genetičkom analizom otkriveno je 13 do sada neopisanih mutacija u genu za VWF. Radi se o osam mutacija pogrešnog smisla (c.571T>C, c.1496A>C, c.1531A>C, c.3829G>T, c.3829G>C, c.4471A>G, c.6479A>G, c.6596G>A), tri besmislene mutacije (c.319C>T, c.6151A>T, c.6504C>A), deleciji egzona 1 do 6 te jednoj grešci prekrajanja unutar introna (c.6599-2A>G).
4. Između 48 ispitanika kod kojih su nađene mutacije samo u genu za VWF, 38 ispitanika bili su heterozigoti, sedam složeni heterozigoti i tri homozigoti.
5. Najveći broj mutacija u genu za VWF nađen je unutar egzona 28 i iznosio je 18.
6. Na temelju rezultata koagulacijskih pretraga i genetičke analize, dijagnoza tipa 1 VWB-a postavljena je kod 19 ispitanika, tipa 3 kod šest ispitanika, dok je od 23 ispitanika koji su dijagnosticirani s tipom 2 VWB-a za njih 15 dodijeljena dijagnoza tipa 2A, za 7 tipa 2B i za jednog bolesnika dijagnoza tipa 2N VWB-a.
7. Kod 30/83 (36 %) ispitanika nisu nađene mutacije u genima za VWF i FVIII, pri čemu je devet ispitanika zbog vrijednosti VWF:GPIbM ispod 50 % svrstano u kategoriju tzv. „niskog VWF-a“.
8. Istodobnim sekvenciranjem gena za VWF i FVIII tehnologijom NGS otkrivene su mutacije u genu za FVIII kod pet ispitanika te su dijagnostički reklasificirani na sljedeći način: u dva muška homozigota postavljena je dijagnoza blage hemofilije A, dok su preostale tri ženske ispitanice heterozigoti i smatraju se nositeljicama hemofilije A. Kod jedne je ženske ispitanice uz mutaciju u genu za FVIII dodatno

nađena i mutacija u genu za VWF. Dvije su mutacije u genu za FVIII novootkrivene: c.1553A>C i c.6253G>A.

9. Primjena dodatne molekularne metode MLPA kod ispitanika sa sniženim razinama VWF-a, ali bez utvrđenih mutacija tehnologijom NGS omogućila je otkrivanje do sada neopisane velike heterozigotne delecije u području egzona 1 do 6 gena za VWF-a, čime je potvrđen kvantitativni poremećaj VWF-a koji odgovara dijagnozi tipa 1 VWB-a.
10. Statistički značajna razlika (P < 0,001) između ispitanika s tipom 1, tipom 2, tipom 3 VWB-a, ispitanicima iz kategorije tzv. „niskog VWF-a“, ispitanicima bez mutacija u genima za VWF i FVIII i urednim koagulacijskim nalazima te ispitanicima s mutacijama u genu za FVIII utvrđena je za APTV, PFA-200 COL/EPI, PFA-200 COL/ADP, VWF:GPIbM, VWF:Ag, FVIII, VWF:CB, udjele HMWM i LMWM, te omjere VWF:GPIbM/VWF:Ag (P < 0,001), VWF:CB/VWF:Ag (P = 0,022) i FVIII/VWF:Ag (P = 0,001)
11. Težina simptoma krvarenja nije se statistički značajno razlikovala između ispitanika s mutacijama i bez njih u genu za VWF (P=0,343), ali je statistički značajna razlika utvrđena za pojavnost blagih (P = 0,017) i teških simptoma krvarenja (P < 0,001) između podskupina ispitanika.
12. Traneksamična kiselina statistički se češće primjenjivala kod ispitanika s mutacijama u genu za VWF (P=0,021), iako usporedbom primjene među podskupinama ispitanika na temelju konačne dijagnoze nije utvrđena statistički značajna razlika u njezinoj primjeni (P = 0,238).
13. Nadomjesna terapija pripravcima VWF i FVIII učestalije se primjenjivala kod ispitanika s mutacijama u genu za VWF (P = 0,009), a usporedbom primjene među podskupinama ispitanika na temelju konačne dijagnoze utvrđeno je da je najveći udio bolesnika s tipom 2 i tipom 3 VWB-a dobivao ovaj oblik terapije.

8. POPIS LITERATURE

1. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favaloro EJ, Hill FG, Holmberg L, et al.; Working Party on von Willebrand Disease Classification. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. J Thromb Haemost. 2006;4:2103-14.
2. Lillicrap D. von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2013;2013:254-60.
3. Wilde JT. Von Willebrand disease. Clin Med. 2007;7:629-32.
4. Federici AB, James P. Current management of patients with severe von Willebrand disease type 3: a 2012 update. Acta Haematol. 2012;128:88-99.
5. Ng C, Motto DG, Di Paola J. Diagnostic approach to von Willebrand disease. Blood. 2015;125:2029-37.
6. Berntorp E, Fuchs B, Makris M, Montgomery R, Flood V, O'Donnell JS, et al. Third Åland islands conference on von Willebrand disease, 26-28 September 2012: meeting report. Haemophilia. 2013;19:1-18.
7. Nilsson IM. The history of von Willebrand disease. Haemophilia. 1999;5:7-11.
8. Federici AB, Berntorp E, Lee CA. The 80th anniversary of von Willebrand's disease: history, management and research. Haemophilia. 2006;12:563-72.
9. Zimmerman TS, Ratnoff OD, Littel AS. Detection of carriers of classic hemophilia using an immunological assay for antihemophilic factor (Factor VIII). J Clin Invest. 1971;50:255-8.
10. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. Annu Rev Biochem. 1998;67:395-424.
11. Furlan M. Von Willebrand factor: molecular size and functional activity. Ann Hematol. 1996;72:341-8.
12. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. Blood. 2015;125:2019-28.
13. Rawley O, Lillicrap D. Functional Roles of the von Willebrand Factor Propeptide. Hamostaseologie. 2021;41:63-8.

14. VWF protein structure and location of VWF pathogenic variants by VWD type. Preuzeto s:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7014/figure/von-willebrand.F3/ (pristupljeno: 12. veljače 2022.)
15. Randi AM, Smith KE, Castaman G. von Willebrand factor regulation of blood vessel formation. Blood. 2018;132:132-40.
16. Haberichts SL. Biosynthesis and organization of von Willebrand factor. U: Federici AB, Lee CA, Berntorp EE, Lillicrap D, Montgomery RR, urednici. Von Willebrand Disease: Basic and Clinical Aspects. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011:7-29.
17. Brehm MA. Von Willebrand factor processing. Hämostaseologie. 2017;1:59-72.
18. Coen Herak D. Biologija i podjela von Willebrandove bolesti. U: Zadro R, urednica. Novi izazovi u laboratorijskoj dijagnostici poremećaja zgrušavanja. Zagreb: Medicinska naklada, 2020:35-48.
19. Dong X, Leksa NC, Chhabra ES, Arndt JW, Lu Q, Knockenhauer KE, et al. The von Willebrand factor D'D3 assembly and structural principles for factor VIII binding and concatemer biogenesis. Blood. 2019;133:1523-33.
20. Stockschlaeder M, Schneppenheim R, Budde U. Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis. Blood Coagul Fibrinolysis. 2014;25:206-16.
21. Reininger AJ. Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. Haemophilia. 2008;14:11-26.
22. Lenting PJ, VAN Schooten CJ, Denis CV. Clearance mechanisms of von Willebrand factor and factor VIII. J Thromb Haemost. 2007;5:1353-60.
23. Terraube V, O'Donnell JS, Jenkins PV. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. Haemophilia 2010;16:3-13.
24. Peyvandi F, Garagiola I, Baronciani L. Role of von Willebrand factor in the haemostasis. Blood Transfus. 2011;9:s3-8.
25. Luo GP, Ni B, Yang X, Wu YZ. von Willebrand factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. Acta Haematol. 2012;128:158-69.
26. Bryckaert M, Rosa JP, Denis CV, Lenting PJ. Of von Willebrand factor and platelets. Cell Mol Life Sci. 2015;72:307-26.
27. Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. Blood. 2008;111:1240-7.

28. Orlova NA, Kovnir SV, Vorobiev II, Gabibov AG, Vorobiev AI. Blood Clotting Factor VIII: From Evolution to Therapy. Acta Naturae. 2013;5:19-39.
29. Montgomery RR, Haberichts SL. von Willebrand factor structure and function. U: Federici AB, Lee CA, Berntorp EE, Lillicrap D, Montgomery RR, urednici. Von Willebrand Disease: Basic and Clinical Aspects. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011:30-48.
30. Zupančić Šalek S. Nasljedni poremećaji koagulacije-von Willebrandova bolest. U: Labar B, urednik. Hematologija. Zagreb: Školska knjiga, 2017:503-5.
31. Husain AN. Hematopoetic and lymphoid systems. U: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, urednici. Robbins Basic Pathology. Philadelphia: Elsevier, 2018:442-94.
32. Federici AB. Classification of inherited von Willebrand disease and implications in clinical practice. Thromb Res. 2009;124:S2-6.
33. James PD, Connell NT, Ameer B, Di Paola J, Eikenboom J, Giraud N, et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. Blood Adv. 2021;5:280-300.
34. Mezzano D, Quiroga T. Diagnostic challenges of inherited mild bleeding disorders: a bait for poorly explored clinical and basic research. J Thromb Haemost. 2019;17:257-70.
35. Favaloro EJ, Pasalic L, Curnow J. Type 2M and Type 2A von Willebrand Disease: Similar but Different. Semin Thromb Hemost. 2016;42:483-97.
36. Seidizadeh O, Peyvandi F, Mannucci PM. Von Willebrand disease type 2N: An update. J Thromb Haemost. 2021;19:909-16.
37. Franchini M, Mannucci PM. Acquired von Willebrand syndrome: focused for hematologists. Haematologica. 2020;105:2032-7.
38. Goodeve AC, Schneppenheim R. Molecular diagnosis of von Willebrand disease: the genotype. U: Federici AB, Lee CA, Berntorp EE, Lillicrap D, Montgomery RR, urednici. Von Willebrand Disease: Basic and Clinical Aspects. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011:114-26.
39. Goodeve AC. The genetic basis of von Willebrand disease. Blood Rev. 2010;24:123-34.
40. EAHAD Coagulation Factor Variant Databases: von Willebrand factor. Dostupno na: https://grenada.lumc.nl/LOVD2/VWF/home.php?select_db=VWF (pristupljeno: 20. veljače 2022.)

41. Baronciani L, Goodeve A, Peyvandi F. Molecular diagnosis of von Willebrand disease. Haemophilia. 2017;23:188-97.
42. Goodeve A. Diagnosing von Willebrand disease: genetic analysis. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2016;2016:678-82.
43. James PD, Goodeve A. Von Willebrand disease. Genetics in Medicine. 2011;13:365-76.
44. Castaman G, Giacomelli S, Rodeghiero F. Autosomal recessive von Willebrand disease type 1 or 2 due to homozygous or compound heterozygous mutations in the von Willebrand factor gene. A single center experience on molecular heterogeneity and laboratory features in 12 families. Acta Haematol. 2009;121:106-10.
45. James PD, Tosetto A. Clinical aspects of von Willebrand: bleeding history. U: Federici AB, Lee CA, Berntorp EE, Lillicrap D, Montgomery RR, urednici. Von Willebrand Disease: Basic and Clinical Aspects. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011:91-9.
46. Tosetto A, Badiee Z, Baghaipour MR, Baronciani L, Battle J, Berntorp E, et al. Bleeding symptoms in patients diagnosed as type 3 von Willebrand disease: Results from 3WINTERS-IPS, an international and collaborative cross-sectional study. J Thromb Haemost. 2020;18:2145-54.
47. 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;55:171-3.
48. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, Arnold DM, Coller B, James P, et al.; ISTH/SSC joint VWF and Perinatal/Pediatric Hemostasis Subcommittees Working Group. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. J Thromb Haemost. 2010;8:2063-5.
49. Kalot MA, Husainat N, Tayiem S, El Alayli A, Dimassi AB, Diab O, et al. Bleeding assessment tools in the diagnosis of VWD in adults and children: a systematic review and meta-analysis of test accuracy. Blood Adv. 2021;5:5023-31.
50. Castaman G, Goodeve A, Eikenboom J; European Group on von Willebrand Disease. Principles of care for the diagnosis and treatment of von Willebrand disease. Haematologica. 2013;98:667-74.

51. Lethagen S, Federici AB, Castaman G. On the use of desmopressin in von Willebrand disease. U: Federici AB, Lee CA, Berntorp EE, Lillicrap D, Montgomery RR, urednici. Von Willebrand Disease: Basic and Clinical Aspects. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011:186-99.
52. Franchini M, Seidizadeh O, Mannucci PM. Prophylactic management of patients with von Willebrand disease. Ther Adv Hematol. 2021;12:20406207211064064.
53. James PD, Lillicrap D, Mannucci PM. Alloantibodies in von Willebrand disease. Blood 2013;122:636-40.
54. Stufano F, Baronciani L, Peyvandi F. Diagnosis of von Willebrand disease: phenotypic characterization. Treatment of Hemophilia. 2017;55:1-19.
55. Lapić I. Kako u laboratoriju dijagnosticirati von Willebrandovu bolest? U: Zadro R, urednica. Novi izazovi u laboratorijskoj dijagnostici poremećaja zgrušavanja. Zagreb: Medicinska naklada, 2020:49-60.
56. Budde U, Favaloro EJ. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease: the phenotype. U: Federici AB, Lee CA, Berntorp EE, Lillicrap D, Montgomery RR, urednici. Von Willebrand disease, basic and clinical aspects. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011:100- 13.
57. Favaloro 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.
58. Bodó I, Eikenboom J, Montgomery R, Patzke J, Schneppenheim R, Di Paola J; von Willebrand factor Subcommittee of the Standardization and Scientific Committee of the International Society for Thrombosis and Haemostasis. Platelet-dependent von Willebrand factor activity. Nomenclature and methodology: communication from the SSC of the ISTH. J Thromb Haemost. 2015;13:1345-50.
59. Higgins RA, Goodwin AJ. Automated assays for von Willebrand factor activity. Am J Hematol. 2019;94:496-503.
60. Lawrie AS, Stufano F, Canciani MT, Mackie IJ, Machin SJ, Peyvandi F. A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity. Haemophilia. 2013;19:338-42.
61. Castaman G, Hillarp A, Goodeve A. Laboratory aspects of von Willebrand disease: test repertoire and options for activity assays and genetic analysis. Haemophilia. 2014;20:65-70.

62. Peyvandi F, Oldenburg J, Friedman KD. A critical appraisal of one-stage and chromogenic assays of factor VIII activity. J Thromb Haemost. 2016;14:248-61.
63. Ledford-Kraemer MR. Analysis of von Willebrand factor structure by multimer analysis. Am J Hematol. 2010;85:510-4.
64. Thomazini CM, Soares RPS, da Rocha TRF, Sachetto ATA, Santoro ML. Optimization of von Willebrand factor multimer analysis in vertical mini-gel electrophoresis systems: A rapid procedure. Thromb Res. 2019;175:76-83.
65. Stufano F, Baronciani L, Mane-Padros D, Cozzi G, Faraudo S, Peyvandi F. A comparative evaluation of a new fully automated assay for von Willebrand factor collagen binding activity to an established method. Haemophilia. 2018;24:156-61.
66. Favaloro EJ. Utility of the von Willebrand factor collagen binding assay in the diagnosis of von Willebrand disease. Am J Hematol. 2017;92:114-8.
67. Popov J, Zhukov O, Ruden S, Zeschmann T, Sferruzza 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;52:1965-7.
68. Favaloro EJ, Pasalic L, Curnow J. Laboratory tests used to help diagnose von Willebrand disease: an update. Pathology. 2016;48:303-18.
69. Frontroth JP, Favaloro EJ. Ristocetin-Induced Platelet Aggregation (RIPA) and RIPA Mixing Studies. U: Favaloro EJ, Lippi G, urednici. Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols. New York: Springer Science + Business Media LLC, 2017:473-94.
70. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CP, Kenny D, Nugent D, et al. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. J Thromb Haemost 2013 Apr 10. doi: 10.1111/jth.12231 [Epub ahead of print].
71. Smith LJ. Laboratory Diagnosis of von Willebrand Disease. Clin Lab Sci. 2017;30:65-74.
72. Davidson, SJ. Inflammation and Acute Phase Proteins in Haemostasis. U: Janciauskiene S, urednica. Acute Phase Proteins. London: IntechOpen, 2013:31-54.

73. Lillicrap D, Rodeghiero F, Peake I. Clinical, laboratory, and molecular markers of type 1 von Willebrand disease. U: Federici AB, Lee CA, Berntorp EE, Lillicrap D, Montgomery RR, urednici. Von Willebrand Disease: Basic and Clinical Aspects. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011:127-36.
74. O'Donnell J, Laffan MA. The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor. Transfus Med. 2001;11:343-51.
75. Bastida JM, González-Porras JR, Jiménez C, Benito R, Ordoñez GR, Álvarez-Román MT, et al. Application of a molecular diagnostic algorithm for haemophilia A and B using next-generation sequencing of entire F8, F9 and VWF genes. Thromb Haemost. 2017;117:66-74.
76. EAHAD FVIII Gene Variant Database. Dostupno na: https://f8-db.eahad.org/ (pristupljeno 20. veljače 2022.)
77. Benson G, Auerswald G, Dolan G, Duffy A, Hermans C, Ljung R, et al. Diagnosis and care of patients with mild haemophilia: practical recommendations for clinical management. Blood Transfus. 2018;16:535-44.
78. Boylan B, Rice AS, De Staercke C, Eyster ME, Yaish HM, Knoll CM, et al. Evaluation of von Willebrand factor phenotypes and genotypes in Hemophilia A patients with and without identified F8 mutations. J Thromb Haemost. 2015;13:1036-42.
79. Plug I, Mauser-Bunschoten EP, Bröcker-Vriends AH, van Amstel HK, van der Bom JG, van Diemen-Homan JE et al. Bleeding in carriers of hemophilia. Blood 2006;108:52-6.
80. Hydragel 5 & 11 von Willebrand multimers, 2019/07. Sebia, Lisses, Francuska.
81. Illumina DNA Prep with Enrichment (Document #1000000048041, v06, 2021). Illumina, San Diego, SAD.
82. Batlle J, Pérez-Rodríguez A, Corrales I, López-Fernández MF, Rodríguez-Trillo Á, Lourés E, et al. Molecular and clinical profile of von Willebrand disease in Spain (PCM- EVW-ES): Proposal for a new diagnostic paradigm. Thromb Haemost. 2016;115:40-50.
83. Vidal F, Farssac E, Altisent C, Puig L, Gallardo D. Rapid Hemophilia A Molecular Diagnosis by a Simple DNA Sequencing Procedure: Identification of 14 Novel Mutations. Thromb Haemost. 2001;85:580-3.

84. An introduction to Next-generation Sequencing Technology. Preuzeto s: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf. (pristupljeno: 24. travnja 2022.)
85. Štimac I, Martinković F. Uvod u tehnologije sekvenciranja novih generacija. Hrvatski veterinarski vjesnik. 2021:29:37-47.
86. VarSome: The human genetics search engine. Dostupno na: https://varsome.com. (pristupljeno: 2. veljače 2022.)
87. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. Bioinformatics. 2019;35:1978-80.
88. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015;17:405-24.
89. Saphetor SA. Unlocking the power of variants through globalized discovery and prioritization. Biopharm Deal. 2022;B20-21.
90. Coffa J, van den Berg J. Analysis of MLPA Data Using Novel Software Coffalyser.NET by MRC-Holland. U: Eldin AB, urednik. Modern Approaches to Quality Control. London: Intech Open, 2011:125-50.
91. Bowyer AE, Goodfellow KJ, Seidel H, Westhofen P, Stufano F, Goodeve A, et al. Evaluation of a semi-automated von Willebrand factor multimer assay, the Hydragel 5 von Willebrand multimer, by two European Centers. Res Pract Thromb Haemost. 2018;2:790-9.
92. ISTH-SSC Bleeding Assessment Tool. Preuzeto s: https://bleedingscore.certe.nl. (pristupljeno: 24. travnja 2022.)
93. Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J, et al. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). Blood. 2007;109:112-21.

94. 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;109:145–54.

95. Goodeve A. Genetics of type 1 von Willebrand disease. Curr Opin Hematol. 2007;14:444-9.

96. O'Brien LA, James PD, Othman M, Berber E, Cameron C, Notley CR, et al. Founder von Willebrand factor haplotype associated with type 1 von Willebrand disease. Blood. 2003;102:549-57.

97. Manderstedt E, Lind-Halldén C, Lethagen S, Halldén C. Genetic Variation in the von Willebrand Factor Gene in Swedish von Willebrand Disease Patients. TH Open. 2018;2:e39-48.

98. Cumming A, Grundy P, Keeney S, Lester W, Enayat S, Guilliatt A, et al; UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation. An investigation of the von Willebrand factor genotype in UK patients diagnosed to have type 1 von Willebrand disease. Thromb Haemost. 2006;96:630–41.

99. Vangenechten I, Smejkal P, Zapletal O, Michiels JJ, Berneman Z, Zavrelova J, et al. Analysis of von Willebrand Disease in the South Moravian Population (Czech Republic): Results from the BRNO-VWD Study. Thromb Haemost. 2019;119:594-605.

100. Vangenechten I. Belgian study into von Willebrand disease (B-Will): First results. Preuzeto s: https://bsth.be/application/files/8314/5949/1984/4._vangenechten_-_bwill_bsth_2014_first_results.pdf. (pristupljeno: 28. ožujka 2022.)

101. Keeney S, Grundy P, Collins PW, Bowen DJ. C1584 in von Willebrand factor is necessary for enhanced proteolysis by ADAMTS13 in vitro. Haemophilia. 2007;13:405-8.

102. Hassenpflug WA, Budde U, Obser T, Angerhaus D, Drewke E, Schneppenheim S, et al. Impact of mutations in the von Willebrand factor A2 domain on ADAMTS13-dependent proteolysis. Blood. 2006;107:2339-45.

103. Gadisseur A, Berneman Z, Schroyens W, Michiels JJ. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease type 1/2E (2A subtype IIE), type 1 Vicenza and mild type 1 caused by mutations in the D3, D4, B1-B3 and C1-C2 domains of the von Willebrand factor gene. Role of von Willebrand factor multimers and the von Willebrand factor propeptide/antigen ratio. Acta Haematol. 2009;121:128-38.

104. Casonato A, Pontara E, Sartorello F, Cattini MG, Gallinaro L, Bertomoro A, et al. Identifying type Vicenza von Willebrand disease. J Lab Clin Med. 2006;147:96-102.

105. Pruss CM, Golder M, Bryant A, Hegadorn CA, Burnett E, Laverty K, et al. Pathologic mechanisms of type 1 VWD mutations R1205H and Y1584C through in vitro and in vivo mouse models. Blood. 2011;117:4358-66.

106. Gézsi A, Budde U, Deák I, Nagy E, Mohl A, Schlammadinger A, et al. Accelerated clearance alone explains ultra-large multimers in von Willebrand disease Vicenza. J Thromb Haemost. 2010;8:1273-80.

107. Schneppenheim R, Lenk H, Obser T, Oldenburg J, Oyen F, Schneppenheim S, et al. Recombinant expression of mutations causing von Willebrand disease type Normandy: characterization of a combined defect of factor VIII binding and multimerization. Thromb Haemost. 2004;92:36-41.

108. Zhang ZP, Lindstedt M, Falk G, Blombäck M, Egberg N, Anvret M. Nonsense mutations of the von Willebrand factor gene in patients with von Willebrand disease type III and type I. Am J Hum Genet. 1992;51:850-8.

109. Baronciani L, Cozzi G, Canciani MT, Peyvandi F, Srivastava A, Federici AB, et al. Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients. Blood Cells Mol Dis. 2003;30:264-70.

110. Gupta PK, Saxena R, Adamtziki E, Budde U, Oyen F, Obser T, et al. Genetic defects in von Willebrand disease type 3 in Indian and Greek patients. Blood Cells Mol Dis. 2008;41:219-22.

111. Ahmad F, Budde U, Jan R, Oyen F, Kannan M, Saxena R, Schneppenheim R. Phenotypic and molecular characterisation of type 3 von Willebrand disease in a cohort of Indian patients. Thromb Haemost. 2013;109:652-60.

112. Michiels JJ, Smejkal P, Penka M, Batorova A, Pricangova T, Budde U, et al. Diagnostic Differentiation of von Willebrand Disease Types 1 and 2 by von Willebrand Factor Multimer Analysis and DDAVP Challenge Test. Clin Appl Thromb Hemost. 2017;23:518-31.

113. Acquila M, Bottini F, DI Duca M, Vijzelaar R, Molinari AC, Bicocchi MP. Multiplex ligation-dependent probe amplification to detect a large deletion within the von Willebrand gene. Haemophilia. 2009;15:1346-8.

114. Yadegari H, Driesen J, Hass M, Budde U, Pavlova A, Oldenburg J. Large deletions identified in patients with von Willebrand disease using multiple ligation-dependent probe amplification. J Thromb Haemost. 2011;9:1083-6.

115. Hampshire DJ, Goodeve AC. The molecular basis of von Willebrand disease: the underinvestigated, the unexpected and the overlooked. Haematologica. 2011;96:798-800.

116. Sutherland MS, Cumming AM, Bowman M, Bolton-Maggs PH, Bowen DJ, Collins PW, et al. A novel deletion mutation is recurrent in von Willebrand disease types 1 and 3. Blood. 2009;114:1091-8.

117. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, et al. Structure of the gene for human von Willebrand factor. J Biol Chem. 1989;264:19514-27.

118. Borràs N, Batlle J, Pérez-Rodríguez A, López-Fernández MF, Rodríguez-Trillo Á, Lourés E, et al. Molecular and clinical profile of von Willebrand disease in Spain (PCM- EVW-ES): comprehensive genetic analysis by next-generation sequencing of 480 patients. Haematologica. 2017;102:2005-14.

119. Liang Q, Lin X, Wu X, Shao Y, Chen C, Dai J, et al. Unraveling the molecular basis underlying nine putative splice site variants of von Willebrand factor. Hum Mutat. 2022;43:215-27.

120. Freitas SDS, Rezende SM, de Oliveira LC, Prezotti ANL, Renni MS, Corsini CA, et al. Genetic variants of VWF gene in type 2 von Willebrand disease. Haemophilia. 2019;25:e78-85.

121. Meyer D, Fressinaud E, Mazurier C. Clinical, laboratory, and molecular markers of type 2 von Willebrand. U: Federici AB, Lee CA, Berntorp EE, Lillicrap D, Montgomery RR, urednici. Von Willebrand Disease: Basic and Clinical Aspects. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011:137-47.

122. Meyer D, Fressinaud E, Gaucher C, Lavergne JM, Hilbert L, Ribba AS, et al. Gene defects in 150 unrelated French cases with type 2 von Willebrand disease: from the patient to the gene. INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease. Thromb Haemost. 1997;78:451-6.

123. Favaloro EJ, Pasalic L, Curnow J. Type 2M and Type 2A von Willebrand Disease: Similar but Different. Semin Thromb Hemost. 2016;42:483-97.

124. Larsen DM, Haberichter SL, Gill JC, Shapiro AD, Flood VH. Variability in platelet- and collagen-binding defects in type 2M von Willebrand disease. Haemophilia. 2013;19:590-4.

125. Favaloro EJ. Genetic testing for von Willebrand disease: the case against. J Thromb Haemost. 2010;8:6-12.

126. Baronciani L, Federici AB, Cozzi G, Canciani MT, Mannucci PM. Biochemical characterization of a recombinant von Willebrand factor (VWF) with combined type 2B and type 1 defects in the VWF gene in two patients with a type 2A phenotype of von Willebrand disease. J Thromb Haemost. 2007;5:282-8.

127. Guglielmone HA, Minoldo S, Bastos L, Jarchum GD. Response to DDAVP in two family-related patients with von Willebrand disease type 2M carrying p.Glu1549Lys mutation. J Hematol Transfus. 2016;4:1055.

128. Berber E, Pehlevan F, Akin M, Capan OY, Kavakli K, Çaglayan SH. A common VWF exon 28 haplotype in the Turkish population. Clin Appl Thromb Hemost. 2013;19:550-6.

129. Fidalgo T, Salvado R, Corrales I, Pinto SC, Borràs N, Oliveira A i sur. Genotype-phenotype correlation in a cohort of Portuguese patients comprising the entire spectrum of VWD types: impact of NGS. Thromb Haemost. 2016;116:17-31.

130. Gindele R, Kerényi A, Kállai J, Pfliegler G, Schlammadinger Á, Szegedi I, et al. Resolving Differential Diagnostic Problems in von Willebrand Disease, in Fibrinogen Disorders, in Prekallikrein Deficiency and in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia by Next-Generation Sequencing. Life (Basel). 2021;11:202.

131. Zhang ZP, Blombäck M, Nyman D, Anvret M. Mutations of von Willebrand factor gene in families with von Willebrand disease in the Aland Islands. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:7937-40.

132. Vangenechten I. Belgian-Czech cooperation in the Brno-VWD study. Preuzeto s: https://www.bsth.be/application/files/7014/5949/2558/BSTH2012_Vangenechten.pdf. (pristupljeno: 31. ožujka 2022.)

133. Baronciani L, Federici AB, Castaman G, Punzo M, Mannucci PM. Prevalence of type 2b 'Malmö/New York' von Willebrand disease in Italy: the role of von Willebrand factor gene conversion. J Thromb Haemost. 2008;6:887-90.

134. Hillarp A, Landorph A, Holme PA, Petrini P, Lassila R, Önundarson PT. Nordic guidelines for diagnosis and management of von Willebrand disease, 2012. Dostupno na: https://www.nordhemophilia.org/frontpage/guidelines/ (pristupljeno: 26. travnja 2022.)

135. Michiels JJ, Berneman Z, Gadisseur A, van der Planken M, Schroyens W, van de Velde A et al. Classification and characterization of hereditary types 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2M, 2N, and 2U (unclassifiable) von Willebrand disease. Clin Appl Thromb Hemost. 2006;12:397-420.

136. Gupta PK, Adamtziki E, Budde U, Jaiprakash M, Kumar H et al. Gene conversions are a common cause of von Willebrand disease. Br J Haematol. 2005;130:752-8.

137. Perez Botero J, Pruthi RK, Nichols WL, Ashrani AA, Patnaik MM. von Willebrand disease type1/type 2N compound heterozygotes: diagnostic and management challenges. Br J Haematol. 2017;176:994-7.

138. Woods AI, Rossetti LC, Paiva J, De Brasi CD, Romero ML, Casinelli MM, et al. Type 2N von Willebrand disease: Is it always a recessive trait? Thromb Res. 2021;198:49-51.

139. Hilbert L, Nurden P, Caron C, Nurden AT, Goudemand J, Meyer D, et al. Type 2N von Willebrand disease due to compound heterozygosity for R854Q and a novel R763G mutation at the cleavage site of von Willebrand factor propeptide. Thromb Haemost. 2006;96:290-4.

140. Casonato A, Daidone V, Barbon G, Pontara E, Di Pasquale I, Gallinaro L, et al. A common ancestor more than 10,000 years old for patients with R854Q-related type 2N von Willebrand's disease in Italy. Haematologica. 2013;98:147-52.

141. Casonato A, Sartorello F, Cattini MG, Pontara E, Soldera C, Bertomoro A, et al. An Arg760Cys mutation in the consensus sequence of the von Willebrand factor propeptide cleavage site is responsible for a new von Willebrand disease variant. Blood. 2003;101:151-6.

142. Liang Q, Qin H, Ding Q, Xie X, Wu R, Wang H, et al. Molecular and clinical profile of VWD in a large cohort of Chinese population: application of next generation sequencing and CNVplex® technique. Thromb Haemost. 2017;117:1534-48.

143. Baronciani L, Federici AB, Eikenboom JCJ. Clinical, laboratory, and molecular markers of type 3 von Willebrand disease. U: Federici AB, Lee CA, Berntorp EE, Lillicrap D, Montgomery RR, urednici. Von Willebrand Disease: Basic and Clinical Aspects. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011:148-65.

144. Schneppenheim R, Krey S, Bergmann F, Bock D, Budde U, Lange M, et al. Genetic heterogeneity of severe von Willebrand disease type III in the German population. Hum Genet. 1994;94:640-52.

145. Mohl A, Boda Z, Jager R, Losonczy H, Marosi A, Masszi T, et al. Common large partial VWF gene deletion does not cause alloantibody formation in the Hungarian type 3 von Willebrand disease population. J Thromb Haemost. 2011;9:945-52.

146. Baronciani L, Peake I, Schneppenheim R, Goodeve A, Ahmadinejad M, Badiee Z, et al. Genotypes of European and Iranian patients with type 3 von Willebrand disease enrolled in 3WINTERS-IPS. Blood Adv. 2021;5:2987-3001.

147. Flood VH, Gill JC, Christopherson PA, Bellissimo DB, Friedman KD, Haberichter SL, et al. Critical von Willebrand factor A1 domain residues influence type VI collagen binding. J Thromb Haemost. 2012;10:1417-24.

148. Gill JC, Conley SF, Johnson VP, Christopherson PA, Haberichter SL, Diaz CD, et al. Low VWF levels in children and lack of association with bleeding in children undergoing tonsillectomy. Blood Adv. 2020;4:100-5.

149. Ardillon L, Ternisien C, Fouassier M, Sigaud M, Lefrançois A, Pacault M, et al. Platelet function analyser (PFA-100) results and von Willebrand factor deficiency: a 16-year 'real-world' experience. Haemophilia. 2015;21:646-52.

150. Franchini M, Capra F, Targher G, Montagnana M, Lippi G. Relationship between ABO blood group and von Willebrand factor levels: from biology to clinical implications. Thromb J. 2007;5:14.

151. Nitu-Whalley IC, Lee CA, Griffioen A, Jenkins PV, Pasi KJ. Type 1 von Willebrand disease - a clinical retrospective study of the diagnosis, the influence of the ABO blood group and the role of the bleeding history. Br J Haematol. 2000;108:259-64.

9. ŽIVOTOPIS

Ivana Lapić rođena je 21. veljače 1988. Osnovnu školu i prirodoslovno-matematičku gimnaziju pohađala je u Rovinju.

Studij Medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2006. godine gdje je diplomirala 2011. godine i stekla titulu magistre medicinske biokemije. Pripravnički staž obavlja u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb u razdoblju od listopada 2011. do 2012., polaže stručni ispit za magistre medicinske biokemije te se 2013. zapošljava u Medicinsko-biokemijskom laboratoriju Goran Bulatović u Rijeci. Od srpnja 2014. zaposlena je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb, a 13. srpnja 2018. polaže specijalistički ispit iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine. Od tada radi u Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb. Poslijediplomski doktorski studij na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu upisuje 2015. godine. Od 2015. do 2020. godine sudjelovala je u održavanju nastave na studiju Medicinsko-laboratorijska dijagnostika Zdravstvenog veleučilišta. Od 2017. godine sudjeluje kao vanjski suradnik u izvođenju nastave na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu na kolegiju Hematologija 1, a od 2020. godine i na kolegijima Hematologija 2, Koagulacija i Laboratorijska medicina temeljena na dokazima. Sudjelovala je kao predavač na više stručnih i znanstvenih skupova te tečajeva trajnog usavršavanja iz područja laboratorijske medicine. Objavila je 41 znanstveni i stručni rad, od kojih je za 28 prvi autor, 35 posterskih sažetaka te četiri poglavlja u priručnicima. Suradnica je na jednom završenom i jednom tekućem istraživačkom projektu Hrvatske zaklade za znanost. Članica je Uredničkog odbora časopisa *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Hrvatske komore medicinskih biokemičara i Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu.

Dobitnica je nagrade Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu za najboljeg mladog znanstvenika u 2019. godini te stipendistica Nacionalnog programa „L'Oreal – UNESCO Za žene u znanosti“ u 2021. godini.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Radovi objavljeni u časopisima indeksiranima u *Web of Science Core Collection:*

1. **Lapić I**, Radić Antolic M, Rogić D, Dejanović Bekić S, Coen Herak D, Bilić E, Zadro R. Type 1 von Willebrand disease in a pediatric patient caused by a novel heterozygous deletion of exons 1 to 6 of the von Willebrand factor gene: a case report. Lab Med. 2022 (rad prihvaćen za objavljivanje)
2. **Lapić I**, Rogić D, Šegulja D, Kozmar A, Kmet M, Đerek L, Zadro R. Unusual total anti-SARS-CoV-2 antibody kinetics observed during longitudinal monitoring after BNT162b2 vaccination. Scand J Clin Lab Invest. 2022 Sep 21.doi: 10.1080/00365513.2022.2123388. [Epub ahead of print]
3. **Lapić I**, Radić Antolic M, Boban A, Coen Herak D, Rogić D, Zadro R. Next-generation sequencing of von Willebrand factor and coagulation factor VIII genes: a cross-sectional study in Croatian adult patients diagnosed with von Willebrand disease. Croat Med J. 2022;63:166-75.
4. **Lapić I**, Radić Antolic M, Horvat I, Premužić V, Palić J, Rogić D, Zadro R. Association of polymorphisms in genes encoding prothrombotic and cardiovascular risk factors with disease severity in COVID-19 patients: a pilot study. J Med Virol. 2022;94:3669-75.
5. **Lapić I**, Brenčić T, Rogić D, Pozaić P, Juričić G, Honović L. The value of extended inflammatory parameters on Sysmex XN-1000 hematology analyzer as early laboratory indicators of COVID-19. Scand J Clin Lab Invest. 2022;82:257-9.
6. **Lapić I**, Šegulja D, Dukić K, Bogić A, Lončar Vrančić A, Komljenović S, Šparakl T, Grdiša Teodorović K, Cigula Kurajica V, Baršić Lapić I, Kralik Oguić S, Kozmar A, Vogrinc Ž, Rogić D. Analytical validation of 39 clinical chemistry tests and 17 immunoassays on the Alinity analytical system. Scand J Clin Lab Invest. 2022;82:199-209.
7. **Lapić I**, Radić Antolic M, Dejanović Bekić S, Coen Herak D, Bilić E, Rogić D, Zadro R. Reevaluation of von Willebrand disease diagnosis in a Croatian paediatric cohort combining bleeding scores, phenotypic laboratory assays and next generation sequencing: a pilot study. Biochem Med (Zagreb). 2022;32:010707.

8. Krbot Skorić M, Rogić D, **Lapić I**, Šegulja D, Habek M. Humoral immune response to COVID-19 vaccines in people with secondary progressive multiple sclerosis treated with siponimod. Mult Scler Relat Disord. 2022;57:103435.
9. Radišić Biljak V, **Lapić I**, Vidranski V, Herceg I, Tomić F, Šimac B, Horvat M, Čičak H, Vuljanić D, Dorotić A, Nikler A. Policies and practices in the field of laboratory hematology in Croatia – a current overview and call for improvement. Clin Chem Lab Med. 2021;60:271-82.
10. **Lapić I**, Rogić D, Nikolac Gabaj N, Kajić K, Peran N, Surjan L, Đuras A, Cesar Kocijan V, Bilopavlović N, Smaić F, Štefanović M, Ostroški I, Tandara L, Krnjaić-Tadijanović M, Gornik I, Pintarić H, Marasović Krstulović D, Miškić B, Rahelić D. Haemoglobin A1c-based screening for prediabetes and diabetes mellitus: a multi-center study in Croatian adult population. Biochem Med (Zagreb). 2022;32:010903.
11. Premužić V, Babel J, Gardijan D, **Lapić I**, Gabelica R, Ostojić Z, Lozić M, Pavliša G, Hrabak M, Knežević J, Rogić D, Mihaljević S. Extracorporeal blood purification is associated with improvement in biochemical and clinical variables in the critically-ill COVID-19 patients. Ther Apher Dial. 2022;26:316-29.
12. **Lapić I**, Rogić D, Šegulja D, Zaninović L. Antibody response and self-reported adverse reactions following vaccination with Comirnaty: a pilot study from a Croatian university hospital. J Clin Pathol. 2021;jclinpath-2021-207572.
13. Habek M, Brecl GJ, Bašić Kes V, Rogić D, Barun B, Gabelić T, Emeršič A, Horvat Ledinek A, Grbić N, **Lapić I**, Šegulja D, Đurić K, Adamec I, Krbot Skorić M. Humoral immune response in convalescent COVID-19 people with multiple sclerosis treated with high-efficacy disease-modifying therapies: A multicenter, case-control study. J Neuroimmunol. 2021;359:577696.
14. **Lapić I**, Šegulja D, Rogić D. Assessment of salivary antibody response to BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination. J Med Virol. 2021;93:5257-9.
15. **Lapić I**, Rogić D, Ivić M, Tomičević M, Kardum Paro MM, Đerek L, Alpeza Viman I. Laboratory professionals' attitudes towards ISO 15189:2012 accreditaton: an anonymous survey of three Croatian accredited medical laboratories. Biochem Med (Zagreb). 2021;31:020712.
16. **Lapić I**, Kralik Oguić S, Rogić D. Preliminary evaluation of eight less frequent endocrine assays designed for MAGLUMI 800 chemiluminescence immunoanalyzer. Scand J Clin Lab Invest. 2021;81:332-8.

17. **Lapić I**, Lončar Vrančić A, Coen Herak D, Rogić D. The missing slope: paradoxical shortening of activated partial thromboplastin time in a patient on unfractionated heparin therapy. Biochem Med (Zagreb). 2021;31:021003.
18. **Lapić I**, Rogić D, Šegulja D, Kralik Oguić S, Knežević J. The reliability of SARS-CoV-2 IgG antibody testing – a pilot study in asymptomatic healthcare workers in a Croatian university hospital. Croat Med J. 2020;61:485-90.
19. **Lapić I**, Brenčić T, Rogić D, Lukić M, Lukić I, Kovačić M, Honović L, Šerić V. Cell population data: could a routine hematology analyzer aid in the differential diagnosis of COVID-19? Int J Lab Hematol. 2020;43:e64-7.
20. **Lapić I**, Komljenović S, Knežević J, Rogić D. COVID-19 pandemic once again exposes the weakest link in laboratory services: specimen delivery. Lab Med. 2020;51:e83-6.
21. **Lapić I**, Coen Herak D, Prpić S, Prce A, Raščanec V, Zadro R, Rogić D. Verification of automated latex-enhanced particle immunoturbidimetric D-Dimer assays on different analytical platforms and comparability of test results. Biochem Med (Zagreb). 2020;30:030705.
22. Alajbeg IZ, Vrbanović E, **Lapić I**, Alajbeg I, Vuletić L. Effect of occlusal splint on oxidative stress markers and psychological aspects of chronic temporomandibular pain: a randomized controlled trial. Sci Rep 2020;10:10981.
23. **Lapić I**, Rogić D. Frequency of repetitive laboratory testing in patients transferred from the Emergency Department to hospital wards: a 3-month observational study. Diagnosis (Berl) 2020;8:121-4.
24. **Lapić I**, Rogić D, Plebani M. Erythrocyte sedimentation rate is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): a pooled analysis. Clin Chem Lab Med 2020; 58:1146-8.
25. Krečak I, Peran N, **Lapić I**, Gverić-Krečak V, Krečak F, Rončević P, Duraković N. Serum procalcitonin in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. Wien Klin Wochenschr 2021;133:62-4.
26. Špiljak B, Šimunović L, **Lapić I**, Rogić D, Špalj S, Vuletić L. Influence of saliva on the results of global laboratory coagulation tests. Aust Dent J 2020;65:205-9.
27. **Lapić I**, Miloš M, Tosato F, Piva E, Zadro R, Rogić D, Plebani M. Analytical validation of the iSED automated analyzer for erythrocyte sedimentation rate. Int J Lab Hematol 2020;42:109-15.

28. Krečak I, Gverić-Krečak V, **Lapić I**, Rončević P, Gulin J, Fumić K, Krečak F, Holik H, Duraković N. Circulating YKL-40 in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. Acta Clin Belg. 2019:1-8.
29. **Lapić I**, Rogić D, Fuček M, Galović R. Effectiveness of minimum retesting intervals in managing repetitive laboratory testing: experience from a Croatian university hospital. Biochem Med (Zagreb). 2019;29:030705.
30. **Lapić I**, Padoan A, Bozzato D, Plebani M. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in acute inflammation:meta-analysis of diagnostic accuracy studies. Am J Clin Pathol. 2020;153:14-29.
31. Vrbanović E, **Lapić I**, Rogić D, Alajbeg I. Changes in salivary oxidative status, salivary cortisol, and clinical symptoms in female patients with temporomandibular disorders during occlusal splint therapy: a 3-month follow up. BMC Oral Health. 2019;19:100.
32. **Lapić I**, Piva E, Spolaore F, Musso G, Tosato F, Pelloso M, Plebani M. Ves-Matic CUBE 200: is modified Westergren method for erythrocyte sedimentation rate a valid alternative to the gold standard? J Clin Pathol. 2019;72:716-9.
33. **Lapić I**, Piva E, Spolaore F, Tosato F, Pelloso M, Plebani M. Automated measurement of the erythrocyte sedimentation rate: method validation and comparison. Clin Chem Lab Med. 2019;57:1364-73.
34. Vrbanović E, Alajbeg IZ, Vuletić L, **Lapić I**, Rogić D, Andabak Rogulj A, Illeš D, Knezović Zlatarić D, Badel T, Alajbeg I. Salivary Oxidant/Antioxidant Status in Chronic Temporomandibular Disorders is Dependent on Source and Intensity of Pain – a Pilot Study. Front Physiol. 2018;9:1405.
35. Krečak I, Gverić-Krečak V, Rončević P, Bašić-Kinda S, Gulin J, **Lapić I**, Fumić K, Ilić I, Horvat I, Zadro R, Holik H, Coha B, Peran N, Aurer I, Duraković N. Serum chitotriosidase – a circulating biomarker in polycythemia vera. Hematology. 2018; 11:1-10.
36. Rimac V, **Lapić I**, Kules K, Rogić D, Miler M. Implementation of the Autovalidation Algorithm for Clinical Chemistry Testing in the Laboratory Information System. Lab Med. 2018;49:284-91.
37. Alajbeg IZ, **Lapić I**, Rogić D, Vuletić L, Andabak Rogulj A, Illeš D, Knezović Zlatarić D, Badel T, Vrbanović E, Alajbeg I. Within-Subject Reliability and between-

Subject Variability of Oxidative Stress Markers in Saliva of Healthy Subjects: A Longitudinal Pilot Study. Dis Markers. 2017;2017:2697464.

38. **Lapić I**, Juroš GF, Rako I, Rogić D. Changing the electronic request form proves to be an effective tool for optimizing laboratory test utilization in the emergency department. Int J Med Inform. 2017;102:29-34.

Radovi objavljeni u ostalim časopisima:

1. **Lapić I**, Rogić D. Uloga laboratorijskih inicijativa u racionalizaciji korištenja laboratorijskih pretraga. Zbornik Sveučilišta Libertas. 2019;4:121-33.
2. **Lapić I**, Rimac V. Velika očekivanja od biokemijskih biljega. Farmaceutski glasnik. 2019;75:93-101.
3. **Lapić I,** Rogić D. Laboratory utilization in the emergency department-are the requested tests patient-oriented? Signa Vitae. 2015:10:81-3.

Poglavlja u priručnicima:

1. **Lapić I.** Prednosti i zamke računskih pretraga u hematologiji i koagulaciji. U: Šupak Smolčić V, urednica. Matematika ili analitika: može li se laboratorijski nalaz izračunati? Zagreb: Medicinska naklada, 2021: 47-56.
2. **Lapić I**. Kako u laboratoriju dijagnosticirati von Willebrandovu bolest? U: Zadro R, urednica. Novi izazovi u laboratorijskoj dijagnostici poremećaja zgrušavanja. Zagreb: Medicinska naklada, 2020:49-60.
3. **Lapić I.** Uputna dijagnoza: Slabost i umor. U: Rogić D, **Lapić I** (urednice). Laboratorijske priče-prikazi slučajeva. Zagreb: Medicinska naklada, 2018:47-54.
4. **Lapić I.** Poslovna inteligencija (BI) u analizi laboratorijskih podataka. U: Fuček M, Baršić I (urednice): Laboratorij i informatizacija-gdje smo danas? Zagreb: Medicinska naklada, 2016:51-6.

PRILOG

Prilog sadrži dva originalna znanstvena rada autorice iz teme ove doktorske diseratacije, a koji su indeksirani u bazama *Current Contents* i *Web of Science Core Collection*:

1. **Lapić I**, Radić Antolic M, Dejanović Bekić S, Coen Herak D, Bilić E, Rogić D, Zadro R. Reevaluation of von Willebrand disease diagnosis in a Croatian paediatric cohort combining bleeding scores, phenotypic laboratory assays and next generation sequencing: a pilot study. Biochem Med (Zagreb). 2022;32:010707.
2. **Lapić I**, Radić Antolic M, Boban A, Coen Herak D, Rogić D, Zadro R. Next-generation sequencing of von Willebrand factor and coagulation factor VIII genes: a cross-sectional study in Croatian adult patients diagnosed with von Willebrand disease. Croat Med J. 2022;63:166-75.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

DOPRINOS ODREĐIVANJA SVIH SLJEDNIH VARIJANTI U GENIMA ZA VON WILLEBRANDOV FAKTOR I ZA FAKTOR ZGRUŠAVANJA VIII U DIJAGNOSTICI VON WILLEBRANDOVE BOLESTI I RAZLIKOVANJU OD BLAGE HEMOFILIJE A

Ivana Lapić

SAŽETAK

Višestruka uloga von Willebrandova faktora (VWF) u hemostazi, složenost njegove strukture i veliki broj mutacija u različitim dijelovima gena za VWF čine von Willebrandovu bolest (VWB) klinički izrazito heterogenim poremećajem, a njegovu pravilnu dijagnostiku i razlikovanje od blage hemofilije A otežanima. Cilj ovog istraživanja bio je primijeniti cjeloviti pristup dijagnostici VWB-a u Republici Hrvatskoj koji uključuje globalne i visokodiferentne koagulacijske pretrage kojima su ispitana funkcionalna i strukturna svojstva VWF-a te molekularnu analizu svih sljednih varijanti u genima za VWF i faktor zgrušavanja VIII (FVIII) sekvenciranjem sljedeće generacije (NGS) i dodatnim pretraživanjem velikih delecija i duplikacija metodom višestrukog umnažanja vezanih sondi. Istraživanje je obuhvatilo 83 ispitanika, a mutacije u genu za VWF nađene su kod njih 48. Na temelju rezultata koagulacijskih pretraga i genetičke analize, 19 ispitanika klasificirano je kao tip 1 VWB-a, šest kao tip 3, dok je među 23 ispitanika s tipom 2 VWB-a 15 imalo tip 2A, sedam tip 2B, a tip 2N potvrđen je u jednom slučaju. Heterozigotni genotip utvrđen je kod 38 ispitanika, sedam su bili složeni heterozigoti i tri homozigoti. Ukupno je utvrđeno 36 različitih mutacija u genu za VWF, od kojih su 13 novootkrivene. Mutacije u genu za FVIII nađene su kod petero ispitanika, pri čemu je u dva muška homozigota postavljena dijagnoza blage hemofilije A, dok su tri ženske ispitanice heterozigoti i smatraju se nositeljicama hemofilije A. Kod jedne je ispitanice uz mutaciju u genu za FVIII nađena i mutacija u genu za VWF. Dvije su mutacije u genu za FVIII novootkrivene. Kod 30 (36 %) ispitanika nisu nađene mutacije u genima za VWF i FVIII, pri čemu je devet ispitanika zbog aktivnosti VWF-a ispod 50 % svrstano u kategoriju tzv. ,,niskog VWF-a“. Ovo istraživanje upozorilo je na znatnu heterogenost genetičke osnove VWB-a u hrvatskoj populaciji, a istodobno sekvenciranje gena za VWF i FVIII tehnologijom NGS omogućilo je jednoznačno postavljanje dijagnoze VWB-a te diferencijalno dijagnostičko razlučivanje od blage hemofilije A. Time je osigurana osnova za pravilno liječenje i skrb za bolesnike te su razjašnjeni molekulsko-patofizološki mehanizmi koji su u podlozi poremećaja krvarenja kod obrađenih bolesnika.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 159 stranica, 29 grafičkih prikaza, 25 tablica i 151 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: von Willebrandova bolest, blaga hemofilija A, koagulacijske pretrage, molekularna dijagnostika, sekvenciranje sljedeće generacije

Mentori: dr. sc. Renata Zadro, redovita profesorica u trajnom zvanju
dr. sc. Dunja Rogić, redovita profesorica

Ocjenjivači: dr. sc. Karmela Barišić, redovita profesorica u trajnom zvanju
dr. sc. Ernest Bilić, redoviti profesor
dr. sc. Désirée Coen Herak, docent

Rad prihvaćen: 28. rujna 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral dissertation

CONTRIBUTION OF COMPLETE SEQUENCE ANALYSIS OF VON WILLEBRAND FACTOR AND COAGULATION FACTOR VIII GENES IN THE DIAGNOSIS OF VON WILLEBRAND DISEASE AND DISTINCTION FROM MILD HAEMOPHILIA A

Ivana Lapić

SUMMARY

Multiple functions of von Willebrand factor (VWF), its structural complexity and numerous mutations throughout the whole VWF gene impact the clinical heterogeneity of von Willebrand disease (VWD) and make its accurate diagnosis and distinction from mild haemophilia A challenging. The aim of the present study was to introduce a comprehensive laboratory diagnostic approach that included screening and specific coagulation assays, as well as molecular analysis of VWF and coagulation factor VIII (FVIII) genes by means of next-generation sequencing (NGS) and additional targeted screening for deletions and duplications using the multiplex ligation-dependent probe amplification method. Of the 83 study participants, 48 were identified with disease-associated mutations in the VWF gene, of whom 19 were classified as type 1 VWD, six as type 3 VWD, while among the 23 patients with type 2 VWD, 15 were assigned as type 2A, seven as type 2B, and in one case type 2N VWD was confirmed. Heterozygous genotype was present in 38 patients, compound heterozygosity in seven patients while three patients were homozygous for mutations within the VWF gene. In total, 36 distinct disease-associated mutations were found within the VWF gene, of which 13 were novel. Four study participants were identified with mutations within the FVIII gene only, while one female participant had mutations both in VWF and FVIII genes. The two siblings who were homozygous for a mutation in the FVIII gene were diagnosed with mild haemophilia A, while the three heterozygous females were classified as carriers of mild haemophilia A. Two mutations within the FVIII gene were novel. Of the remaining 30 (36 %) study participants without mutations within the VWF and FVIII genes, nine had VWF activity below 50 % and were classified as "low VWF". The present study revealed considerable genetic heterogeneity among patients with VWD in Croatia. The application of simultaneous sequencing of whole VWF and FVIII genes by means of NGS was proven as a valid approach for differential diagnosis of VWD subtypes, as well as for unambiguous distinction of VWD from mild haemophilia A. This study provided basis for appropriate patient treatment and care, as well as enhanced the understanding of the underlying molecular pathophysiology of the bleeding phenotype in the evaluated patients.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 159 pages, 29 figures, 25 tables and 151 references. Original is in Croatian language.

Ključne riječi: von Willebrand disease, mild haemophilia A, coagulation testing, molecular diagnostics, next-generation sequencing

Mentors: Full Professor with tenure Renata Zadro, PhD
Full Professor Dunja Rogić, PhD

Reviewers: Full Professor with tenure Karmela Barišić, PhD
Full Professor Ernest Bilić, PhD
Assistant Professor Désirée Coen Herak, PhD

The thesis was accepted: 28th September 2022