

Analiza stvaranja trombina u bolesnika s von Willebrandovom bolesti

Majsec, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:163:918698>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ana Majsec

**Analiza stvaranja trombina u bolesnika s von
Willebrandovom bolešću**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom izv. prof. dr.sc. Marija Grdić Rajković i suvoditeljstvom doc. dr.sc. Désirée Coen Herak.

Najveće hvala mojoj komentorici doc. dr.sc. Désirée Coen Herak koja me na raznim predavanjima i vježbama uvela u zanimljiv svijet koagulacije. Zahvaljujem na njenom stručnom vodstvu, strpljenju i pomoći prilikom izrade diplomskoga rada te na njenim korisnim stručnim, ali i životnim savjetima.

Hvala mojoj mentorici izv. prof. dr.sc. Mariji Grdić Rajković koja me je usmjerila i pomogla naći komentora. Zahvaljujem na njenoj pomoći i stručnim savjetima pri izradi Diplomskoga rada.

Posebno zahvaljujem dr.sc. Ivani Lapić na ustupljenim podacima, trudu, stručnoj pomoći i prenesenom znanju prilikom izrade Diplomskog rada.

Hvala Anamariji Bogić na stručnoj pomoći i prenesenom znanju prilikom izrade Diplomskog rada i za vrijeme stručnog osposobljavanja.

Veliko hvala mojim roditeljima, braći, Ivanu, teti, bakama i djedovima na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju tijekom studiranja te što ste vjerovali u mene.

Hvala Janku, Dori, Patriciji, Karli i ostalim prijateljima koji su bili uz mene, pomagali mi, tješili me i bodrili te uljepšali studentske dane.

Sadržaj

1.UVOD	1
1.1.Hemostaza	1
1.1.1.Uloga endotela	1
1.1.2.Vaskularni spazam	3
1.1.3.Primarna hemostaza	3
1.1.4.Sekundarna hemostaza	4
1.2.Fibrinoliza	6
1.2.1.Plazmin	7
1.2.2.Trombin	8
1.3.Von Willebrandova bolest (VWB)	8
1.3.1.Von Willebrandov faktor	8
1.3.2.Povijest VWB	10
1.3.3.Tip 1 VWB.....	12
1.3.4.Tip 2 VWB.....	12
1.3.5.Tip 3 VWB.....	14
1.3.6.Stečeni von Willebrandov sindrom	14
1.4.Preporuke dijagnostičkih testova za VWB	14
1.5.Laboratorijska dijagnostika VWB	15
1.5.1.Probirne laboratorijske pretrage.....	15
1.5.2.Usmjerene laboratorijske pretrage	16
1.5.3.Diferencijalno dijagnostičke pretrage.....	18
1.6.Terapija za VWB	19
1.7.Primjena testa stvaranja trombina (<i>engl.thrombin generation assay</i> , TGA)	20
2.OBRAZLOŽENJE TEME.....	21
3.MATERIJALI I METODE.....	22
3.1. MATERIJALI.....	22
3.1.1. Uzorci	22
3.2. METODE	22
3.2.1. Uređaji serije Ceveron®100	22
3.2.2. Principi metoda koje koristi Ceveron®s100.....	23
3.2.3. Princip testa TGA.....	23
3.2.4. Ceveron® TGA RB Kit (<i>engl.thrombin generation assay reagent B</i>).....	25
3.2.5. Postupak izvedbe TGA na uređaju Ceveron®s100.....	26

3.2.6. Izrada kalibracijske krivulje.....	27
3.2.7. Tumačenje mjerenih parametara	29
3.2.8. Statistička obrada podataka	30
4. REZULTATI	32
4.1. Raspodjela ispitanika s VWB	32
4.2. Rezultati mjerenja bolesnika s VWB tipa 1	33
4.3. Rezultati mjerenja u bolesnika s VWB tipa 2	34
4.4. Rezultati mjerenja u bolesnika s VWB tipa 3	35
4.5. Rezultati mjerenja u bolesnika s niskim VWF	35
4.6. Rezultati mjerenja u bolesnika bez mutacije	36
4.7. Usporedba rezultata mjerenja između pojedinih tipova VWB.....	37
4.8. Usporedba rezultata mjerenja ispitanika s VWB unutar istih obitelji	40
4.9. Ispitivanje korelacije izmjerenih parametara s VWF:Ag, VWF:GPIbM, APTV-om i aktivnosti FVIII	43
5. RASPRAVA	44
5.1. Tumačenje analiziranih rezultata testa TGA	44
6. ZAKLJUČCI.....	47
7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	48
8. LITERATURA	51
9. SAŽETAK.....	55
10. SUMMARY	56

1.UVOD

1.1.Hemostaza

Hemostaza je složeni proces koji lokalno zaustavlja krvarenje nakon ozljede krvne žile. Preciznom kliničkom definicijom hemostaza se definira kao obrambeni mehanizam koji održava krv u tekućem stanju i kontrolirano sprječava pretjeran gubitak krvi iz intravaskularnog prostora. Neprekidno štiti organizam od krvarenja i patoloških trombotičkih događaja kao što su infarkt miokarda, moždani udar, arterijska ili duboka venska tromboza. Hemostaza se odvija u tri osnovne faze: primarna hemostaza, sekundarna hemostaza i fibrinoliza (Sertić i sur., 2008).

1.1.1.Uloga endotela

Endotelne stanice reguliraju funkciju trombocita, zgrušavanje plazme i fibrinolizu, sintetiziraju i izlučuju von Willebrandov faktor (VWF). Također endotelne stanice mogu smanjiti regulativnu funkciju trombocita, odnosno njihovu adheziju i aktivaciju zdravim kolagenom, sekrecijom prostaciklina (P_gI₂) i dušikovog oksida (NO) koji su snažni inhibitori (Rifai i sur., 2018).

U normalnim uvjetima trombociti ne adheriraju na površinu endotela jer endotel otpušta supstance koje sprečavaju neželjenu adheziju trombocita na neoštećenu krvnu žilu. Ozljeda endotela će potaknuti protrombotičko stanje. Luminalna površina endotela prekrivena je negativno nabijenim glikozaminoglikanom, heparan sulfatom. Navedeni zaštitni mehanizam mogu nadvladati aktivirani trombociti. Vežanje P-selektina ili glikoproteina (GP) I_bα na aktiviranim trombocitima s proteinom P-selektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1) na površini endotela rezultira „rolanjem“ trombocita po endotelu (de Groot i sur., 2012).

Endotelne stanice sadrže prostaciklin sintazu koja katalizira pretvorbu endoperoksidaza u prostaciklin. P_gI₂ se veže za prostanoidni receptor koji se nalazi na trombocitnoj membrani. Vežanje P_gI₂ stimulira aktivnost adenilil-ciklaze. Posljedično dolazi do povećanja trombocitnog cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) te dolazi do ponovnog unosa kalcija putem gustog tubularnog sustava čime se inhibira adhezija i agregacija trombocita. P_gI₂ je jedan od najpotentnijih inhibitora agregacije trombocita (de Groot i sur., 2012)

NO drugi je produkt endotela koji doprinosi njegovim antitrombotskim svojstvima. Otpušten iz endotela difundira kroz membranu trombocita i veže se na hemske dio gvanilil ciklaze.

Vežanje rezultira povećanjem razine cAMP i smanjenjem regulacije aktivacije trombocita. Pgl₂ i NO osim svojih antiagregacijskog učinka, također reguliraju mišićni tonus (de Groot i sur., 2012).

Endotelne stanice mogu smanjiti aktivaciju trombocita površinski vezanom ekto-ADP-azom (CD39). Adenozin difosfat (ADP) otpušten iz trombocita metabolizira se sa CD39 te tako ne dolazi do pojačane aktivacije trombocita. Nastali adenozin monofosfat (AMP) se metabolizira do adenozina koji inhibira agregaciju trombocita (de Groot i sur., 2012).

Osim navedenih izravnih učinaka endotela na adheziju i agregaciju trombocita, endotelne stanice mogu neizravno djelovati na njih. Neizravno djelovanje endotela na agregaciju trombocita uključuje izražaj trombomodulina, sintezu inhibitora puta tkivnog faktora (*engl. tissue factor pathway inhibitor; TFPI*) i regulaciju veličine multimera VWF pomoću ADAMTS-13 (*engl. A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs-13*) (de Groot i sur., 2012).

Tkivni faktor (TF) nalazi se u glatkim mišićima krvne žile i pericitima koji je okružuju. Endotel *in vivo* ne izražava TF, osim u prisutnosti tumorskih stanica. TF snažno veže faktor VII (FVII) te ga može zaustaviti kada se kreće prema ekstravaskularnom prostoru. Faktor IX (FIX) se specifično i snažno veže za protein ekstracelularnog matriksa kolagen IV, što rezultira nakupljanjem FIX oko krvnih žila. Kada je endotel oštećen TF aktivira koagulacijsku kaskadu (Rifai i sur., 2018).

Endotel neprekidno izlučuje VWF, ali ga pohranjuje u Weibel-Paladijevima tjelešcima koji ga otpuštaju kao odgovor na fiziološki stres, vježbanje i u trećem trimestru trudnoće. Zbog toga povišene koncentracije VWF nalazimo u stanjima uzrokovanih stresom ili u trudnoći. Endotelne stanice također izlučuju ADAMTS13 koji je odgovoran za cijepanje VWF (Rifai i sur., 2018).

Reakcija zgrušavanja posredovana je trombocitnim kontraktilnim proteinima koji smanjuju ugrušak međusobnim približavanjem rubova manje ozljede skupa. Regulativna funkcija endotelnih stanica se pojavljuje istovremeno kako se trombociti sljepljuju na oštećeni endotel, a na taj način trombociti postaju dio endotela potpomažući njegovoj funkciji. (Rifai i sur., 2018).

1.1.2. Vaskularni spazam

Intaktni endotel služi kao barijera između cirkulirajuće krvi i prokoagulantnog tkiva ispod nje. U trenutku ozljede male i srednje krvne žile kontrahiraju se kao posljedica mehaničke, neuralne i kemijske stimulacije kako bi se spriječio gubitak krvi (Rifai i sur., 2018). Oštećeni endotel luči endotelin koji se veže na receptore glatkih mišića. Posljedično dolazi do kontrakcije glatkih mišića koja uzrokuje vazokonstrikciju te se na taj način sprečava gubitak krvi. Subendotelni kolagen postaje izložen na mjestu ozljede (Saad i sur., 2023).

1.1.3. Primarna hemostaza

Weibel-Paladijeva tjelešca otpuštaju VWF koji se veže na izloženi kolagen i služi kao mjesto za adheziju trombocita na oštećenoj površini krvne žile (Saad i sur., 2023). Trombociti se za kolagenska vlakna vežu izravno preko trombocitnih receptora GPIV i posredno preko GPIb α za VWF (Vinholt, 2019). VWF služi kao most između subendotelnog kolagena i trombocita preko GPIb α , koji je podjedinica trombocitnog kompleksa GPIb/V/IX (Neubauer i Zieger, 2021). Vezanjem trombocita na subendotelni kolagen te vezanjem trombocita na trombocitni proteazom aktiviran receptor 1 (PAR-1) i proteazom aktiviran receptor 4 (PAR-4) dolazi do aktivacije trombocita (Vinholt, 2019). Aktivacijom trombocita dolazi do promijene njihovog oblika, stvaraju se pseudopodiji te se povećava njihova površina. Također, dolazi do izlučivanja trombocitnih granula. Alfa granule sadrže razne proteine, primjerice koagulacijski faktor V (FV), trombocitni faktor IV, fibrinogen i VWF. Gusta tjelešca (delta zrnca) sadrže neproteinske komponente kao što su to adrenalin, ADP, adenzin trifosfat, serotonin, anorganske fosfate i kalcij. Tromboksan A₂ (TXA₂) je naj snažniji aktivator trombocita. Otpušta se iz plazme trombocita i uzrokuje potpunu aktivaciju trombocita. Također se TXA₂ i serotonin vežu za glatke mišiće i uzrokuju vazokonstrikciju. Aktivacija trombocita uzrokuje konformacijsku promjenu GPIIb/IIIa, koji se nalazi na površini trombocita, u aktivni oblik koji se veže na fibrinogen i naknadno uzrokuje agregaciju trombocita (Rifai i sur., 2018). Simetrična struktura fibrinogena zaslužna je za međusobno povezivanje trombocita na aktivirani trombocitni receptor GPIb/V/IX. Vezanjem na GPIb/V/XI receptor dolazi do agregacije trombocita i nastanka trombocitnog ugruška, koji je samo privremena mjera zaustavljanja krvarenja (Sertić i sur., 2008). Nakon što je nastao primarni trombocitni čep, nastali ugrušak stabilizira se odlaganjem netopljivih fibrinskih niti (Saad i sur., 2023). Fibrin nastaje iz plazmatskog proteina fibrinogena kao krajnji produkt aktivirane koagulacijske kaskade (Neubauer i Zieger, 2021). Taj proces naziva se sekundarnom hemostazom (Saad i sur., 2023).

1.1.4. Sekundarna hemostaza

Tijekom vremena izmjenjivali su se različiti modeli sustava zgrušavanja krvi, ovisno o trenutnim otkrićima pojedinih komponenata sustava zgrušavanja i njihovim funkcijama. U kaskadnoj teoriji do zgrušavanja dolazi iz dva različita smjera, a to su unutarnji i vanjski put. Unutarnji put započinje kontaktnom fazom, a vanjski put započinje ozljedom krvne žile. Oba puta sastaju se u zajednički put gdje dolazi do aktivacije faktora X (FX). Faktori koji su aktivirani svojom enzimskom aktivnošću aktiviraju druge faktore. Stanični model dokazuje kako se unutarnji i vanjski put zgrušavanja međusobno isprepliću i zajedno sudjeluju u procesu zgrušavanja krvi (Sertić i sur., 2008). Proces koagulacije prema staničnom modelu odvija se *in vivo* u tri faze: inicijacijska, amplifikacijska i propagacijska faza (Slika 1.) (Sertić i sur., 2008, Rifai i sur., 2018).

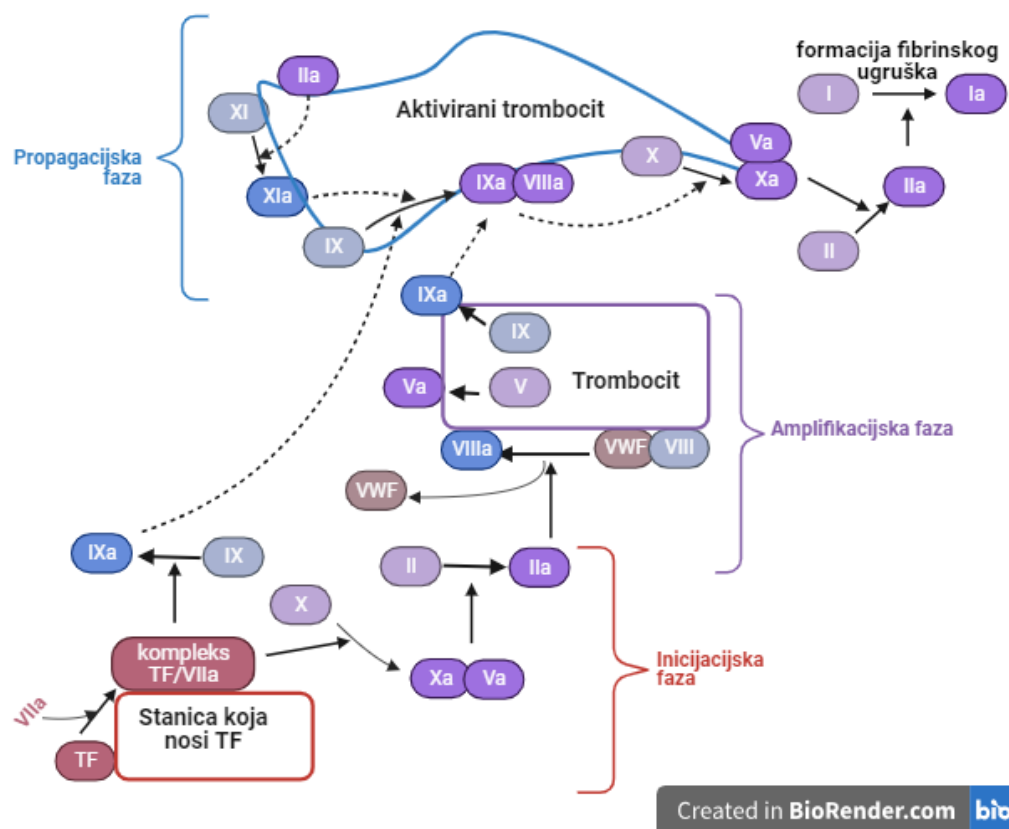
Glavnu ulogu u početnoj, inicijacijskoj fazi zgrušavanja ima TF, transmembranski glikoprotein koji ostaje vezan na stanicama koje su ga sintetizirale. Inicijacijska faza je locirana na stanicama koje nose TF koji je jedini relevantni inicijator hemostaze *in vivo*. Stanice koje nose TF nalaze se izvan vaskularnog prostora te tek nakon ozljede krvne žile dolazi do izlaganja TF i inicijacije koagulacije.

Inicijacijska faza započinje vezanjem FVIIa, koji je uvijek u maloj količini (<1%) prisutan u aktivnom obliku u cirkulaciji, s TF u aktivni kompleks TF/FVIIa. Enzimski kompleks TF-VIIa aktivira novi FVII, odnosno pojačava stvaranje kompleksa TF/FVIIa koji aktivira FIX i FX u aktivne serinske proteaze FIXa i FXa (Neubauer i Zieger, 2021). Stvoreni FXa, iako sporo, može aktivirati FV u FVa. FXa veže se na stanice koje nose TF te se povezuje s kočimbenikom FVa i tvori tzv. kompleks protrombinaze (FXa-FVa) koji aktivira protrombin (FII) u trombin (FIIa). Stvorena količina trombina je manja od 5% ukupne količine trombina koji nastaje u procesu zgrušavanja. Tako mala količina trombina dovoljna je samo za aktivaciju faktora zgrušavanja FV, FVII i FIX i trombocita čime započinje druga amplifikacijska faza zgrušavanja. Nastala količina trombina nije dovoljna za pretvorbu fibrinogena u fibrin te nastanak hemostatskog ugruška (Sertić i sur., 2008).

U amplifikacijskoj fazi težište zgrušavanja prebacuje se sa stanica koje nose TF na trombocite koji su aktivirani malom količinom trombina nastalog u inicijacijskoj fazi. VWF služi kao nosač faktora VIII (FVIII) te ga štiti od prerane proteolitičke razgradnje (Neubauer i Zieger, 2021; Yong i sur., 2023). Trombin koji je nastao u početnoj fazi zgrušavanja aktivira FVIII te ga odcjepljuje od VWF, nestabilan FVIIIa veže se na trombocitnoj površini preko specifičnog

veznog mjesta. Trombin se veže na trombocite preko GPIIb α i transmembranskih receptora PAR-1 i PAR-4 čime se osigurava maksimalni hemostatski učinak trombocita. Nakon aktivacije iz trombocita se počinju lučiti hemostatski aktivne tvari, uključujući i četiri faktora zgrušavanja koji su pohranjeni u alfa granulama i citoplazmi trombocita (fibrinogen, FV, faktor XI (FXI) i faktor XIII (FXIII)). Mala količina trombina stvorena u inicijacijskoj fazi aktivira FV, FVIII i FXI u FVa, FVIIIa i FIXa, te pojačava signal za adheziju trombocita. Navedeni faktori izravno sudjeluju u nastanku stabilnog fibrinskog ugruška. Amplifikacijska faza završava vezanjem FVa, FVIIIa, FXIa i FIXa na površinu trombocita. Aktivirani trombociti, FVa, FVIIIa i FXIa omogućuju nastanak prokoagulacijskih kompleksa te velike količine trombina u propagacijskoj fazi (Sertić i sur., 2008).

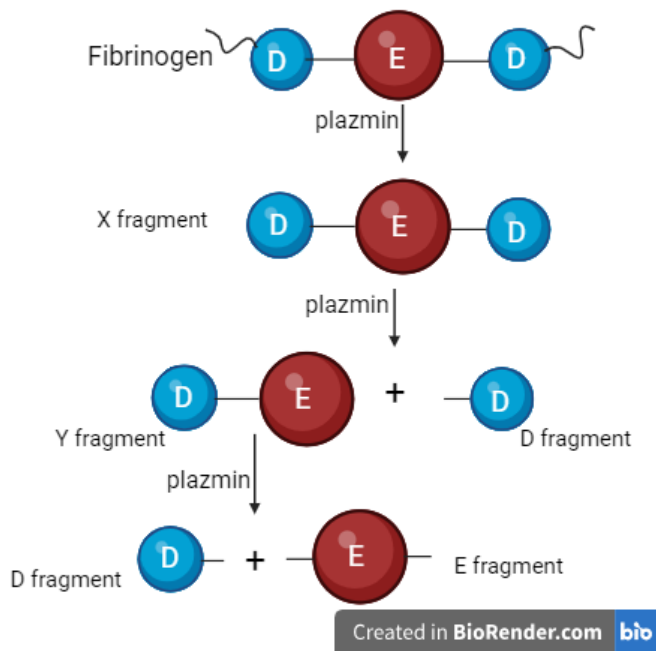
Propagacijska faza odvija se na površini aktiviranih trombocita na kojoj su vezani FIXa, FVa, FVIIIa i FXIa. FIXa vezan na površini trombocita nastao je djelovanjem kompleksa TF/VIIa u inicijacijskoj fazi. Dodatna količina FIXa nastaje djelovanjem FXIa koji je prethodno vezan na površinu trombocita. FVIIIa i FIXa tvore tenazni kompleks (FVIIIa/FIXa) koji u propagacijskoj fazi aktivira značajnu količinu FX iz plazme u FXa koji se veže na aktiviranu trombocitnu membranu. Tenazni kompleks (FVIIIa/FIXa) 10^5 - 10^6 puta brže aktivira FX od samog FIXa te 50-100 puta brže od kompleksa TF-FVIIa. FXa koji je nastao na površini trombocita zaštićen je od djelovanja inhibitora zgrušavanja (TFPI, AT i heparina), vezanjem s FVa u kompleks protrombinaze. Aktivacijom kompleksa protrombinaze nastaju velike količine trombina (trombinski prasak, nastaje 95% trombina). Velika količina trombina potrebna je za formiranje stabilnog trombocitno-fibrinskog ugruška pretvorbom fibrinogena u fibrin. Trombin hidrolizira fibrinogen te nastaju fibrinski monomer. Polimerizacijom i uvođenjem kovalentnih veza djelovanjem transglutaminaze ili aktiviranog FXIII (FXIIIa) nastalog djelovanjem trombina na FXIII nastaje stabilan ugrušak čime proces zgrušavanja završava (Sertić i sur., 2008; Chaudhry i sur., 2022).



Slika 1. Stanični model zgrušavanja (prilagođeno prema Topić i sur., 2017, izrađeno u BioRender.com)

1.2. Fibrinoliza

Fibrinoliza je proces liziranja stvorenog fibrinskog ugruška koji u najvećoj mjeri ovisi o aktivaciji plazminogena. Plazminogen se aktivira djelovanjem tkivnog (*eng. tissue-type plasminogen activator*, t-PA) ili urokinaznog aktivatora plazminogena (*eng. urokinase-type plasminogen activator*, u-PA), pri čemu nastaje plazmin, koji je ključan enzim fibrinolitičkog sustava. Plazmin hidrolizira različite supstrate, a najvažnije je njegovo djelovanje na fibrinogen i fibrin (Sertić i sur., 2008). Fibrinogen je topljivi protein koji se nalazi u cirkulaciji, a čine ga 2 seta lanaca koja se sastoje od 3 različita polipeptidna lanca međusobno povezana disulfidnim vezama ($A\alpha$, $B\beta$, i γ). Lanci se sintetiziraju na 3 odvojena gena na kromosomu 4. Fibrinogen i fibrin su glavne mete plazmina, koji se razgrađuju na fibrin monomere uklonjenjem terminalnih fibrinopeptida A i B. Razgradnjom fibrinogena ili fibrina plazminom nastaju manji fragmenti, fragment X koji se daljnjim djelovanjem plazmina razgradi na fragmente Y i D te kao konačni produkt razgradnje nastaju fragmenti D i E (Chapin i Hajjar, 2015).



Slika 2. Razgradnja fibrinogena plazminom (prilagođeno prema Aizawa i sur., 2003, izrađeno u BioRender.com)

Fibrinoliza je proces koji se odvija u stupnjevima te nastaju produkti različite molekulske mase. Najmanji razgradni produkt umreženog fibrina su D-dimeri. D-dimer je zajednički naziv za skupinu različitih razgradnih produkata fibrina. Približna molekularna masa mu je 190 kDa, a sastoji se od 2 kovalentno povezane domene susjednih γ -lanaca (Sertić i sur., 2008).

1.2.1. Plazmin

Plazmin je proteolitički enzim koji razgrađuje ugrušak na proteinske fragmente koji se uklanjaju iz plazme putem monocitno-makrofagnog sustava u jetri, a nastaje aktivacijom zimogena plazminogena. U humanim stanicama 1947. godine detektiran je t-PA, a 1952. godine iz urina je otkriven u-PA. Navedeni enzimi nisu proteaze, nego proteini koji vežu plazminogen. Nastali kompleks proteina i plazminogena sam postaje aktivator plazminogena. Osim na navedeni način, plazminogen se može aktivirati drugim serinskim proteazama uključujući kalikrein, aktivirani FXII (FXIIa), FXIa i komplement (Medcalf i Keragala, 2021). Plazmin uz fibrinogen i fibrin cijepa i FV i FVII, odnosno njihove argininske i lizinske peptidne veze. Najveći fragment koji je nastao cijepanjem fibrinogena ili fibrina je fragment X, koji je zadržao osjetljiva mjesta za trombin pa je stoga i njegov kompetitivni inhibitor (Safić i sur., 2016).

1.2.2. Trombin

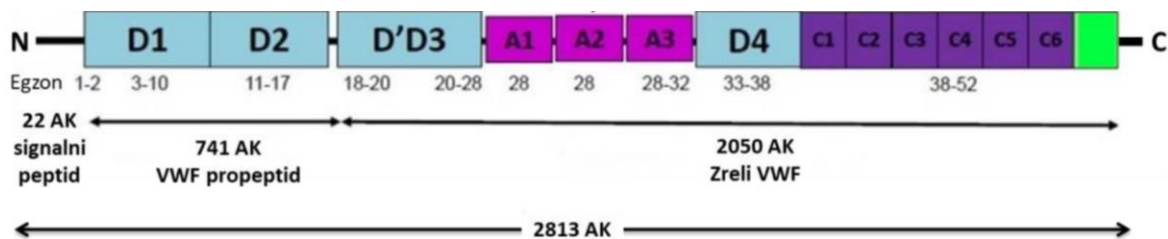
Trombin je serinska proteaza koja se odupire endogenoj fibrinolizi. Otpor pruža na različite načine, a svi oni rezultiraju nastajanjem stabilnog tromba. Trombin kao snažan aktivator trombocita potiče njihovu agregaciju, što rezultira daljnjim stvaranjem trombina. Visoke koncentracije trombina stabiliziraju ugrušak cijepanjem fibrinogena u netopljivi fibrin, koji međusobno povezuje trombocite. Trombin izravno inhibira endogenu fibrinolizu aktivacijom TAFI (engl. *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*) koji veže i lizira karboksi-terminalne ostatke lizina na fibrinu. Navedeni proces sprječava vezanje i aktivaciju plazminogena u plazmin, koji razgrađuje fibrin na manje fragmente. Indirektna inhibicija endogene fibrinolize događa se zbog otpuštanja inhibitora plazminogenog aktivatora-1 (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1) iz trombocita, koji je potentni inhibitor tPA (Kanji i sur., 2021). Brzo djeluje na tPA, a osim u trombocitima, iz kojih se kontinuirano oslobađa u cirkulaciju, nalazi se i u plazmi (Safić sur., 2016). Otpuštanje PAI-1 aktivirano je unutarstaničnom signalizacijom koju pokreće proteazom aktiviran receptor (PAR). U prisutnosti visoke koncentracije trombina fibrinske niti su gusto zbijene, a ako je koncentracija trombina niska fibrinske niti nisu toliko zbijene (Kanji i sur., 2021).

1.3. Von Willebrandova bolest (VWB)

1.3.1. Von Willebrandov faktor

VWF je adhezijski multimerni glikoprotein kojeg sintetiziraju megakariociti i endotelne stanice. Većina VWF pohranjena je u alfa granulama i Weibel-Paladijevima tjelešcima koja nastaju multimerizacijom VWF te se pretpostavlja da su derivati Golgijevog aparata (Manz i sur., 2022; Lapić, 2022;).

Gen za sintezu VWF se nalazi na kromosomu 12 (12p13.2) te se sastoji od 52 egzona, a veličine je 178 kb (Manz i sur., 2022; Lapić, 2022; Chen i Chung, 2018; Randi i sur., 2018). Najveći egzon 28 sastoji od 1379 pb te je odgovoran za kodiranje ključnih regija VWF -a koje su odgovorne za vezanje liganada i uklanjanje VWF iz cirkulacije (Lapić, 2022). Prilikom sinteze VWF prvo nastaje prepropolipeptid koji se sastoji od 2813 aminokiselina (AK). Prepropolipeptid se sastoji od signalnog peptida, propeptida i zrele podjedinice. Signalni peptid nalazi se na aminoterminalnom kraju i ima 22 AK, propeptid se sastoji od 741 AK, a zrela monomerna jedinica VWF sastavljena je od 2050 AK (Manz i sur., 2022; Lapić, 2022; Chen i Chung, 2018; Randi i sur., 2018).



Slika 3. Domenska struktura von Willebrandova faktora (prilagođeno prema Lapić, 2022)

Preproteolipeptid prolazi kroz brojne posttranslacijske modifikacije u Golgijevom aparatu i endoplazmatskom retikulumu (ER). Na membrani hrapavog ER-a uklanja se signalni peptid (Chen i Chung, 2018). Proces N-glikozilacije započinje u ER. Enzim oligosahariltransferaza dodaje 14-saharidnih podjedinica, a one se sastoje od 3 molekule glukoze, 9 molekula manoze i 2 molekule N-acetilglukozamina ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{Nac}_2$). Podjedinice se dodaju na amino skupine asparaginskih ostataka osnovnog peptidnog lanca. Navedenim procesom nastaje 16 N-glikoziliranih ostataka. Za pravilno uvijanje proteina uklanjaju se 2 krajnje molekule glukoze uz pomoć enzima glukozidaze I i II. Nastala monoglikozilirana oligosaharidna jedinica $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{Nac}_2$ je vezno mjesto za nastajanje kompleksa s topljivim kalretikulinom ili kalneksinom koji je vezan na membranu ER. Disulfid-izomeraza A3 stvara disulfidne veze između tiolnih skupina (-SH) cisteinskih ostataka, a taj proces olakšava postizanje pravilne konfiguracije monomera VWF -a. Glukozidaza II uklanja zadnji glukozni ostatak, potom se monomer VWF-a odvaja od kompleksa s kalneksinom ili kalretikulinom te se uz djelovanje disulfid-izomeraze A1 povezuje u dimere. Uvjeti neutralnog pH pogoduju stvaranju disulfidnih veza unutar cistinskog čvora na karboksiterminalnom kraju unutar domene CK uz glukozidazu II. Nastali dimeri pro-VWF odlaze u Golgijev aparat gdje se odvija daljnja glikozilacija. Djelovanje manozidaze, N-acetilglukozamin-transferaze i fukozidaze označava početak N-glikozilacije u Golgijevom aparatu. N-glikozilacija završava djelovanjem galaktoziltransferaze i sijaliltransferaze, a kao produkt nastaju složeni glikani. N-acetilgalaktozamin se prenosi na površinu monomera VWF -a, točnije na hidroksilne skupine serinskih ili treoninskih ostataka te nastaju O-glikani. Dodavanjem oligosaharida nastaju složeniji O-glikani. Proces sijalinizacije je završni proces poslijetranslacijskog doradivanja monomera VWF-a. U navedenom procesu dolazi do vezanja sijalinske kiseline, a najzastupljenija je N-acetilneuraminska kiselina. Enzim furin u Golgijevom aparatu proteolitički cijepa propeptid von Willebrandova faktora (VWFpp), ali za to vrijeme on ostaje nekovalentnom vezom vezan na monomer VWF do njegovog otpuštanja u cirkulaciju. Proteolitičkim cijepanjem VWFpp olakšava se proces multimerizacije jer VWFpp ima oksidoreduktaznu aktivnost preko dva

aminokiselinska slijeda Cys-Gly-Leu-Cys u domeni D1 na pozicijama 159 do 162 i u domeni D2 na mjestima od 521 do 524. Multimerizacija se odvija pri kiselom pH 6,2 i visokim koncentracijama kalcijevih iona te se smatra da histidin ima ključnu ulogu, jer jedini od svih AK ima pKa 6 što je najbliže vrijednosti pH u Golgijevom aparatu koja je 6,2. pKa je razlog zašto dolazi do protoniranja histidinskih ostataka, dok se cisteinski ostaci Cys1099 i Cys1142 deprotoniraju te nastaju disulfidne veze između istovjetnih cisteinskih ostataka unutar domene D3 dimera VWF. U samom procesu multimerizacije dolazi do protoniranja histidinskih ostataka i deprotoniranja cisteinskih ostataka, a kao rezultat nastaju disulfidne veze koje povezuju istovjetne cisteinske ostatke unutar domene D3 dimera VWF-a te nastaju multimeri VWF koji u svojem sastavu sadrže najmanje dvije pa do 40 dimernih podjedinica. Nastali multimeri prema broju dimernih jedinica mogu se podijeliti na: multimer 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). Multimeri s većom molekulskom masom sadrže veći broj veznih mjesta za kolagen i GPIb, koji se nalazi na trombocitima. S obzirom na navedeni podatak hemostatska aktivnost VWF-a i klinička slika krvarenja izravno ovise o udjelu multimera velike molekulske mase (Lapić, 2022).

U normalnim uvjetima formiranje i distribuciju multimera VWF-a regulira plazmatska metaloproteinaza ADAMTS13 koja cijepa vezu između Tyr1605-Met1606 u domeni A2 VWF multimera (Berntrop i sur., 2013, Chen i Chung, 2018). VWF se proteolitički razgrađuje pa se u plazmi nalaze multimeri VWF-a različitih veličina i učinaka. Na taj način regulira se veličina VWF-a te posljedično prekomjerna aktivacija i agregacija trombocita na mjestu ozlijede krvne žile (Lapić, 2022). ADAMTS13 se primarno sintetizira u jetri, a moguća je i sinteza u drugim organima primjerice u srcu, placenti, mozgu i prostati (Chen i Chung, 2018).

1.3.2. Povijest VWB

Erik Adolf von Willebrand bio je finski liječnik. U travnju 1924. godine u bolnicu je zaprimljena petogodišnja djevojčica Hjördis S. Djevojčica je podrijetlom s Ålandskog otočja smještenog u Botničkom zaljevu između Švedske i Finske. Zaprimljena je u bolnicu zbog stalnog krvarenja iz nosa i desni, a tijekom svog života imala je više epizoda obilnih krvarenja iz nosa, usana, zglobova te nakon vađenja zubi. Iskrvarila je do smrti za vrijeme svoje četvrte menstruacije u dobi od 14 godina. Erik von Willebrand odlučio je detaljno obraditi 66 članova njezine obitelji te je doznao da je njih čak 23 imalo iste simptome kao Hjördis. Oba roditelja bila su sklona čestim krvarenjima iz nosa u ranom djetinjstvu, a četiri njezine sestre umrle su

između druge i četvrte godine života zbog nekontroliranog krvarenja iz nosa, gastrointestinalnog sustava i/ili od posljedica ozljeda (Berntrop i sur., 2013; Nilsson, 1999). Erik von Willebrand je 1926. godine opisao ovaj novootkriveni poremećaj krvarenja, a u svom radu objavio je sveobuhvatan opis njegovih kliničkih i genetskih značajki. Za razliku od hemofilije A, ovdje su bila zahvaćena oba spola, a dominantan simptom bilo je krvarenje iz sluznica. Najvažnija laboratorijska abnormalnost koja je bila zapažena je produljeno vrijeme krvarenja uz uredan broj trombocita. Ovaj novootkriveni klinički poremećaj nazvao je nasljednom pseudohemofilijom. Općenito je hemofilija x vezani recesivni poremećaj u kojem je aktivnost FVIII normalna, a oboljevaju samo muškarci (Federici i sur., 2006).

Tablica 1. Popis glavnih prekretnica u dijagnostici VWB od 1926 do 2006. (prilagođeno prema Federici i sur., 2006)

Godina	Događaj
1926.	Prvi opis VWB napravio je Erik von Willebrand na slučaju Hjärdis
1950.	Prvi test za FVIII kod hemofilije A
1956.	Primjenom percipitata plazme (krioprecipitata) koji u sebi sadrži fibrinogen i FVIII došlo je do poboljšanja kliničke slike osobe oboljele od VWB
1971.	Liječnik Zimmerman imunokemijskom metodom koja koristi antiserum na VWF dokazuje prisutnost faktora u zdravih osoba i bolesnika s hemofilijom A
1973.	Sinteza VWF uzgojenim humanim endotelnim stanicama
1974.	Križna imunoelktroforeza VWF kod ljudi s VWB
1980.	Struktura multimera VWF i VWB tip 2A vs. tip 2B
1985.	Otkriće gena za VWF
1994.	Klasifikacija VWB prema tipu
1996.	Identifikacija ADAMTS13 metaloproteinaze

VWB je najčešći poremećaj zgrušavanja krvi s procjenom prevalencije 1 na 1000 osoba (Sahrma i Haberichter, 2019). Bolest se dijeli na kvalitativni i kvantitativni oblik, ovisno o mutacijama uzrokovanim u genu za VWF. Sama dijagnostika VWB je složena, a temelji se na pozitivnoj osobnoj i/ili obiteljskoj anamnezi te se potvrđuje laboratorijskom dijagnostikom (Lapić, 2022; Sharma i Haberichter, 2019). Trenutačna klasifikacija VWB temelji se na kriterijima koji su razvijeni od strane Međunarodnog društva za trombozu i hemostazu (*engl. International Society on Thrombosis and Haemostasis, ISTH*), Nacionalnog instituta za srce,

pluća i krv (*engl. National Heart, Lung and Blood Institute in the USA*), Nacionalnog instituta za zdravlje (*engl. National Institutes of Health*). Smjernice su odobrene od stručnog vijeća VWB i temeljem fenotipskih obilježja VWF prema kojima se VWB dijeli u tri osnovne skupine (Sharma i Haberichter, 2019; Lapić, 2022). Važeća klasifikacija VWB uključuje: tip 1 kojeg karakterizira djelomični kvantitativni manjak VWF, tip 2 VWB gdje je prisutan kvalitativni manjak VWF i tip 3 VWB kojeg karakterizira potpuni manjak VWF (Sharma i Haberichter, 2019).

1.3.3. Tip 1 VWB

Tip 1 VWB je najčešći oblik VWB koji čini približno 85% svih slučajeva VWB (Sharma i Haberichter, 2019). Prisutan je kvantitativni manjak VWF uz očuvanu funkciju i raspodjelu multimera (Lapić, 2022; Flood i sur., 2019). Tipu 1 VWB pripisuje se smanjena koncentracija VWF. Funkcionalna aktivnost cirkulirajućeg VWF u usporedbi s razinom antigena VWF (VWF:Ag) je normalna, a udio multimera visoke molekularne mase nije značajno snižen. Smanjeno otpuštanje VWF iz endotelnih stanica, povećanje osjetljivosti VWF na proteolitičko djelovanje te njegovo ubrzano uklanjanje iz cirkulacije, za posljedicu može imati smanjenje razine VWF u cirkulaciji (Sadler i sur., 2006; Lapić, 2022). Tip 1 VWB teško je pouzdano dijagnosticirati jer su vrijednosti sniženih koncentracija VWF u plazmi, što je ujedno i osnovni laboratorijski kriterij, izrazito varijabilne. Vrlo niske razine VWF (npr. 5-20 kIU/L, što odgovara 5-20%) često su povezane s krvarenjem te su najčešće uzrokovane dominantnim mutacijama VWF. Klasifikacija takvih bolesnika u tip 1 VWB je opravdana kako bi bilo olakšano njihovo liječenje. Kod osoba s niskom razinom VWF (npr. 35-50 IU/dL, što odgovara 35-50%) dijagnoza tipa 1 VWB nije pouzdana jer se vrlo rijetko nasljeđuju te rijetko pokazuju povezanost s genom za VWF. U tom rasponu snižene se vrijednosti VWF mogu smatrati biomarkerom za povećan rizik od blagog krvarenja (Sadler i sur., 2006). Istraživanja su pokazala kako približno 35% bolesnika sa sniženim vrijednostima VWF nema mutaciju u genu za VWF te kako prisutnost mutacije vjerojatno raste kako se smanjuje aktivnost VWF (Sadler i sur., 2022). Zbog navedenoga se takve bolesnike ne svrstava u tip 1, nego se oni svrstavaju u zasebnu skupinu koja se zove „niski VWF“ (*engl. low VWF*) (Lapić, 2022).

1.3.4. Tip 2 VWB

Kod tipa 2 VWB greške u funkcioniranju VWF uglavnom su uzrokovane mutacijama u određenim dijelovima samog proteina (Sadler i sur., 2022). Genetski poremećaji obično se nalaze u DNA regiji koja odgovara zahvaćenoj funkcionalnoj domeni (Flood i sur., 2019). Tip 2 VWB dijeli se na 4 podskupine, a obuhvaća kvalitativne poremećaje VWF. Podjela u

podskupine ovisi o vrsti funkcionalnog i strukturnog poremećaja VWF (Lapić, 2022). Početno je utvrđena mutacija pogrešnog smisla (engl. Missense) na egzonu 28 koja je povezana s tipom 2 VWB, a mutacije za većinu ostalih tipova identificirane su za svaku domenu VWF. Mutacije koje su odgovorne za tip 2 VWB vrlo su prodorne te je fenotip krvarenja reproducibilan unutar određene obitelji, a samo kod tipa 2N evidentirano je recesivno nasljeđivanje. Najčešći kvalitativni poremećaj u tipu 2 VWB je ona koja utječe na epitope koji su uključeni u vezanje VWF na trombocitni GPIIb α , a do toga dolazi zbog selektivnog manjka HMWM-a i/ili IMWM-a (Tosetto i Castaman, 2015; Lapić, 2022).

U **tipu 2A** VWB postoji varijabilni manjak HMWM, a uzrokovan je mutacijama u domeni A2 koje utječu na proces multimerizacije ili na osjetljivost na ADAMTS13. Može se također javiti zbog mutacija u multimerizacijskim regijama D1/D2 i C-terminalnom kraju domene CK (Tosetto i Castaman, 2015).

Za **tip 2B** karakteristične su mutacije u domeni A1 koje uzrokuju povećan afinitet VWF-a za GpIb na trombocitima, kompleksi se ubrzano uklanjaju djelovanjem proteinaze ADAMTS13 te se posljedično gube HMWM (Lapić, 2022). Također zbog nakupljanja trombocita *in vivo* u približno 40% bolesnika prisutna je blaga do umjerena trombocitopenija (Tosetto i Castaman, 2015).

Mutacije u **tipu 2M** su uglavnom u domeni A1 ili rijetko u domeni A3. Mjesta za vezanje kolagena uglavnom su smještena unutar domene A3, a njihova se aktivnost provjerava testom vezanja kolagena (VWF:CBA), a koji je osjetljiv na gubitak HMWM koji se prvenstveno javlja kod tipa 2A. Stoga, smanjeni omjer VWF:CBA/VWF:Ag pomaže u razlikovanju tipa 2A od tipa 2M. Ukoliko je navedeni omjer manji od 0,6 radi se o tipu 2A, dok se normalne vrijednosti nalaze kod tipa 2M VWB (Tosetto i Castaman, 2015).

Mutacije pogrešnog smisla u FVIII vezujućoj domeni na N-terminalnom kraju VWF odgovorne su za **tip 2N** VWB (Tosetto i Castaman, 2015). Mutacija smanjuje sposobnost vezanja mutiranog VWF na FVIII, a nastaje zbog promjena u području domena D' i D3. Zbog navedene mutacije FVIII podložan je bržoj proteolitičkoj razgradnji te ima skraćeni životni vijek na dva sata (Lapić, 2022). Tip 2N obično karakterizira nesrazmjerni omjer FVIII/VWF:Ag (<0,5) s normalnim ili približno normalnim omjerom ristocetin-kofaktorske aktivnosti VWF (VWF:RCO) i VWF:Ag (Tosetto i Castaman, 2015). Ne postoji dovoljno laboratorijskih pretraga koje specifično mjere sposobnost VWF da veže FVIII, a zbog snižene razine FVIII ovaj oblik VWB može se zamijeniti s hemofilijom A (Lapić, 2022).

1.3.5. Tip 3 VWB

Najrjeđi i najteži oblik VWB je tip 3. Javlja se 1 slučaj na milijun stanovnika, a karakterizira ga kvantitativni manjak VWF s gotovo potpunim nedostatkom VWF u plazmi (Fogarty i sur., 2020). VWF je nemjerljiv, a aktivnost FVIII izrazito je snižena (Sharma i Haberichter, 2019).

1.3.6. Stečeni von Willebrandov sindrom

Osim genetskim nasljeđivanjem, krvarenje zbog poremećaja VWF-a može biti stečeno, odnosno uzrokovano nekim drugim osnovnim patofiziološkim poremećajem. Navedeni poremećaj zove se stečeni von Willebrandov sindrom (*engl. acquired von Willebrand syndrome*). Sindrom se najčešće javlja u starijoj životnoj dobi u bolesnika s limfoproliferacijskim bolestima, ali može biti pridružen i drugim poremećajima kao što su to solidni tumori, kod bolesnika s umjetnim srčanim zaliscima, autoimunim i kardiovaskularnim bolestima te mijeloproliferacijskim poremećajima. Do pojave sindroma dolazi zbog povećane razgradnje ili ubrzanog uklanjanja VWF iz cirkulacije, a laboratorijskom analizom vidljiva je snižena koncentracija i aktivnost VWF-a te često dolazi do selektivnog manjka HMWM (Lapić, 2022).

Obiteljskim studijama postavila se razina nasljednosti VWF koja iznosi približno 30%. Studije koje su provedene na blizancima utvrdile su procjenu nasljednosti VWF 75%, s 30% genetske varijance objašnjene učinkom krvnih grupa AB0, dok je približno 5% objašnjeno varijacijom u samom genu VWF. Također varijacijama u razini VWF doprinose i okolišni faktori, kao što su: zagađenje zraka, dim cigareta, trudnoća, vježbanje i starenje (Sadler i sur., 2022).

1.4. Preporuke dijagnostičkih testova za VWB

Za pacijente kod kojih postoji sumnja na VWB postoje specifične metode za procjenu krvarenja koje koreliraju s dijagnozom i težinom bolesti (Sharma i Haberichter). Nestandardizirani testovi za procjenu krvarenja koriste se za probir bolesnika koji imaju nisku vjerojatnost da boluju od VWB. Kod bolesnika koji imaju srednju vjerojatnost VWB (20%) prije testiranja upućuju se na hematološku procjenu zbog patološkog krvarenja ili zbog patoloških rezultata laboratorijskih testova, primjerice produljenog aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTV). Pacijenti koji imaju visoku vjerojatnost VWB (približno 50%, zbog oboljelog srodnika iz prvog koljena) bez obzira na simptome krvarenja ili patološke rezultate laboratorijskih pretraga se upućuju na pregled kod hematologa (James i sur., 2021). Određivanje koncentracije VWF:Ag je početni korak u dijagnostici VWB. Osim VWF:Ag mjeri se i aktivnost vezanja VWF na trombocite (VWF:GPIbM) i aktivnost FVIII. Dodatni

laboratorijski testovi izvode se za određivanje podtipa VWB. Neki od dodatnih testova su: VWF:CBA, VWF:RCO, vezanje VWF s FVIII, analiza multimeri VWF i određivanje propeptidnog VWF:Ag (Sharma i Haberichter).

1.5.Laboratorijska dijagnostika VWB

Testiranje na VWB trebalo bi se provoditi samo u osoba koje imaju pozitivnu osobnu ili obiteljsku anamnezu. Nakon što se utvrdi osobna ili obiteljska povijest krvarenja preporučuje se laboratorijsko testiranje. Sama potvrda dijagnoze dodatno je komplicirana zbog niske prodornosti, prekomjernog izražaja, laboratorijske varijabilnosti te velikog broja modifikatora koji utječu na razinu VWF-a pojedine osobe (Weyand i Flood, 2021). Za dijagnostiku VWB potrebna je primjena složenog dijagnostičkog pristupa zbog složene strukture, različitih uloga u sustavu zgrušavanja, raznolikosti kliničke slike i brojnih mutacija u genu za VWF. Pretrage koje se koriste u dijagnostici VWB mogu se podijeliti u 3 skupine: probirne laboratorijske pretrage, usmjerene laboratorijske pretrage i diferencijalno-dijagnostičke pretrage (Lapić, 2022).

1.5.1.Probirne laboratorijske pretrage

Testovi probira kao što je kompletna krvna slika, APTV i protrombinsko vrijeme (PV) vjerojatno će u većine bolesnika s VWB biti normalni pa nisu od neke velike koristi. APTV može biti produljeno u nekim težim slučajevima, zbog sekundarnog manjka FVIII, posebice u tipu 2N i tipu 3 VWB, a bolesnici s tipom 2B mogu imati trombocitopeniju (Weyand i Flood, 2021).

Pretraga *in vivo* koja se koristi za procjenu funkcije primarne hemostaze je mjerenje vremena krvarenja po Ivy-ju. Definirana je kao vrijeme koje je potrebno za zaustavljanje krvarenja nakon rasijecanja kože podlaktice pod stalnim tlakom koji iznosi 40 mmHg. Produljeno vrijeme krvarenja ne znači nužno da se radi o VWB, jer ono osim poremećaja VWF, može biti posljedica različitih poremećaja trombocita i anemija. Vrijeme krvarenja više se ne preporučuje kao probirna pretraga zbog invazivnosti samog postupka, ručne izvedbe i nedovoljne osjetljivosti za VWB (Lapić, 2022).

Mjerenjem vremena nastanka trombocitnog ugruška na analizatoru funkcije trombocita kvantitativno se ispituje kapacitet primarne hemostaze. Prilikom mjerenja oponašaju se uvjeti fiziološke brzine protoka krvi u arterijama *in vivo*. Djelovanjem adrenalina, odnosno ADP-a, koji su trombocitni agonisti, dolazi do prijanjanja i nakupljanja trombocita na kolagenskoj membrani. Međutim, vrijeme nastanka ugruška može biti produljeno i kod drugih čimbenika

koji utječu na primarnu hemostazu. Terapija antiagregacijskim lijekovima kao i bilo kakav kvalitativni i kvantitativni poremećaj trombocita mogu utjecati na primarnu hemostazu. Ova pretraga ima gotovo 100% negativnu prediktivnu vrijednost za VWB pa se koristi za isključenje VWB, ako je prilikom mjerenja vremena nastanka ugruška s oba trombocitna agonista dobiven uredan nalaz (Lapić, 2022).

VWF:Ag je kvantitativni test u kojem se procjenjuje koncentracija VWF-a u plazmi. Test se može izvoditi enzimski povezanim imunosorpcijskim testovima (*engl. enyzmelinked immunosorbent assay*, ELISA) ili automatiziranim lateks imunotestom (*engl. latex immunoassay*, LIA). Dokazivanje prisutnosti VWF ne procjenjuje njegovu funkciju te je za dijagnostiku VWB potrebno napraviti dodatne testove za otkrivanje disfunkcije VWF-a (Roberts i Flood, 2015).

1.5.2. Usmjerene laboratorijske pretrage

Niti jedan pojedinačni test ne može potvrditi prisutnost potpuno funkcionalnog VWF-a, stoga je prilikom početne procjene bolesti potrebno kombinirati više različitih testova (Roberts i Flood, 2015). Određuje se aktivnost i koncentracija VWF, odnosno njegovog antigena te se određuje i aktivnost FVIII (Lapić, 2022).

Zlatni standard za određivanje funkcionalnosti VWF je test u kojem se određuje VWF:RCo. Test koristi antibiotik ristocetin za induciranje interakcije VWF s trombocitnim GpIb čime se potiče aglutinacija trombocita. Unatoč širokoj upotrebi test ima svoja ograničenja, primjerice analizom uzorka pokazuje visoke inter- i intralaboratorijske vrijednosti koeficijenta varijacije (Fogarty i sur., 2020). Također na izvedbu testa utječe kratkotrajna stabilnost i različitost sastava trombocitnih pripravaka te nepreciznost koja je posljedica izvođenja navedene ručne metode (Lapić, 2022). Zbog navedenih ograničenja razvijaju se novi komercijalni testovi kako bi se poboljšala procjena funkcionalne aktivnosti VWF ovisnog o trombocitima. Ovi testovi uključuju testove VWF:GPIbR i VWF:GPIbM (Fogarty i sur., 2020).

VWF:GPIbR test zahtjeva prisutnost ristocetin, ali umjesto trombocita koristi rekombinantni GPIb fragment (Fogarty i sur., 2020). Princip metode jest da se trombociti zamijene s lateks-česticama koje su obložene rekombinantnim divljim tipom trombocitnog GPIb. Ristocetin potiče aglutinaciju lateks čestica VWF-om što se može mjeriti turbidimetrijski. Navedena metoda postoji i u obliku magnetnih čestica koje su obložene rekombinantnim GPIb. Načelo navedenog testa temelji se na vezanju VWF iz uzorka na GPIb koje je potaknut ristocetinom.

Dodatkom monoklonskog protutijela obilježenog izoluminolom na VWF dolazi do razvijanja kemiluminescencije, a ona je proporcionalna aktivnosti VWF-a (Lapić, 2022).

VWF:GPIbM test koristi rekombinantnu molekulu GPIb α , ona sadrži brojne mutacije, prethodno povezanih s VWB trombotičnog tipa. Navedena GPIb varijanta veže se na domenu A1 VWF-a i kada ristocetin nije prisutan. Novi testovi aktivnosti VWF-a imaju niži koeficijent varijacije i nižu granicu detekcije u usporedbi s originalnim testovima VWF:RCo (Fogarty i sur., 2020).

Određivanje VWF:Ag je kvantitativni test za mjerenje koncentracije VWF u plazmi (Roberts i Flood, 2015) kojim se određuje koncentracija glikoproteinske molekule VWF neovisno o njenoj funkcionalnoj aktivnosti (Lapić, 2022). Može se izvoditi ELISA-om ili LIA-om (Roberts i Flood, 2015). Imunoturbidimetrijska metoda je automatizirana metoda u kojoj su polistirenske kuglice obilježene specifičnim protutijelima na VWF. Nakon vezanja VWF-a iz uzorka i protutijela dolazi do aglutinacije koja za posljedicu ima povećanje zamućenja reakcijske smjese, a to je razmjerno koncentraciji VWF:Ag u uzorku (Lapić, 2022). Test je ograničen jer određuje samo koncentraciju VWF u plazmi, ali ne i njegovu funkciju (Roberts i Flood, 2015).

Određivanje aktivnosti faktora VIII (FVIII:C) uključeno je u obradu bolesnika sa sumnjom ili potvrđenom dijagnozom VWB jer je VWF proteinski nosač FVIII (Roberts i Flood, 2015). Metode kojima se provodi mjerenje aktivnosti FVIII su koagulacijska ili kromogena metoda. Najčešće korištena metoda je koagulacijska metoda u jednom stupnju. Načelo metode je da ispitivani uzorak korigira APTV u mješavini s FVIII deficitarnom plazmom, odnosno plazmom koja sadržava sve faktore osim FVIII (aktivnost FVIII<1%). Produljeno APTV ovisi isključivo o aktivnosti FVIII u ispitivanom uzorku te se na taj način dodatno olakšava određivanje tipa VWB. Aktivnost FVIII izrazito je snižena kod bolesnika s tipom 3 VWB, a blago do umjereno snižena aktivnost je kod bolesnika s tipom 1 i 2 VWB (Lapić, 2022). Osobe s tipom 2N VWB mogu imati normalnu ili nisku razinu VWF uz sniženu razinu FVIII. Omjer FVIII/VWF:Ag je manji od 0,6 u osoba s tipom 2N VWB. Sličan omjer imaju i pacijenti s hemoofilijom A pa su potrebna dodatna testiranja za razlikovanje hemoofilije A od 2N VWB. Za dodatno testiranje može se napraviti ELISA test za procjenu vezanja FVIII na VWF pomoću endogenog izvora FVIII, a također se može provesti i ciljano gensko testiranje kako bi se sa sigurnošću potvrdio tip 2N VWB (Weyand i Flood, 2021). Kod svih ostalih tipova VWB omjer aktivnosti FVIII i VWF:Ag bit će jednak 1 (Lapić, 2022).

1.5.3. Diferencijalno dijagnostičke pretrage

Diferencijalno dijagnostičke pretrage koriste se za ispitivanje dodatne strukture i/ili funkcionalnih svojstva VWF te se koriste u svrhu diferencijalne dijagnostike podtipova same bolesti (Lapić, 2022).

Analiza multimera VWF provodi se pomoću kvalitativne vizualne procjene i kvantitativne denzitometrijske procjene gel elektroforezom na agaroznom gelu uz imunofiksaciju sa specifičnim VWF antiserumom (Weyand i Flood, 2021; Lapić 2022). Analiza multimera nema dijagnostičku vrijednost u bolesnika s tipom 3 VWB jer oni imaju potpuni nedostatak VWF. Koristi se kao pretraga za razlikovanje tipova 2A i 2B VWB od tipova 1, 2N i 2M VWB (Lapić, 2022). Patološke vrijednosti VWF:CBA ili manjak multimera HMWM i/ili IMWM slažu se s tipovima 2A i 2B, dok normalan VWF:CBA i uredna raspodjela multimera upućuju na tip 2M (Weyand i Flood, 2021; Lapić 2022). Tip 1 i tip 2N imaju uglavnom urednu raspodjelu multimera i jednakomjerno snižen intenzitet svih frakcija, ili su prisutne samo blage promjene strukture multimera i njihove raspodjele (Lapić, 2022).

VWF:CBA može služiti kao zamjena za detekciju HMWM. Tip 2M VWB ima specifičan poremećaj vezanja kolagena (Roberts i Flood, 2015). Metode koje se koriste su ELISA i automatizirana kemiluminescentna imunokemijska metoda, a one se temelje na određivanju stupnja vezanja VWF iz bolesnikovog uzorka na kolagen. Za izvedbu testova najčešće se koriste kolagen tipa I i tipa III koji su prisutni samostalno ili u kombinaciji, a služe ispitivanju poremećaja u veznom mjestu za kolagen unutar domene A3 VWF-a. Kolagen tipa IV koristi se za otkrivanje oblika VWB gdje postoji poremećaj u vezanju kolagena u domeni A1 VWF-a. VWF:CBA izravno ovisi o manjku HMWM-ova jer HMWM-ovi imaju najviše veznih mjesta za kolagen. Služi za razlikovanje tipa 2A i 2B od 2M. Kod tipova 2 A i 2B dolazi do gubitka HMWM-ova, dok je kod tipa 2M VWB očuvana multimerna struktura i sposobnost vezanja kolagena (Lapić, 2022).

Test vezanja FVIII (VWF:FVIII B) ispituje sposobnost vezanja VWF izoliranog iz pacijentove plazme s rekombinantnim FVIII (Roberts i Flood, 2015). Test se izvodi metodom ELISA, a koristi se za potvrdu dijagnoze 2N tipa VWB. Kod tipa 2N VWB dolazi do snižene aktivnosti FVIII zbog ubrzane proteolitičke razgradnje, također su snižene vrijednosti VWF:FVIII B zbog smanjenog afiniteta vezanja FVIII. Blagu hemofiliju A može se zamijeniti s tipom 2N VWB zbog snižene aktivnosti FVIII i blagog krvarenja. Izračunavanjem omjera VWF:FVIII B i VWF:Ag moguće je razlikovati tip 2N VWB od hemofilije A. Kod 2N tipa VWB omjer je

manji od 0,6, a kod hemofilije A omjer je uredan jer u njoj je očuvana sposobnost vezanja FVIII na VWF (Lapić, 2022).

Agregacija trombocita potaknuta ristocetinom (RIPA) koristi se za razlikovanje tipa 2A od tipa 2B (Weyand i Flood, 2021). Ispituje se međusobna interakcija trombocitnog kompleksa GPIb/IX/V i VWF-a. Ristocetin potiče agregaciju trombocita, a stupanj agregacije mjeri se optičkom metodom gdje se određuje porast transmisije svjetla kroz reakcijsku kivetu. Kod tipa 2B VWB agregacija trombocita prisutna je kod visoke i kod niske koncentracije ristocetina, a to se događa jer u tipu 2B dolazi do poremećaja koji uzrokuje pojačano vezanje VWF na trombocitni GPIb (Lapić, 2022).

1.6. Terapija za VWB

Prilikom liječenja VWB cilj je regulirati poremećaj adhezije i agregacije trombocita do kojih dolazi zbog manjka VWF-a. Također, zbog snižene aktivnosti FVIII potrebno je regulirati poremećaj unutarnjeg puta zgrušavanja. Ovisno o tipu bolesti, poremećaju VWF i težini krvarenja moguće je koristiti nekoliko terapijskih opcija (Lapić, 2022).

Traneksamična kiselina je antifibrinolitik koji inhibira fibrinolizu vežući se za plazminogen tijekom njegove pretvorbe u plazmin, a vezanje se odvija preko veznih mjesta za lizin. Nastali kompleks traneksamična kiselina-plazmin, za razliku od slobodnog plazmina, slabije djeluje na fibrin (Fogarty i sur., 2020).

Dezmopresin (1-dezamino-8-D-arginin-vazopresin) je sintetski derivat antidiuretskog hormona, a djeluje tako da potiče oslobađanje VWF i FVIII iz endotelnih skladišta u bolesnika s VWB (Mannucci, 2019).

Nadomjesna terapija najčešće se primjenjuje preventivno prije invazivnih postupaka kod kojih postoji rizik od pojačanog krvarenja, primjerice operacijskih zahvata (Lapić, 2022). Postoji niz različitih komercijalnih plazmatskih koncentrata VWF. Do razlike između koncentracija VWF-a komercijalnih pripravaka dolazi zbog: izvora plazme, metodologije pročišćavanja, načina obrade inaktivacije virusa, sastava multimera VWF-a te sadržaja FVIII (Fogarty i sur., 2020). Pripravci u svome sastavu sadrže VWF i FVIII, a rjeđe mogu sadržavati samo VWF (Lapić, 2022).

1.7.Primjena testa stvaranja trombina (*engl.thrombin generation assay, TGA*)

TGA i uređaji za mjerenje TGA doprinose razumijevanju procesa koagulacije. Unaprijeđeno je razumijevanje hemostatske ravnoteže, a samim time brže je i predviđanje promjena u hemostatskom stanju pojedinca.

Moguća su proučavanja toksičnosti vezane uz hranu, okoliš i lijekove pomoću TGA. Također, test se može koristiti u razvoju lijekova za istraživanje farmakoloških principa i nuspojava. Osobito se pokazao korisnim u razvoju antikoagulansa i njihovih antidota te za niz različitih novije razvijenih terapijskih pripravaka za liječenje hemofilije. Primjerice, TGA je korišten za dokazivanje da pdFVIII/VWF (*engl. Plasma-derived FVIII/VWF complex*) u kombinaciji s emicizumabom ima neaditivni učinak na stvaranje trombina, što sugerira da emicizumabi ima ograničenu sposobnost promicanja aktivacije FX u prisutnosti pdFVIII/VWF, čime se smanjuje rizik od predoziranja i trombotičkih događaja (Bravo i sur., 2020). Zbog nedostatka prikladnih testova za određivanje aktivnih sastojaka lijeka može se pratiti liječenje bolesnika pomoću parametara izmjerenih TGA-om (Depasse i sur., 2021). Pacijentima s visokim kliničkim rizikom od krvarenja, koji su na dvojnjoj antitrombotičnoj terapiji, praćenjem parametara TGA pokazano je da dolazi do smanjenog i odgođenog stvaranja trombina u plazmi siromašnoj trombocitima, vjerojatno zbog varijacije faktora koagulacije. TGA ima potencijal poboljšanja identifikacije pacijenata koji su na dvostrukoj antitrombotičnoj terapiji, a imaju povećan rizika od krvarenja (de Breet i sur., 2021). Također, TGA se može koristiti u razne dijagnostičke svrhe. Velikom dijelu pacijenata s blagom do umjerenom sklonošću krvarenju nije moguće ustanoviti dijagnozu i to se onda naziva krvarenje nepoznatog uzroka. Takvi bolesnici imaju oslabljeni hemostatski kapacitet, a to se odražava na način da je niži potencijal stvaranja trombina, niža stopa stvaranja ugrušaka, povećan turbiditet ugruška i kraće vrijeme lize ugruška. Svi navedeni događaji mogu povećati pacijentovu sklonost krvarenju. Testovi koji prate navedene parametre mogu upozoriti liječnika na poremećaj hemostaze te bi se trebalo razmotriti izvođenje TGA kada tradicionalni laboratorijski testovi ne otkrivaju kliničku sklonost krvarenju (Hofer i sur., 2019).

2.OBRAZLOŽENJE TEME

VWB je najčešći nasljedni poremećaj krvarenja. Dijagnostika VWB je vrlo složena te je potrebno poznavanje obiteljske i osobne anamneze, kliničke slike i rezultata laboratorijskih testova. Krvarenja uglavnom nastupaju nakon ozbiljnih trauma ili operativnih zahvata, ali kod težih oblika VWB postoji i sklonost spontanim krvarenjima. Postoje 3 glavna tipa VWB. Tip 1 je oblik VWB kod kojeg osoba ima smanjenu razinu VWF u krvi. Srednje težak oblik je tip 2 VWB kojeg karakterizira kvalitativni poremećaj u sintezi VWF. Tip 3 je oblik VWB s najtežom kliničkom slikom kod kojeg oboljela osoba nema ili ima vrlo malo VWF.

Test TGA omogućuje kinetičko praćenje nastajanja trombina koje je potaknuto djelovanjem prokoagulacijskih faktora te potrošnju trombina kao rezultat djelovanja antikoagulansa, odnosno test procjenjuje ravnotežu između stvaranja i potrošnju trombina. Pri tome se mjeri vrijeme koje je proteklo od početka reakcije do stvaranja trombina (parametar tLag). Vrijeme do pika (parametar tPeak) odgovara vremenu u kojem je stvorena najveća količina trombina. Parametar Peak je pik trombina i korelira s najvišom koncentracijom stvorenog trombina, dok je parametar indeks brzine (VI) nagib pravca između tLag i tPeak te korelira s prvom derivacijom tog dijela krivulje. Površina ispod krivulje (*engl. Area under the curve, AUC*) odgovara endogenom potencijalu trombina te predstavlja ukupnu količinu stvorenog trombina.

Cilj ovog rada je odrediti prethodno navedene parametre (tLag, tPeak, Peak, VI i AUC) stvaranja trombina u uzorcima plazme ispitanika s različitim tipovima VWB pomoću automatiziranog komercijalno dostupnog testa TGA RB (*engl.thrombin generation assay reagent B*) na analizatoru Ceveron®s100 (Technoclone, Beč, Austrija). Na temelju dobivenih rezultata ispitat će se postoje li razlike ispitanih parametara ovisno o tipu VWB.

Hipoteza je kako s obzirom na heterogenost same bolesti postoji razlika ispitivanih parametara stvaranja trombina ovisno o tipu VWB.

S obzirom kako je dio ispitanika u krvnome srodstvu, na temelju analiziranih rezultata dodatno će se ispitati postoji li razlika ispitivanih parametara ovisno o krvnom srodstvu.

Također će se ispitati i korelacija između analiziranih parametara i aktivnosti VWF, koncentracije antigena VWF, APTV-a i aktivnosti FVIII.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Uzorci korišteni za izradu ovog diplomskog rada su uzorci ispitanika koji su prethodno uzorkovani u svrhu izrade disertacije dr. sc. Lapić Ivane, mag. med. biochem. U istraživanje su uključena 72 uzorka ispitanika kojima je na temelju kliničke slike i ranije laboratorijske obrade postavljena dijagnoza VWB. Bolesnici su uključeni u istraživanje neovisno o spolu, dobi, vremenu postavljanja dijagnoze ili načinu liječenja. Za uzorkovanje su korištene dvije epruvete s 3,2-postotnim trinatrijevim citratom (0,105-0,109 M) kao antikoagulantom volumena 2,7 mL ili 4,5 mL. Dvostruko centrifugiranje 15 minuta na 4000 okretaja/min provedeno je kako bi se dobila plazma siromašna trombocitima. (Lapić, 2022).

Uzorci plazme su do analize bili pohranjeni u zamrzivaču na -80°C. Prije početka analize uzorci su odmrzavani 15 minuta u vodenoj kupelji na temperaturi od 37°C. Neposredno prije stavljanja u analizator uzorke je bilo potrebno homogenizirati laganim miješanjem citratne plazme. Laboratorijska analiza provedena je na Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Prije sudjelovanja u istraživanju svi ispitanici su potpisali informirani pristanak. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb (klasa: 8.1-19/293-2; broj: 02/21 AG) te Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (klasa: 643-02/20-01/02; ur. broj: 251-62-03-20-13).

3.2. METODE

3.2.1. Uređaji serije Ceveron®100

Ceveron®100 (Technoclone, Beč, Austrija) je potpuno automatiziran koagulometrijski uređaj. Koristi se za sve testove zgrušavanja iz plazme te za rutinska mjerenja i istraživanja u *in vitro* dijagnostičke svrhe. Postoji više različitih serija uređaja koje se razlikuju u mjernim metodama za pojedini analit. Ceveron c100 u svom radu koristi koagulometrijske i kromogene metode. Ceveron t100 uz koagulometrijske i kromogene metode koristi i fluorimetrijsku metodu. Ceveron s100 automatizirani koagulacijski mjerni uređaj koji je korišten u ovom istraživanju, najnapredniji je od svih serija jer, osim prethodno navedenih metoda, može raditi i

koagulacijske testove bazirane na quenching tehnologiji (pr. TECHNOFLUOR Factor XIII Activity i TECHNOFLUOR ADAMTS13 Activity). Pozitivne strane ovog analizatora su: optimizacija za sve reagense tvrtke Technoclone, visoka fleksibilnost, visoka preciznost, kompatibilnost za povezivanje na laboratorijski informacijski sustav (LIS), jednostavan za korištenje, potreba malog volumena i skoro neograničen raspon parametara.

3.2.2. Principi metoda koje koristi Ceveron®s100

Ceveron®s100 (Technoclone, Beč, Austrija) analizator u svojem radu može koristiti nekoliko različitih metoda, a to su: koagulometrijska, kromogena i fluorimetrijska metoda te quenching tehnologija.

Koagulometrijskim metodama mjeri se vrijeme koje je potrebno za nastajanje fibrinskog ugruška. Određuje se brzina stvaranja fibrina, a ona je ovisna o aktivnosti jednoga ili više faktora zgrušavanja.

Kromogene metode služe za izravno određivanje aktivnosti faktora zgrušavanja ili prirodnih inhibitora sustava zgrušavanja. Dolazi do promjene apsorbancije poslije direktne ili indirektna reakcije analita s kromogenim supstratom. Pozitivna strana ove metode je što je promjena apsorbancije neovisna o koncentraciji i kvaliteti fibrinogena.

Imunokemijski testovi promjenu apsorbancije detektiraju za vrijeme stvaranja kompleksa antigen-antitijelo. Pomoću njih određuje se koncentracija pojedinih komponenti sustava zgrušavanja i fibrinolize, a temelje se na reakciji između antigena i antitijela.

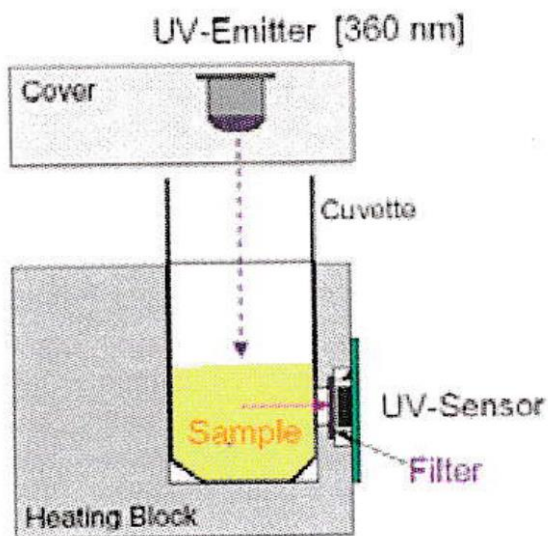
„Quenching“ tehnologija temelji se na visoko osjetljivim mjerenjima fluorescencije. Navedena tehnologija može se koristiti u različitim metodama, primjerice FRET (*eng. fluorescence resonance energy transfer*). Molekula koja prihvaća rezonancijsku energiju je akceptor, a ona koja daje donor. Ta dva fluorofora (donor i akceptor) kreirana su tako da se nalaze ili na probi ili jedna na probi, a druga na klici. Kada se ta dva fluorofora nalaze u neposrednoj blizini dolazi do emisije fluorescencije.

3.2.3. Princip testa TGA

Stvaranje trombina rezultat je aktivacije prokoagulacijskih faktora koagulacije (Valke i sur., 2022). Analizator omogućuje istodobno mjerenje koagulometrijskih testova i stvaranja trombina.

Stvaranje trombina mjeri se posebno prilagođenim fluorimetrijskim modulom TGA koji se prilikom mjerenja postavlja iznad rotora za kivete. U modulu se nalazi izvor UV zračenja (360

nm) i UV senzor koji omogućuju kinetičko mjerenje stvaranja trombina, što je prikazano na slici 4.

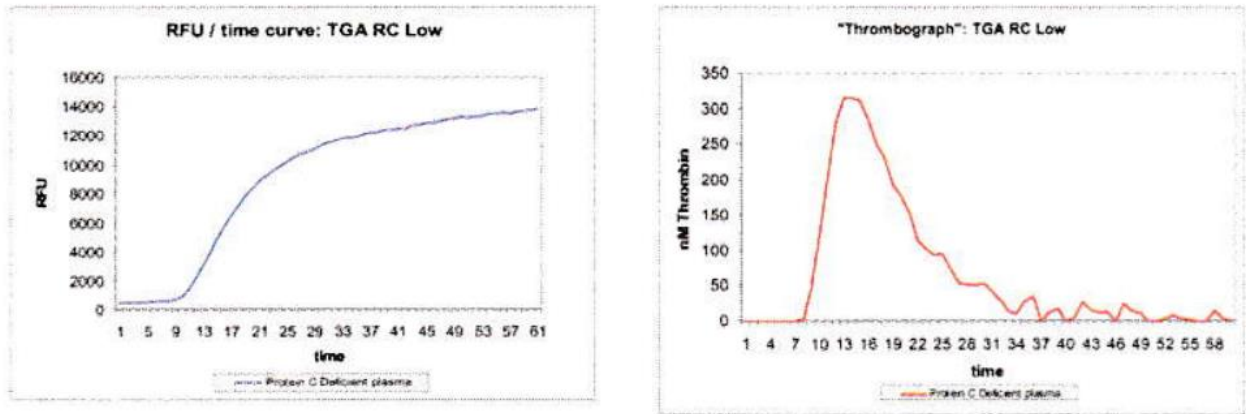


Slika 4. Princip mjerenja modula TGA (slika preuzeta s postera TECHNOTROMBIN TGA a novel Thrombin Generation Assay suitable for the new routine coagulation analyzer Ceveron® alpha, (Kaufmann i sur. 2021, Center for Biomolevular Madicine and Pharmacology, Medical University, Vienna, Austrija)

TECHNOTROMBIN® TGA ima raznoliku primjenu zbog svoje mogućnosti mjerenja cjelokupne kinetike stvaranja trombina. Mjeri kinetiku stvaranja trombina za vrijeme početka stvaranja trombina, amplifikacijske faze te kada dolazi do smanjenja regulacije stvaranja trombina. Za *in vitro* mjerenje stvaranja trombina koristi se supstrat koji otpušta kromogeni ili fluorogeni signal (Valke i sur., 2022). Unutar pakiranja TECHNOTROMBIN® TGA nalaze se reagensi s različitim koncentracijama TF-a što je zaslužno za praćenje cjelokupne kinetike stvaranja trombina.

TECHNOTROMBIN® TGA služi za određivanje stvaranja trombina u punoj krvi ili citratnoj plazmi nakon aktivacije koagulacijske kaskade. Koagulacijska kaskada se aktivira pomoću micela negativno nabijenih fosfolipida koje sadrže različitu koncentraciju TF-a i CaCl_2 . TECHNOTROMBIN® TGA temelji se na promatranju stvaranja fluorescencije koja nastaje cijepanjem fluorogenog supstrata trombinom u definiranom vremenskom intervalu. Do cijepanja dolazi nakon aktivacije koagulacijske kaskade TF različitim koncentracija (RA, RB, RC Low i RC High) i negativno nabijenih fosfolipida u plazmi. Različite koncentracije TF zaslužne su za praćenje cjelokupne kinetike stvaranja trombina. Koncentracija trombina (nM) se u uzorku može izračunati iz kalibracijske krivulje, a potrebna je jedna kalibracija za svaki

serijski broj reagensa. Kalibracijska krivulja dobiva se mjerenjem promjene fluorescencije u vremenu. Na temelju dobivene kalibracijske krivulje analizator izrađuje kalibracijsku krivulju („trombograf“) koji prikazuje odnos koncentracije trombina u ovisnosti o vremenu u različitim fazama koagulacijskog procesa (Slika 5).



Slika 5. Kalibracijska krivulja TGA RC Low i iz nje dobiven „trombograf“ (slika preuzeta s postera Validation of the thrombin generation assay TECHNOTROMBIN® TGA, Kaufmann i sur. (2021.), Center for Biomolevular Medicine and Pharmacology, Medical University, Vienna, Austrija)

Test se može koristiti za praćenje zaobilazne terapije (*engl. inhibitor bypassing therapy*). Također, može se pratiti liječenje antikoagulansima i odrediti vrstu trombofilije.

3.2.4. Ceveron® TGA RB Kit (*engl.thrombin generation assay reagent B*)

Ceveron TGA RB kit (Tablica 2.) koristi se za određivanje stvaranja trombina u citratnoj plazmi na instrumentu Ceveron s100 serije koji radi fluorogene testove. Navedeni reagens služi kao „okidač“ koji je posebno prilagođen za otkrivanje vrlo osjetljivih promjena u aktiviranom unutarnjem putu zgrušavanja, nakon aktivacije vanjskog puta zgrušavanja te osigurava visoku osjetljivost na promjene FVII i FIX u niskom rasponu. Koagulacijska kaskada aktivirana je Ceveron TGA RB-om koji se sastoji od TF i negativno nabijenih fosfolipida koji služi kao svojevrsni okidač koagulacijske kaskade. Cijepanjem fluorogenog supstrata pomoću trombina oslobađa se fluorescencija koja se prati u vremenu. Iz promjene fluorescencije u ovisnosti o vremenu može se izračunati koncentracija trombina (nM) u uzorku pomoću odgovarajuće kalibracijske krivulje. Povećanje koncentracije trombina u vremenu omogućava izračun krivulje stvaranja trombina i izračun ostalih parametara stvaranja trombina.

Tablica 2. Sadržaj pakiranja testa Ceveron TGA RB (prilagođeno prema izvornim Uputstvima za uporabu proizvođača)

Reagens/sadržaj	Opis
Ceveron TGA RB	Liofilizirani pripravak reagensa koji sadrži nisku koncentracijou fosfolipidnih micela koje sadrže rhTF u puferu Tris-Hepes_NaCl
Ceveron TGA BUF	Liofilizirani pripravak pufera Tris-Hepes-NaCl
Ceveron TGA SZB	Liofilizirani pripravak fluorogenog supstrata koncentracije 1 mM Z-G-G-R-AMC
Ceveron TGA CON H	Liofilizirani pripravak humane plazme s velikom koncentracijom stvorenog trombina
Ceveron TGA CON L	Liofilizirani pripravak humane plazme sa niskom koncentracijom stvorenog trombina
Otopina kalcijeva klorida 25 mM	CaCl ₂ 25 mM, spreman za korištenje

*Osim reagensa navedenih u tablici 1, za provođenje ovog testa potrebni su neki dodatni materijali koji ne dolaze uz set.

3.2.5. Postupak izvedbe TGA na uređaju Ceveron®s100

Uzorci plazme koji su pohranjeni u ependorf epruvetama izvađeni su iz zamrzivača i stavljeni u vodenu kupelj 15 minuta na temperaturi od 37°C. Nakon odmrzavanja uzorci su homogenizirani laganim miješanjem. Prije samog rada na analizatoru potrebno je na njemu obaviti dnevno pranje. Za vrijeme odmrzavanja uzoraka otopljeni su potrebni reagensi i kontrolni uzorci. Sve komponente potrebne za izvođenje testa moraju se prethodno izvaditi iz hladnjaka i pohraniti 15 minuta prije izvođenja analize na sobnoj temperaturi. Tijekom pripreve liofiliziranih pripravaka potrebno je paziti na volumene te dobro otopiti sav materijal. Prilikom pripreve liofilizata u bočicu se dodaje definirani volumen destilirane vode, sadržaj se pomiješa i ostavi da odstoji 20 minuta. Prilikom miješanja reagensa, pufera ili uzorka, potrebno je izbjeći stvaranje pjene. Bočice se moraju dobro pomiješati kako bi njihov sadržaj bio u potpunosti homogeniziran. Samo miješanje izvodi se polaganim okretanjem bočice, a vorteksiranje se izbjegava zbog stvaranja mjehurića koje bi moglo ometati mjerenje fluorescencije. Prije uporabe reagensa bočice moraju biti ponovno dobro promiješane, bez vorteksiranja. Svaku bočicu reagensa, pufera i kontrolnog uzorka potrebno je očitati na čitaču crtičnog barkoda koji se nalazi na samom uređaju. Nakon stavljanja reagensa, pufera i supstrata na točno definirana

mjesta u analizatoru potrebna je provjera volumena samih otopina, a zatim se pokreće analizator i prvo se analiziraju kontrolni uzorci.

3.2.6. Izrada kalibracijske krivulje

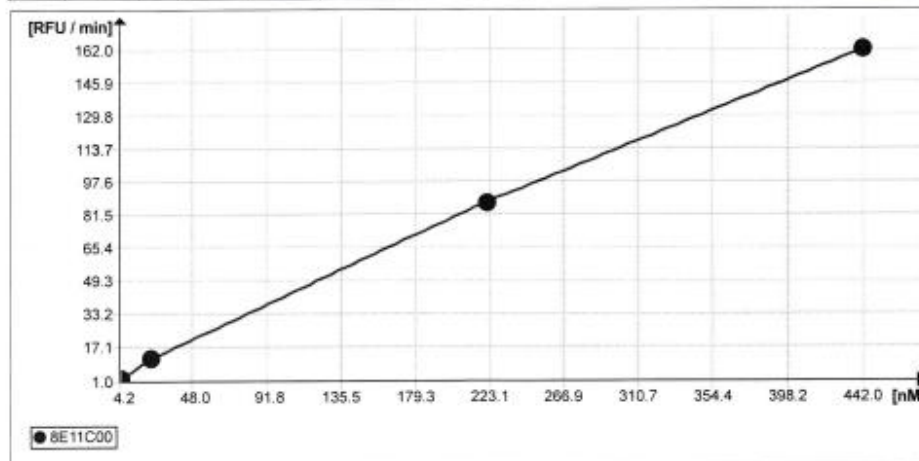
Prije ispitivanja uzoraka na uređaju potrebno je napraviti kalibracijsku krivulju. Kalibracijska krivulja je napravljena pomoću standarda poznate koncentracije, TGA CAL. Liofilizat TGA CAL otopljen je pomoću 0,5 mL destilirane vode i nježno promiješan. Napravljena otopina morala je odstajati najmanje 30 minuta prije korištenja za izradu kalibracijske krivulje. Kalibracijska krivulja predstavlja odnos analitičkog signala, u ovom slučaju relativne jedinice fluorescencije (RFU) i koncentracije standarda. Kalibracija se radi svaki puta prije korištenja nove serije reagensa. U programu za kalibraciju zadaju se vrijednosti koje je definirao proizvođač. Dobivena kalibracijska krivulja prikazana je na Slici 6. te se koristi prilikom mjerenja koncentracije analita u ispitivanim uzorcima.

**Klinicki Bolnicki Centar Zagreb
SN01001017**

User: Operator

Calibration		Reagent Lots	
Method:	TGA	Reagent	Lot#
Protocol:	TGA Calibration	TGA SUB	BE11C00
Test:	TGA Calibration	TGA CAL BUF	?
Unit:	nM	TGA BUF	9Q21C
Measurement:		CaCl2 25mM	9C12CB0
Validation:	3/24/2023 10:56	Diluent: TGA CAL BUF	
Scales X,Y	Point To Point	INR	
X: [x]	R ² : 1	ISL: - MINPT: -	

Pos	Calibrator	Lot	Concentration [nM]		Raw-Value [RFU / min]		Info	Comment
			Ref	Calc	Measured	Used		
	TGA CAL		442	442		161.4	(M)	
			221	221		87.4	(M)	
			22.1	22.1		11.6	(M)	
			4.42	4.42		1.9	(M)	



Slika 6. Grafički prikaz kalibracijske krivulje testa TGA RB

Nakon izrade kalibracijske krivulje, analizirani su kontrolni uzorci s definiranim vrijednostima dviju koncentracijskih razina, kontrole Control H i Control L kako bi se provjerila kalibracija i analitički sustav. Proizvođač je propisao definirane kriterije prihvatljivosti da vrijednosti pika trombina kontrole H budu u rasponu od 158 do 310 nM (ciljna vrijednost 234 nM), a vrijednosti pika trombina kontrole L od 65 do 135 nM (ciljna vrijednost 100 nM). Nakon analize kontrolnih uzoraka utvrđeno je da su dobivene vrijednosti oba kontrolna uzorka unutar

očekivanih raspona preporučenog od strane proizvođača (Tablica 3). Tijekom analiziranja uzoraka ispitanika, neposredno prije analiziranja serije uzoraka, naizmjenično su korišteni i analizirani kontrolni uzorci Control H ili Control L. S obzirom na količinu i ekonomsku dostupnost reagensa uzorci su analizirani u 5 nasumičnih radnih dana.

Tablica 3. Prikaz dobivenih vrijednosti mjerenih parametara za kontrole

KONTROLE	tLag/min	tPeak/min	Peak/nM	VI/(nM/min)	AUC/nM
TGA Control H/TGA RB, 24.3.2023.	6,7	14,2	223	29,6	2961,1
TGA Control L/TGA RB, 24.3.2023.	8,3	18,5	109	10,7	2430,6
TGA Control L/TGA RB, 27.3.2023.	8,8	22,8	97,8	7	2272
TGA Control H/TGA RB, 28.3.2023.	6,8	14,6	239,7	30,6	2937,3
TGA Control H/TGA RB, 08.5.2023.	6,5	14,4	219,6	28,1	2776,9
TGA Control L/TGA RB, 08.5.2023.	8,4	21,1	100,4	7,9	2386
TGA Control H/TGA RB, 10.5.2023.	6,5	16,1	191,2	19,9	2620,8
TGA Control H/TGA RB, 10.5.2023.	9	19,2	190,4	18,6	2691,1

Odmrznuti i homogenizirani uzorci pohranjeni su u ependorf epruветama, a za analizu na uređaju bilo je potrebno odrezati čep kako ne bi smetao prilikom same provedbe analize. Uzorci nisu barkodirani pa je proveden ručni unos uzoraka. Prilikom upisa uzoraka u rubriku pored upisanoga uzorka dodaje se test koji se koristi za analizu, u ovom slučaju to je TGA RB. Nakon analize uzorci su ponovno pohranjeni u zamrzivač na -80 °C.

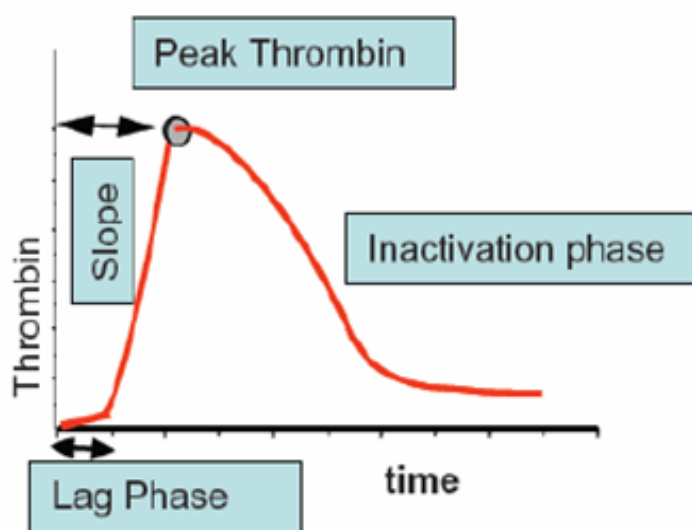
3.2.7. Tumačenje mjerenih parametara

Ceveron TGA RB rezultati izraženi su kao pik trombina (nM). Također moguć je prikaz rezultata lag faze, nagiba i AUC. Softver uređaja izračunava stvaranje trombina u uzorku tijekom vremena. Dobiveni rezultati izraženi su u nM stvorenog trombina u uzorku za svaku točku u vremenu tijekom cijelog koagulacijskog procesa. Iz dobivenog grafičkog prikaza mogu se očitati sljedeći parametri: lag faza, pik trombina i AUC. Lag faza počinje dodatkom TGA reagensa i CaCl₂ te opisuje vrijeme od dodatka reagensa do početka stvaranja trombina. Rezultat se izražava u minutama, a gledajući standardne koagulacijske testove tLag je mjerna veličina koja odgovara vremenu zgrušavanja. Stvaranje trombina se povećava iz minute u minutu dok ne dosegne maksimalnu vrijednost, nakon čega slijedi postepeni pad koncentracije trombina. tPeak je vrijeme potrebno da dođe do formacije najveće količine trombina, a mjeri se u minutama. Peak je parametar koji prikazuje najveću koncentraciju stvorenog trombina, a veličina je izražena u nanomolarnoj koncentraciji trombina (Depasse i sur., 2021). Nagib krivulje za vrijeme amplifikacijske faze je izračunat uz pomoć softvera i izražen je kao VI (*engl. Velocity Indeks*), odnosno indeks brzine koji se računa prema formuli:

$$\text{Indeks brzine} = \frac{\text{pik trombina}}{(\text{vrijeme stvaranja pika-lag faza})}$$

AUC predstavlja površinu ispod krivulje, a ona korelira s endogenim trombinskim potencijalom te služi za procjenu ukupne količine stvorenog trombina (Depasse i sur., 2021; Valke i sur., 2022).

U ovom istraživanju mjereni su sljedeći parametri: tLag, tPeak, Peak Thrombin, VI i AUC.



Slika 7. Grafički prikaz stvaranja trombina u ovisnosti o vremenu (slika preuzeta s postera TECHNOTHROMBIN TGA a novel Thrombin Generation Assay suitable for the new routine coagulation analyzer Ceveron® alpha, Kaufmann i sur. (2021.), Center for Biomolevular Medicine and Pharmacology, Medical University, Vienna, Austrija)

Referentni raspon određen je od strane proizvođača analizom uzoraka plazmi 100 zdravih dobrovoljaca. Normalni raspon Ceveron TGA RB seta za pik trombina je: 43-368 nM. Za AUC normalan raspon Ceveron TGA RB seta je: 1236-2945 nM. Preporučuje se da svaki laboratorij izradi svoj referentni interval.

3.2.8. Statistička obrada podataka

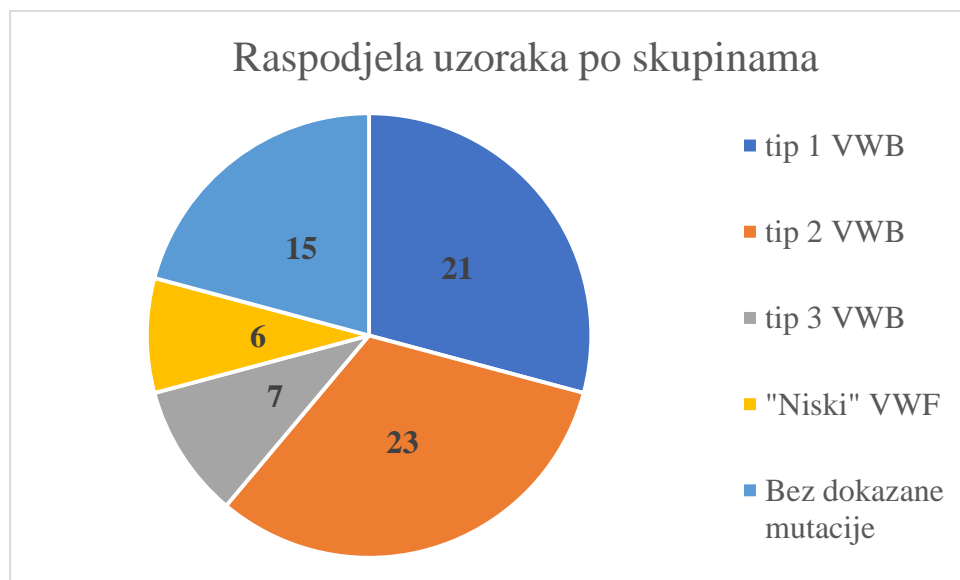
Za statističku obradu podataka korišten je statistički program MedCalc, verzija 20.305 (MedCalc, Ostend, Belgija). Razlika kvantitativnih podataka između skupina ispitana je Kruskal-Wallisovim testom za nezavisne uzorke. $P < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Dunnov post-hoc test korišten je za usporedbu podskupina. Analizirani rezultati prikazani su kao medijani s pripadajućim interkvartilnim rasponima.

Korelacija između analiziranih parametara i aktivnosti VWF, koncentracije antigena VWF, APTV-a i aktivnosti FVIII ispitana je računanjem Spearmanove korelacije ranga. Statistička značajnost koeficijenta korelacije iskazuje se pomoću P-vrijednosti. Ako je vrijednost P manja od 0,05 značajan je odnos između 2 varijable i navedeni odnos može se tumačiti. Vrijednost $P < 0,05$ smatra se značajnom za sve statističke analize.

4.REZULTATI

4.1.Raspodjela ispitanika s VWB

Analizirani su uzorci 72 ispitanika s kliničkom sumnjom na VWB koji su podijeljeni u 5 osnovnih skupina: tip 1 VWB, tip 2 VWB, tip 3 VWB, „niski VWF“ i bez dokazane mutacije, te je navedena raspodjela ispitanika prikazana na slici 8.



Slika 8: Raspodjela uzoraka po skupinama

Analiziran je 21 uzorak ispitanika koji imaju tip1 VWB, tip 2VWB imalo je 23 ispitanika, dok je 7 ispitanika imalo tip 3 VWB. Iz skupine s „niskim VWF“ analizirano je 6 uzoraka, a bez mutacije njih 15. „Niski VWF“ je skupina ispitanika u kojoj nisu utvrđene mutacije u genu za VWF, ali imaju sniženi VWF. Bez mutacija su ispitanici koji nemaju mutaciju i/ili sniženu aktivnost VWF.

4.2. Rezultati mjerenja bolesnika s VWB tipa 1

U tablici 4. prikazani su rezultati mjerenja parametara tLag, tPeak, Peak, VI i AUC za bolesnike s VWB tipa 1.

Tablica 4. Prikaz rezultata mjerenja za tip 1 VWB

ispitanik	tLag/min	tPeak/min	Peak/nM	VI/(nM/min)	AUC/nM	Skupina
1	9,8	16,1	198,1	31,3	2539,8	tip 1 VWB
2	5,5	10,3	262,1	54,5	2655,1	tip 1 VWB
3	11	20,4	200,8	21,5	2588,5	tip 1 VWB
4	7,5	13	287,1	52,1	2726,8	tip 1 VWB
5	8,7	17,1	240,3	28,5	2398,3	tip 1 VWB
6	7,4	13,5	201	32,9	2523,3	tip 1 VWB
7	8,9	17,1	184,5	22,4	2475,8	tip 1 VWB
8	8,5	15,6	297,1	41,7	2756,7	tip 1 VWB
9	7,6	13,7	198,1	32,3	2867	tip 1 VWB
10	6	12,5	286,7	43,9	3085,1	tip 1 VWB
11	12,3	21,3	170,4	18,9	2252,1	tip 1 VWB
12	9,1	16,7	224,8	29,9	2540,5	tip 1 VWB
13	8,5	16,5	288,4	35,9	3237,8	tip 1 VWB
14	12,9	21,8	185	20,7	2664,8	tip 1 VWB
15	7,4	13,3	225,9	38,1	2736,4	tip 1 VWB
16	5,8	11,1	269,6	50,7	2815,2	tip 1 VWB
17	7,9	14,6	293,8	43,7	3136,2	tip 1 VWB
18	6,9	13	266,3	43,5	2196,5	tip 1 VWB
19	10,6	19,8	213,2	23,3	2891,3	tip 1 VWB
20	5,3	9,7	421,9	95,5	3416,7	tip 1 VWB
21	9,7	18,6	172,4	19,3	2525,4	tip 1 VWB

4.3. Rezultati mjerenja u bolesnika s VWB tipa 2

U tablici 5. prikazani su rezultati mjerenja parametara tLag, tPeak, Peak, VI i AUC za bolesnike s VWB tipa 2.

Tablica 5. Prikaz rezultata mjerenja za tip 2 VWB

ispitanik	tLag/min	tPeak/min	Peak/nM	VI/(nM/min)	AUC/nM	Skupina
1	9,6	18,3	193,8	22,2	2737,2	tip 2A VWB
2	9,7	18,8	195,9	21,4	2691,3	tip 2A VWB
3	6,5	12	283,1	51,3	2489,2	tip 2A VWB
4	5,1	9,7	443,9	96,1	3854,3	tip 2A VWB
5	8	14,3	386,5	61,2	3292,9	tip 2A VWB
6	7,9	15	281,7	39,5	3132,6	tip 2A VWB
7	8,7	14,8	233,3	38,7	2534,6	tip 2A VWB
8	7,6	13,6	304,2	50,6	2865,7	tip 2A VWB
9	9,7	18,5	221,6	25,4	2760,6	tip 2A VWB
10	8,9	17,1	229,3	27,9	2587,6	tip 2A VWB
11	9	18,4	199,3	21,2	2693,6	tip 2A VWB
12	7,4	14,1	126,8	18,9	1416,4	tip 2A VWB
13	5,6	12,6	234,9	33,5	2466,7	tip 2A VWB
14	10,8	17,8	177,3	25,3	2448	tip 2A VWB
15	7,6	14,1	284,4	43,6	2863,2	tip 2B VWB
16	7,6	13,9	236,3	37,4	2680,5	tip 2B VWB
17	6,9	13,3	246,5	38,4	2532,3	tip 2B VWB
18	5,6	10,2	402,5	87,2	3027,9	tip 2B VWB
19	10,4	18,2	171,7	21,9	2364,9	tip 2B VWB
20	7,3	15,5	284,7	35	3033,5	tip 2B Malmo/New York VWB
21	5,9	12,9	358,4	51	3386,2	tip 2B Malmo/New York VWB
22	8,7	15,6	239,3	35,1	2577,9	tip 2N VWB
23	13,7	22,4	148,9	17,2	2194,3	tip 2 VWB

4.4. Rezultati mjerenja u bolesnika s VWB tipa 3

U tablici 6. prikazani su rezultati mjerenja parametara tLag, tPeak, Peak, VI i AUC za bolesnike s VWB tipa 3.

Tablica 6. Prikaz rezultata mjerenja za tip 3 VWB

ispitanik	tLag/min	tPeak/min	Peak/nM	VI/(nM/min)	AUC/nM	Skupina
1	8,5	20,4	181,3	15,2	2464,1	tip 3 VWB
2	14,6	25,4	161,1	15	2316,2	tip 3 VWB
3	12,4	24,4	108,2	9,1	1970,6	tip 3 VWB
4	12,8	23,2	178,2	17,1	2680,5	tip 3 VWB
5	15	29,1	107,5	7,6	1758	tip 3 VWB
6	11,7	20,7	248,2	27,5	2720,7	tip 3 VWB
7	9,2	16,4	303,3	42	2832,7	tip 3 VWB

4.5. Rezultati mjerenja u bolesnika s niskim VWF

U tablici 7. prikazani su rezultati mjerenja parametara tLag, tPeak, Peak, VI i AUC za bolesnike s niskim VWB.

Tablica 7. Prikaz rezultata mjerenja dobivenih za skupinu „Niski VWF“

ispitanik	tLag/min	tPeak/min	Peak/nM	VI/(nM/min)	AUC/nM	Skupina
1	15,8	30,8	168,4	11,2	2636,2	"Niski VWF"
2	7,3	12,7	320,6	59,2	2814,5	"Niski VWF"
3	6,9	12,8	327	55,3	2785,8	"Niski VWF"
4	16,1	28,7	170,3	13,6	2720,3	"Niski VWF"
5	9,2	18,5	219,2	23,5	2677,4	"Niski VWF"
6	12,7	24,9	128,4	10,6	2050,3	"Niski VWF"

4.6. Rezultati mjerenja u bolesnika bez mutacije

U tablici 8. prikazani su rezultati mjerenja parametara tLag, tPeak, Peak, VI i AUC za bolesnike bez mutacija.

Tablica 8. Prikaz rezultata mjerenja ispitanika bez mutacija

ispitanik	tLag/min	tPeak/min	Peak/nM	VI/(nM/min)	AUC/nM	Skupina
1	7,9	15,8	241,9	30,9	2739,1	bez mutacije
2	7,3	14,3	186,3	26,5	2432,5	bez mutacije
3	10,5	18,3	161,7	20,7	2305,1	bez mutacije
4	8,3	15	239,8	35,7	2748,9	bez mutacije
5	10,1	21	149,1	13,7	2426,6	bez mutacije
6	11,3	21,5	114,2	11,3	1982	bez mutacije
7	10,5	21,9	176,4	15,4	2772,4	bez mutacije
8	16,9	28,5	143,1	12,4	2014,7	bez mutacije
9	7,6	14,1	257,5	39,5	2400	bez mutacije
10	7,3	13,1	232,2	39,9	2556	bez mutacije
11	10,9	19,8	167,1	18,7	2290,3	bez mutacije
12	8,6	15,1	223,6	34,8	2493,5	bez mutacije
13	10,4	17,7	152,6	21,1	2421,6	bez mutacije
14	11,7	24,4	132,3	10,4	2207,1	bez mutacije
15	10,9	19,9	206,2	23,1	2608,8	bez mutacije

4.7. Usporedba rezultata mjerenja između pojedinih tipova VWB

U Tablici 9 prikazani su medijani (interkvartilni raspon) za mjerene parametre u ispitivanim skupinama.

Tablica 9: Rezultati mjerenja u bolesnika s različitim tipovima VWB

Pretraga	Tip 1 VWB (N=21)	Tip 2 VWB (N=23)	Tip 3 VWB (N=7)	„Niski VWF“ (N=6)	Bez mutacije (N=15)	P- vrijednost
tLag (min)	8,5 (7,3-9,7)	7,9 (7,0-9,5)	12,4 (9,8-14,2)	11,0 (7,3-15,8)	10,4 (8,0-10,9)	0,006
tPeak (min)	15,6 (13,0-17,5)	14,8 (13,4-18,1)	23,2 (20,5-25,2)	21,7 (12,8-28,7)	18,3 (15,0-21,4)	0,002
Peak (nM)	225,9 (198,1- 286,8)	236,3 (196,8- 284,6)	178,2 (121,4- 231,5)	194,8 (168,4- 320,6)	176,4 (150,0- 230,1)	0,016
VI (nM/min)	32,9 (23,1- 43,8)	35,1 (23,0- 48,9)	15,2 (10,6- 24,9)	18,6 (11,2- 55,3)	21,1 (14,1- 33,8)	0,004
AUC (nM)	2664,8 (2524,9- 2873,1)	2691,3 (2500,0- 2987,4)	2464,1 (2057,0- 2710,7)	2698,9 (2636,2- 2785,8)	2426,6 (2294,0- 2595,6)	0,037

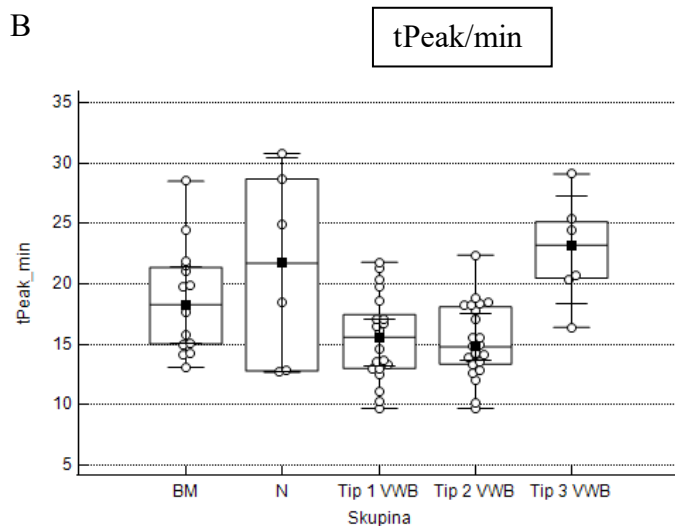
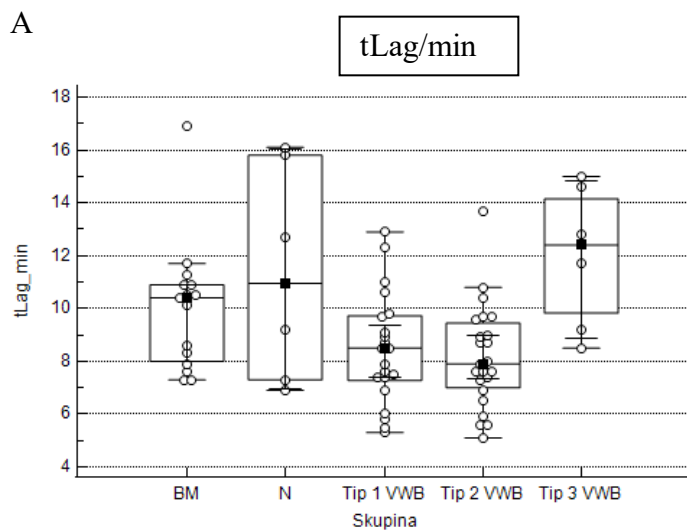
Rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon); testiranje provedeno Kruskal-Wallisovim testom.

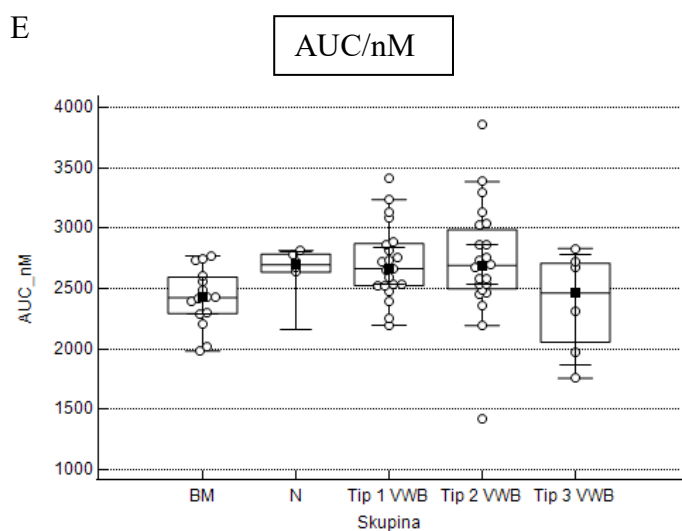
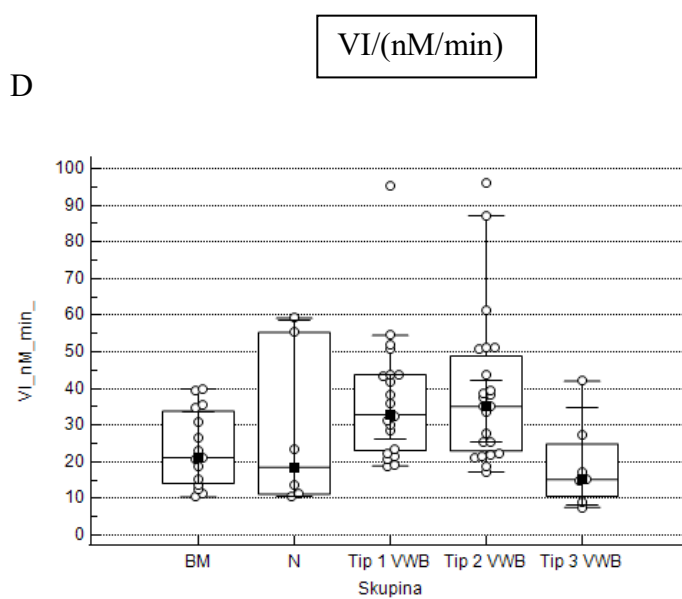
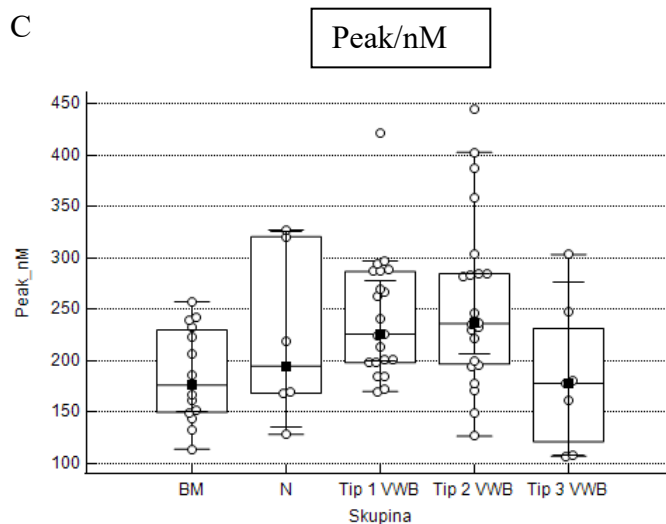
Tablica 10. Prikaz rezultata dobivenih uporabom Dunnove post-hoc analize za međusobnu usporedbu između skupina, za ispitivane testove za koje je utvrđena statistički značajna razlika

Skupina	tLag/min	tPeak/min	Peak/nM	VI(nM/min)	AUC/nM
Tip 1 VWB (1)	3	3	/	/	/
Tip 2 VWB (2)	3	3	BM	3	/
Tip 3 VWB (3)	1, 2	1, 2	/	2	/
„Niski VWF“ (N)	/	/	/	/	/
Bez mutacija (BM)	/	/	2	/	/

tLag značajno se razlikuje između ispitivanih skupina (P=0,006). Dunnovim post-hoc testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između tipa 3 VWB te tipa 1 i 2 VWB za izmjereni parametar. tPeak značajno se razlikuje između ispitivanih skupina (P=0,002).

Dunnovim post-hoc testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika tipa 3 VWB te tipa 1 i 2 VWB za izmjereni parametar. Peak se značajno razlikuje između ispitivanih skupina ($P=0,016$). Dunnovim post-hoc testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između skupine bez mutacije i tipa 2VWB za izmjereni parametar. VI se značajno razlikuje između ispitivanih skupina ($P=0,004$). Dunnovim post-hoc testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između tipa 2 i tipa 3 VWB za izmjereni parametar. AUC se značajno razlikuje između ispitivanih skupina ($P=0,037$). Post-hoc testom nije utvrđeno da postoji statistički značajna razlika između pojedinih ispitivanih skupina za izmjereni parametar.





Slika 9. Grafički prikaz usporedbe skupina ispitanika u odnosu na mjerene parametre: (A) tLag/min; (B) tPeak/min; (C) Peak/nM; (D) VI/(nM/min); (E) AUC/nM

4.8.Usporedba rezultata mjerenja ispitanika s VWB unutar istih obitelji

Neki od ispitanika su u krvnome srodstvu. U Tablici 11. vidljivo je kako su svi ispitanici heterozigoti. Također svi ispitanici unutar iste obitelji imaju istu vrstu mutacije. Genetska i aminokiselinska (AK) promjena također su jednake unutar pojedine obitelji. Napravljena je zasebna tablica i statistička analiza rezultata takvih ispitanika (Tablica 12.).

Tablica 11. Prikaz rezultata mjerenja ispitnika s mutacijom koji su u krvnom srodstvu

Obitelj	Vrsta mutacije	Kromosom	Genska promjena	AK promjena	Egzon/intron	Homozigot/heterozigot	tLag/min	tPeak/min	Peak/nM	VI/(nM/min)	AUC/nM	TIP VWB
Obitelj 1	Missense	12	c.3829G>T	p.(Asp1277Tyr)	Egzon 28	Heterozigot	9	18,4	199,3	21,2	2693,6	2A
Obitelj 1	Missense	12	c.3829G>T	p.(Asp1277Tyr)	Egzon 28	Heterozigot	8,9	17,1	229,3	27,9	2587,6	2A
Obitelj 1	Missense	12	c.3829G>T	p.(Asp1277Tyr)	Egzon 28	Heterozigot	7,4	14,1	126,8	18,9	1416,4	2A
Obitelj 1	Missense	12	c.3829G>T	p.(Asp1277Tyr)	Egzon 28	Heterozigot	9,7	18,5	221,6	25,4	2760,6	2A
Obitelj 1	Missense	12	c.3829G>T	p.(Asp1277Tyr)	Egzon 28	Heterozigot	5,6	12,6	234,9	33,5	2466,7	2A
Obitelj 2	Missense	12	c.4517C>T	p.(Ser1506Leu)	Egzon 28	Heterozigot	9,6	18,3	193,8	22,2	2737,2	2A
Obitelj 2	Missense	12	c.4517C>T	p.(Ser1506Leu)	Egzon 28	Heterozigot	9,7	18,8	195,9	21,4	2691,3	2A
Obitelj 3	Missense	12	c.3946G>A	p.(Val1316Met)	Egzon 28	Heterozigot	5,6	10,2	402,5	87,2	3027,9	2B
Obitelj 3	Missense	12	c.3946G>A	p.(Val1316Met)	Egzon 28	Heterozigot	6,9	13,3	246,5	38,4	2532,3	2B
Obitelj 3	Missense	12	c.3946G>A	p.(Val1316Met)	Egzon 28	Heterozigot	7,6	13,9	236,3	37,4	2680,5	2B
Obitelj 3	Missense	12	c.3946G>A	p.(Val1316Met)	Egzon 28	Heterozigot	7,6	14,1	284,4	43,6	2863,2	2B
Obitelj 4	Missense	12	c.1496A>C	p.(Gln499Pro)	Egzon 13	Heterozigot	7,6	13,7	198,1	32,3	2867	1
Obitelj 4	Missense	12	c.1496A>C	p.(Gln499Pro)	Egzon 13	Heterozigot	5,8	11,1	269,6	50,7	2815,2	1
Obitelj 5	Stop gained	12	c.6151A>T	p.(Arg2051Ter)	Exon 36/52	Heterozigot	/	/	/	/	/	/
	Stop gained	12	c.319C>T	p.(Glu107Ter)	Exon 4/52	Heterozigot	8,5	20,4	181,3	15,2	2464,1	3
Obitelj 5	Stop gained	12	c.6151A>T	p.(Arg2051Ter)	Exon 36/52	Heterozigot	14,6	25,4	161,1	15	2316,2	3
	Stop gained	12	c.319C>T	p.(Glu107Ter)	Exon 4/52	Heterozigot	/	/	/	/	/	/
Obitelj 6	Missense	12	c.3797C>T	p.(Pro1266Leu)	Egzon 28	Heterozigot	7,3	15,5	284,7	35	3033,5	2B Malmo/New York
Obitelj 6	Missense	12	c.3797C>T	p.(Pro1266Leu)	Egzon 28	Heterozigot	5,9	12,9	358,4	51	3386,2	2B Malmo/New York
Obitelj 7	Missense	12	c.4645G>A	p.(Glu1549Lys)	Egzon 28	Heterozigot	8,7	14,8	233,3	38,7	2534,6	2A
Obitelj 7	Missense	12	c.4645G>A	p.(Glu1549Lys)	Egzon 28	Heterozigot	7,9	15	281,7	39,5	3132,6	2A
Obitelj 8	Stop gained	12	c.6504C>A	p.(Cys2168Ter)	Exon 37/52	Heterozigot	7,5	13	287,1	52,1	2726,8	1
Obitelj 8	Stop gained	12	c.6504C>A	p.(Cys2168Ter)	Exon 37/52	Heterozigot	6	12,5	286,7	43,9	3085,1	1

U skupini Obitelj 5 ispitanici imaju istu vrstu mutacije, ali dvije vrste genskih promjena koje su također jednake u oba ispitanika.

Tablica 12. Usporedba utjecaja krvnog srodstva na mjerene parametre

Pretraga	Obitelj 1	Obitelj 2	Obitelj 3	Obitelj 4	Obitelj 5	Obitelj 6	Obitelj 7	Obitelj 8	P- vrijednost
tLag (min)	8,9 (7,0-9,2)	9,7 (9,6-9,7)	7,3 (6,3-7,6)	6,7 (5,8-7,6)	14,6 (14,6-14,6)	6,6 (5,9-7,3)	8,3 (7,9-8,7)	6,8 (6,0-7,5)	0,171
tPeak (min)	17,1 (13,7-18,4)	18,6 (18,3-18,8)	13,6 (11,8-14,0)	12,4 (11,1-13,7)	25,4 (25,4-25,4)	14,2 (12,9-15,5)	14,9 (14,8-15,0)	12,8 (12,5-13,0)	0,108
Peak (nM)	221,6 (181,2- 230,7)	194,9 (193,8- 195,9)	265,5 (241,4- 343,5)	233,9 (198,1- 269,6)	161,1 (161,1- 161,1)	321,6 (284,7- 358,4)	257,5 (233,3- 281,7)	286,9 (286,7- 287,1)	0,038
VI (nM/min)	25,4 (20,6- 29,3)	21,8 (21,4- 22,2)	41,0 (37,9- 65,4)	41,5 (32,3- 50,7)	15,0 (15,0- 15,0)	43,0 (35,0- 51,0)	39,1 (38,7- 39,5)	48,0 (43,9- 52,1)	0,044
AUC (nM)	2587,6 (2204,1- 2710,4)	2714,3 (2691,3- 2737,2)	2771,9 (2691,3- 2945,6)	2841,1 (2815,2- 2867,0)	2316,2 (2316,2- 2316,2)	3209,9 (3033,5- 3386,2)	2833,6 (2534,6- 3132,6)	2905,95 (2726,8- 3085,1)	0,191

Rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon); testiranje provedeno Kruskal-Wallisovim testom.

Na temelju provedene statističke analize vidljivo je kako za neke mjerene vrijednosti postoji statistički značajna razlika. Utvrđena je statistički značajna razlika između ispitivanih skupina za parametre Peak (P=0,038) i VI (P=0,044). Za razliku od toga nije utvrđena statistički značajna razlika za parametre tLag (P=0,171), tPeak (P=0,108) i AUC (P=0,191).

4.9. Ispitivanje korelacije izmjerenih parametara s VWF:Ag, VWF:GPIbM, APTV-om i aktivnosti FVIII

Ispitivana je korelacija (Tablica 13.) između varijabli osoba koje imaju tip 1, tip 2 ili tip 3 VWB izmjerenih na analizatoru Ceveron®s100 i varijabli prethodno izmjerenih na Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju u KBC-u Zagreb. Ukupan broj ispitanika bio je 51. Uspoređene su VWF:Ag, VWF:GPIbM, APTV i aktivnosti FVIII s tLag, tPeak, Peak, VI i AUC.

Tablica 13. Korelacija tLag, tPeak, Peak, VI i AUC s aktivnostima FVIII, koncentracijom antigena VWF, aktivnosti VWF i APTV-a.

Pretraga	tLag/min	tPeak/min	Peak/nM	VI/(nM/min)	AUC/nM
VWF:Ag (%)	ρ : -0,384 P: 0,005	ρ : -0,416 P: 0,002	ρ : 0,376 P: 0,007	ρ : 0,437 P: 0,001	ρ : 0,356 P: 0,010
VWF:GPIbM (%)	ρ : -0,374 P: 0,007	ρ : -0,389 P: 0,005	ρ : 0,295 P: 0,036	ρ : 0,353 P: 0,011	ρ : 0,267 P: 0,058
APTV (s)	ρ : 0,463 P: <0,001	ρ : 0,542 P: <0,001	ρ : -0,358 P: 0,010	ρ : -0,509 P: <0,001	ρ : -0,325 P: 0,020
FVIII (kIU/L)	ρ : -0,455 P: <0,001	ρ : -0,516 P: <0,001	ρ : 0,341 P: 0,014	ρ : 0,477 P: <0,001	ρ : 0,330 P: 0,018

Rezultati su prikazani kao Spearmanov koeficijent korelacije (ρ) uz pripadajuću P vrijednost.

Sve dobivene vrijednosti P bile su manje od 0,05, osim za povezanost VWF:GPIbM s AUC-om (P=0,058), što ukazuje na postojanje slabe ili umjereno do dobre povezanosti svih ispitivanih varijabli s APTV, FVIII, VWF:Ag i VWF:GPIbM.

5.RASPRAVA

Von Willebrandova bolest je najčešći nasljedni poremećaj zgrušavanja krvi. Nasljeđuje se autosomno dominantno, osim tipa 3 koji se nasljeđuje autosomno recesivno, a oblik bolesti ovisi o tipu mutacije na genu za VWF. Dijagnostika i podklasifikacija VWB još uvijek predstavljaju klinički izazov. Stoga je u ovom radu ispitana učinkovitost testa stvaranja trombina TGA RB u bolesnika s VWB. Pri tome su izmjereni i analizirani parametri tLag, tPeak, Peak, VI i AUC te je ispitano postoje li razlike između tipova VWB na temelju izmjerenih parametara. Dobiveni rezultati korišteni su i dodatno za ispitivanje postojanja razlike ispitivanih parametara ovisno o obiteljskoj dijagnozi. Također, ispitana je korelacija između analiziranih parametara i testova koji se inače koriste u samoj dijagnostici VWB (VWF:Ag, VWF:GPIbM, APTV i aktivnosti FVIII).

5.1.Tumačenje analiziranih rezultata testa TGA

Usporedbom izmjerenih parametara za sve skupine ispitanika koje su uključivale tipove 1, 2 i 3 VWB, "niski" VWF i bolesnike bez mutacije u genu za VWF dobivena je statistički značajna razlika za sve ispitivane parametre (tLag, tPeak, Peak, VI i AUC) između skupina ispitanika. Rugeri i suradnici su u svome radu utvrdili patološke rezultate za tLag, tPeak, Peak i VI u plazmi siromašnoj i plazmi bogatoj trombocitima u bolesnika s VWB. Također su primijetili kako je stvaranje trombina značajno smanjeno i odgođeno u pacijenata s VWB u odnosu na zdrave ispitanike (Rugeri i sur., 2007). U ovom diplomskom radu Dunnovim post-hoc testom dokazana je statistički značajna razlika između tLag i tPeak za ispitanike s tipom 3 VWB u odnosu na ispitanike s tipom 1 i tipom 2 VWB. Nadalje, Dunnovim post-hoc testom utvrđena je statistički značajna razlika između pika trombina ispitanika bez mutacije i ispitanika s tipom 2 VWB te statistički značajna razlika između vrijednosti VI bolesnika s tipom 2 i tipom 3 VWB. Statistički značajna razlika nije utvrđena između pika trombina i VI u pacijenata s tipom 1 i tipom 2 VWB, što je podudarno rezultatima istraživanja Rugeria i suradnika. Na temelju analize dobivenih rezultata može se pretpostaviti kako je brzina stvaranja trombina ovisna o tome boluje li ispitivana osoba od VWB ili je zdrava, a također da i sam tip VWB utječe na brzinu stvaranja trombina.

Dodatnom analizom ispitivanih parametara TGA s obzirom na krvno srodstvo ispitanika promatran je utjecaj krvnog srodstva na izmjerene parametre. Ukupno je u istraživanje bio uključen 21 ispitanik koji su bili članovi 8 različitih obitelji, a analizirani su samo rezultati članova obitelji koji imaju neki od tipova VWB. Obitelj 1 sastoji se od 5 članova i svi su tip 2A VWB, obitelj 2 i 7 su također tip 2A VWB te su u svakoj obitelji 2 oboljela člana. Obitelj

3 ima 4 člana koja boluju od 2B tipa VWB, a obitelj 6 ima 2 člana koja boluju od 2B Malmo/New York tipa VWB. Od tipa 1 VWB boluju po 2 člana iz obitelji 8 i po 2 člana iz obitelji 4. Obitelj 5 broji dvoje članova koji boluju od tipa 3 VWB. Od ispitivanih parametara statistički značajne razlike dobivene su za Peak ($P=0,038$) i VI ($P=0,044$). Dobiveni rezultati ukazuju kako krvno srodstvo utječe na jačinu pika i indeks brzine, odnosno nagib krivulje.

Ispitivanjem ovisnosti VWF:Ag, aktivnost VWF, APTV-a i aktivnosti FVIII s parametrima TGA izmjerenim na Ceveron®s100, dobivena je slabe ili umjereno do dobre povezanosti za sve izmjerene parametre ($P<0,05$) uz izuzetak za AUC i VWF:GPIbM ($P= 0,058$). Dobiveni rezultati ukazuju na korelaciju izmjerenih parametara s navedenim koagulacijskim testovima. Utvrđena je slaba pozitivna korelacija između tLag i APTV ($\rho= 0,463$, $P<0,001$) i slaba negativna povezanost između tLag i FVIII ($\rho= -0,455$, $P<0,001$). Umjerena do dobra pozitivna korelacija je utvrđena između tPeak i APTV ($\rho= 0,542$, $P<0,001$), a negativna između tPeak i FVIII ($\rho= -0,516$, $P<0,001$). Između VI i FVIII je utvrđena slaba pozitivna korelacija ($\rho= 0,477$, $P<0,001$), a umjereno do dobra negativna korelacija je utvrđena između VI i APTV ($\rho= -0,509$, $P<0,001$). Uspoređivane varijable su povezane zato što je VWF plazmatski nosač FVIII, a FVIII se aktivira djelovanjem trombina. Rugeri i suradnici u svome istraživanju proučavali su ulogu VWF i FVIII u stvaranju trombina te su istraživali imaju li navedeni koagulacijski faktori sličan učinak na količinu stvorenog trombina. U radu nije jasno utvrđen odnos između razine VWF/FVIII i krvarenja, ali rezultati istraživanja upućuju da TGA u kombinaciji s rutinskim mjerenjem VWF i FVIII može biti od interesa za procjenu rizika od krvarenja pojedinca s VWB (Rugeri i sur., 2007). Pretpostavka je kako će, u slučaju snižene aktivnosti FVIII, očekivano biti i smanjeno stvaranje trombina. S obzirom kako je APTV produljen zbog manjka FVIII, pa utjecaj FVIII na APTV rezultira korelacijom između APTV-a i izmjerenih parametara, odnosno smanjena aktivnost FVIII rezultira produljenjem APTV-a i posljedično smanjenim stvaranjem trombina. Koncentracija antigena VWF također je u korelaciji s ispitivanim parametrima. Manja koncentracija VWF:Ag rezultira i smanjenom aktivnosti FVIII pa je slično povezanosti aktivnosti FVIII i koncentracija VWF:Ag pokazala korelaciju sa svim ispitivanim parametrima. Rugeri i suradnici u svom radu ističu kako niske vrijednosti pika trombina, čak pri normalnim vrijednostima AUC, mogu biti povezani s kliničkim krvarenjima. Također, rezultati njihovih istraživanja sugeriraju da smanjeno i odgođeno stvaranje trombina u bolesnika s VWB, koje je prije svega posljedica snižene aktivnosti FVIII u takvih ispitanika (Rugeri i sur., 2007). U ovom je radu utvrđeno kako od ispitivanih parametara stvaranja trombina jedino AUC nema posebnu dijagnostičku značajnost u odnosu na ostale ispitivane parametre (tLag, tPeak, Peak i VI).

Analiza ispitivanih parametara je ukazala na važnost vremena koje je potrebno do stvaranja pika trombina, kao i samu veličinu pika koji pokazuju koliko je potrebno do početka stvaranja trombina te koja je najveća koncentracija stvorenog trombina. Smanjena aktivnost VWF rezultira sporijim stvaranjem ugruška, produljenim vremenom krvarenja te smanjenim međudjelovanjem VWF s trombocitima. Iz navedenog razloga važno je pratiti tLag, tPeak i Peak u odnosu na preostala dva parametra testa TGA RB. Rugeri i suradnici su korištenjem neparametrijskog Spearmanovog korelacijskog testa utvrdili statistički značajnu korelaciju između VWF:RCo i aktivnosti FVIII ($\rho = 0,572$; $P < 0,0001$) u plazmi. Također su utvrdili korelaciju između VWF:RCo i pika trombina ($\rho = 0,33$; $P = 0,015$) te VWF:RCo i VI ($\rho = 0,41$; $P = 0,0024$) u plazmi siromašnoj i plazmi bogatoj trombocitima u bolesnika s VWB (Peak $P = 0,05$ i nagib $P = 0,036$). Potvrdili su značajnu korelaciju između aktivnosti FVIII i pika trombina i VI ($\rho = 0,55$; $P < 0,0001$). Rezultati njihovog istraživanja pokazali su kako ispitanici s VWB koji imaju nizak pik trombina imaju povećan rizik od kliničkog krvarenja. Međutim, kako test stvaranja trombina obuhvaća samo dio funkcije VWF, za potpunu procjenu rizika od krvarenja potrebno je napraviti dodatna ispitivanja uloge VWF u adheziji i agregaciji trombocita (Rugeri i sur., 2007).

Provedena analiza stvaranja trombina testom TGA RB pokazala je kako se brzina stvaranja trombina statistički značajno razlikuje ovisno o tome boluje li ispitivana osoba od VWB ili je zdrava, a također kako i sam tip VWB utječe na brzinu stvaranja trombina. Pomoću testa TGA RB vidljiva je razlika u jačini pika trombina i indeksu brzine, odnosno nagibu pravca između različitih obitelji. Peak i VI su parametri koji se razlikuju ovisno o krvnom srodstvu. Aktivnost FVIII, VWF:Ag, APTV i VWF:GPIbM su rutinski testovi koji se koriste pri dijagnostici VWB. TGA pokazuje dobru korelaciju s parametrima koji se koriste u rutinskoj dijagnostici VWB, što znači da bi se i sam TGA mogao koristiti za probir bolesnika s VWB.

6.ZAKLJUČCI

1. Uporabom automatiziranog komercijalno dostupnog testa stvaranja trombina TGA RB na analizatoru Ceveron®s100 određeno je i analizirano pet parametara stvaranja trombina (tLag, tPeak, Peak, VI i AUC) u uzorcima plazmi 72 ispitanika s različitim tipovima VWB.
2. Potvrđena je hipoteza o postojanju razlike svih ispitivanih parametara stvaranja trombina (tLag, tPeak, Peak, VI i AUC) ovisno o tipu VWB. U bolesnika sa smanjenim aktivnostima i koncentracijama VWF potrebno je dulje vrijeme za stvaranje trombina, a pri tome se stvara manja koncentracija trombina.
3. Tipove VWB razlikujemo prema aktivnosti i koncentraciji VWF, pa je moguće pomoću testa TGA RB utvrditi tip VWB.
4. Obiteljske veze imaju utjecaj na stvaranje trombina. Analizom izmjerenih parametara, utvrđena je statistički značajna razlika pika trombina i VI između različitih obitelji. Odnosno, ovisno o obiteljskom srodstvu vidljive su razlike za pik trombina i VI.
5. Mjerenjem stvaranja trombina kod svih ispitanika s VWB dobivena je slaba ili umjerena do dobra povezanosti svih ispitanih parametara (tLag, tPeak, Peak, VI i AUC) s APTV-om, aktivnosti FVIII, aktivnosti VWF i VWF:Ag, (uz izuzetak aktivnosti VWF i AUC) koji predstavljaju osnovne dijagnostičke testove u dijagnostici VWB. Temeljem dobivenih rezultata TGA RB ima potencijala za korištenje u svrhu probira bolesnika na VWB.
6. TGA nudi veliki spektar kliničkih i nekliničkih primjena. Njegova mogućnost mjerenja cijelog procesa od početka nastajanja ugruška do njegove razgradnje pokazuje veliki dijagnostički potencijal. Pruža mogućnost procjene rizika od krvarenja i tromboze te praćenje njihovog liječenja. Pokazuje i veliki potencijal u nekliničkoj primjeni u razvoju lijekova koji imaju utjecaj na hemostazu.
7. Nedostatak metode je što je za njeno izvođenje potrebna posebna oprema i reagensi, što predstavlja ekonomski izazov te zbog toga nema usporedivih rezultata s različitim kliničkim laboratorijima.

7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ADAMTS-13-proteaza 13 iz obitelji dizintegrina i metaloproteinaza s trombospondinskim dijelovima (*engl. A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs-13*)

ADP-adenozin difosfat

AMP-adenozin monofosfat

APTV-aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

AUC-površina ispod krivulje

cAMP- ciklički adenozin monofosfat

ELISA-enzimski povezani imunosorpcijski testovi (*engl. enyzmelinked immunosorbent assay*)

ER-endoplazmatski retikulum

FIXa-aktivirani faktor zgrušavanja IX

FIX-faktor zgrušavanja IX

FVa-aktivirani faktor zgrušavanja V

FV-faktor zgrušavanja V

FVII-faktor zgrušavanja VII

FVIIa-aktivirani faktor zgrušavanja VII

FVIII faktor zgrušavanja VIII

FVIII:C-test aktivnosti faktora VIII

FVIIIa-aktivirani faktor zgrušavanja VIII

FXa-aktivirani faktor zgrušavanja X

FX-faktor zgrušavanja X

FXI- faktor zgrušavanja XI

FXIa-aktivirani faktor zgrušavanja XI

FXIII- faktor zgrušavanja XIII

FXIIIa-aktivirani faktor zgrušavanja XIII

GPIb/V/IX -trombocitni kompleks glikoproteina Ib, IX i V

GPIb-glikoprotein Ib

GPIb α - alfa-lanac trombocitnog glikoproteina Ib

GPIIb/IIIa trombocitni glikoprotein IIb/IIIa

HMWM -visokomolekularni multimeri (engl. high molecular weight multimers)

IMWM -srednjemolekularni multimeri (engl. intermediate molecular weight multimers)

LIS-Laboratorijski informacijski sustav

LMWM- niskomolekularni multimeri (engl. low molecular weight multimers)

NO-dušikov oksid

PAI-1 - inhibitor plazminogenog aktivatora-1 (*engl. plasminogen activator inhibitor-1*)

PAR – proteazama aktivirani receptor

PAR-1 – proteazama aktivirani receptor 1

PAR-4 – proteazama aktivirani receptor 4

PgI₂-prostaciklin

PSGL-1-P- selektin glikoprotein ligand-1

PV-protrombinsko vrijeme

RIPA-Agregacija trombocita potaknuta ristocetinom

TAFI -engl.thrombin activatable fibrinolysis inhibitor

TFPI- inhibitora puta tkivnog faktora(*engl. tissue factor pathway inhibitor*)

TF-Tkivni faktor

TGA RB-reagens B za test stvaranja trombina

TGA-test stvaranja trombina (*engl.trombin generation assay*)

t-PA - tkivni aktivator plazminogena (*eng. tissue-type plasminogen activator*)

TXA₂-tromboksan A₂

UMWM- multimeri izrazito velike molekularne mase (engl. ultralarge molecular weight multimers)

u-PA - urokinazni aktivator plazminogena (*eng. urokinase-type plasminogen activator*)

VI-indeks brzine

VWB-von Willebrandova bolest

VWD- von Willebrand disease

VWF-von Willebrandov faktor

VWF:Ag-antigen VWF

VWF:CBA-test sposobnosti von Willebrandova faktora da veže kolagen

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

VWFpp-propeptid von Willebrandova faktora

VWF:RCo-ristocetinom potaknuta aktivnost von Willebrandova faktor

8.LITERATURA

Sertić, J; Batinić, D; Bernt- Živković, T; Bilić, K; Bojanić, I; Borovečki, F; Božina, N; Budimir, A; Ciglar, M; Čvorišćec, D et al. Klinička kemija i molekularna dijagnostika, Zagreb, Medicinska naklada, 2008, str. 706-726.

Rifai, N; Horvath, AR; Wittwer, C. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Elsevier, 2018, str. 1731-1734.

Saad J, Asuka E, Schoenberger L. Physiology, Platelet Activation. StatPearls [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482478/>]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan [Updated 2023 May 1].

Vinholt PJ. The role of platelets in bleeding in patients with thrombocytopenia and hematological disease. Clin Chem Lab Med. 2019 Nov 26;57(12):1808-1817.

Neubauer K, Zieger B. Endothelial cells and coagulation. Cell Tissue Res. 2022 Mar; 387(3):391-398.

Yong J, Abrams ST, Wang G, Toh CH. Cell-free histones and the cell-based model of coagulation. J Thromb Haemost. 2023 Jul;21(7):1724-1736.

Chaudhry R, Usama SM, Babiker HM. Physiology, Coagulation Pathways. StatPearls [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482253/>]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan [Updated 2022 Aug 29].

Lapić I. 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 [Disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2022 [pristupljeno 09.11.2023.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:839175>

Medcalf RL, Keragala CB. Fibrinolysis: A Primordial System Linked to the Immune Response. Int J Mol Sci. 2021 Mar 26;22(7):3406.

Kanji R, Gue YX, Memtsas V, Gorog DA. Fibrinolysis in Platelet Thrombi. Int J Mol Sci. 2021 May 12;22(10):5135.

Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. Blood Rev. 2015 Jan;29(1):17-24.

Aizawa, Hidenobu; Kurosawa, Shigeru; Tozuka, Mitsuhiro; Park, Jong-Won; Kobayashi, Koichi; Tanaka, Hideo: Conventional detection method of fibrinogen and fibrin degradation products using latex piezoelectric immunoassay; *Biosensors & bioelectronics*, 2003, 18, 765-71.

Safić, Jasna; Bačić Vrca, Vesna; Ćorić, Lejla; Jukić, Irena; Pepić, Ivan: Klinički aspekti lijekova podrijetlom iz ljudske plazme; *Farmaceutski glasnik*, 2016, 72, 299 – 324, Rad u časopisu, Objavljena verzija rada, <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:759374> , datum preuzimanja: 21.08.2023.

Smith SA, Travers RJ, Morrissey JH. How it all starts: initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2015;50(4):326-36.

Topić, Elizabeta; Janković, Stipan; Primorac, Dragan; Štefanović, Mario i suradnici: Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi; *Medicinska naklada*, Zagreb; 2. izdanje; studeni 2017; 505-571

de Groot PG, Urbanus RT, Roest M. Platelet interaction with the vessel wall. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;(210):87-110.

Manz XD, Bogaard HJ, Aman J. Regulation of VWF (Von Willebrand Factor) in Inflammatory Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2022 Nov;42(11):1307-1320.

Chen J, Chung DW. Inflammation, von Willebrand factor, and ADAMTS13. *Blood*. 2018 Jul 12;132(2):141-147.

Randi AM, Smith KE, Castaman G. von Willebrand factor regulation of blood vessel formation. *Blood*. 2018 Jul 12;132(2):132-140.

Berntorp E, Fuchs B, Makris M, Montgomery R, Flood V, O'Donnell JS, Federici AB, Lillicrap D, James P, Budde U, Morfini M, Petrini P, Austin S, Kannicht C, Jiménez-Yuste V, Lee C. Third Åland islands conference on von Willebrand disease, 26-28 September 2012: meeting report. *Haemophilia*. 2013 Mar;19 Suppl 3(0 3):1-18

Nilsson IM. The history of von Willebrand disease. *Haemophilia*. 1999 May;5 Suppl 2:7-11.

Federici AB, Berntorp E, Lee CA. The 80th anniversary of von Willebrand's disease: history, management and research. *Haemophilia*. 2006 Nov;12(6):563-72.

Sharma R, Haberichter SL. New advances in the diagnosis of von Willebrand disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2019 Dec 6;2019(1):596-600.

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.

Flood VH, Garcia J, Haberichter SL. The role of genetics in the pathogenesis and diagnosis of type 1 Von Willebrand disease. *Curr Opin Hematol*. 2019 Sep;26(5):331-335.

Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favaloro EJ, Hill FG, Holmberg L, Ingerslev J, Lee CA, Lillicrap D, Mannucci PM, Mazurier C, Meyer D, Nichols WL, Nishino M, Peake IR, Rodeghiero F, Schneppenheim R, Ruggeri ZM, Srivastava A, Montgomery RR, Federici AB; 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 Oct;4(10):2103-14.

Sadler B, Castaman G, O'Donnell JS. von Willebrand disease and von Willebrand factor. *Haemophilia*. 2022 May;28 Suppl 4(Suppl 4):11-17.

Sharma R, Haberichter SL. New advances in the diagnosis of von Willebrand disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2019 Dec 6;2019(1):596-600.

Tosetto A, Castaman G. How I treat type 2 variant forms of von Willebrand disease. *Blood*. 2015 Feb 5;125(6):907-14.

Fogarty H, Doherty D, O'Donnell JS. New developments in von Willebrand disease. *Br J Haematol*. 2020 Nov;191(3):329-339.

Weyand AC, Flood VH. Von Willebrand Disease: Current Status of Diagnosis and Management. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2021 Dec;35(6):1085-1101.

Roberts JC, Flood VH. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol*. 2015 May;37 Suppl 1(Suppl 1):11-7.

Depasse F, Binder NB, Mueller J, Wissel T, Schwers S, Germer M, Hermes B, Turecek PL. Thrombin generation assays are versatile tools in blood coagulation analysis: A review of technical features, and applications from research to laboratory routine. *J Thromb Haemost*. 2021 Dec;19(12):2907-2917.

Mannucci PM. New therapies for von Willebrand disease. *Blood Adv.* 2019 Nov 12;3(21):3481-3487.

Binder NB, Depasse F, Mueller J, Wissel T, Schwerts S, Germer M, Hermes B, Turecek PL. Clinical use of thrombin generation assays. *J Thromb Haemost.* 2021 Dec;19(12):2918-2929.

Valke LLFG, Rijpma S, Meijer D, Schols SEM, van Heerde WL. Thrombin generation assays to personalize treatment in bleeding and thrombotic diseases. *Front Cardiovasc Med.* 2022 Nov 10;9:1033416.

Rugeri L, Beguin S, Hemker C, Bordet JC, Fleury R, Chatard B, Negrier C, Dargaud Y. Thrombin-generating capacity in patients with von Willebrand's disease. *Haematologica.* 2007 Dec;92(12):1639-46.

Bravo MI, Raventós A, Pérez A, Costa M, Willis T. Non-additive effect on thrombin generation when a plasma-derived factor VIII/von Willebrand factor (FVIII/VWF) is combined with emicizumab in vitro. *J Thromb Haemost.* 2020 Aug;18(8):1934-1939.

de Breet CPDM, Zwaveling S, Vries MJA, van Oerle RG, Henskens YMC, Van't Hof AWJ, van der Meijden PEJ, Veenstra L, Ten Cate H, Olie RH. Thrombin Generation as a Method to Identify the Risk of Bleeding in High Clinical-Risk Patients Using Dual Antiplatelet Therapy. *Front Cardiovasc Med.* 2021 Jun 10;8:679934.

Hofer S, Ay C, Rejtö J, Wolberg AS, Haslacher H, Koder S, Pabinger I, Gebhart J. Thrombin-generating potential, plasma clot formation, and clot lysis are impaired in patients with bleeding of unknown cause. *J Thromb Haemost.* 2019 Sep;17(9):1478-1488.

9.SAŽETAK

Von Willebrandova bolest je najčešći poremećaj zgrušavanja krvi uzrokovan manjkom ili patološkom promjenom VWF. Cilj ovog rada bio je određivanje stvaranja trombina u bolesnika s VWB pomoću komercijalno dostupnog testa TGA RB na analizatoru Ceveron®s100 serije (Technoclone, Beč, Austrija), odnosno utvrditi vrijednost navedenog testa u dijagnostici VWB.

Analizirani su uzorci 72 ispitanika s kliničkom sumnjom na VWB koji su podijeljeni u 5 osnovnih skupina: tip 1 VWB (N=21), tip 2 VWB (N=23), tip 3 VWB (N=7), „niski VWF“ (N=6) i bolesnici bez dokazane mutacije u genu za VWF (N=15). Parametri testa TGA RB (tLag, tPeak, Peak, VI i AUC) uspoređivani su između skupina ispitanika sa i bez VWB. Analizirani rezultati ukazuju na postojanje statistički značajne razlike izmjerenih parametara ovisno o prisutnosti bolesti, ali i o samom tipu bolesti. Dodatnom analizom ispitivanih parametara testa TGA RB s obzirom na krvno srodstvo ispitanika utvrđena je statistički značajna razlika za Peak i VI između pojedinih obitelji. Ispitana je korelacija ispitivanih parametara TGA RB s VWF:Ag, aktivnosti VWF, APTV-om i aktivnosti FVIII. Analizom je utvrđena slaba ili umjerenja do dobra povezanost svih izmjerenih parametara s VWF:Ag, aktivnosti VWF, APTV-om i aktivnosti FVIII (uz izuzetak aktivnosti VWF i AUC).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako brzina stvaranja trombina ovisi o tome boluje li ispitivana osoba od VWB ili je zdrava, a i tip VWB utječe na brzinu stvaranja trombina. Utvrđeno je da stvaranje trombina ovisi o krvnom srodstvu, vidljive su statistički značajne razlike za pik trombina i VI između pojedinih obitelji. Parametri TGA RB pokazuju dobru korelaciju s parametrima koji se koriste u rutinskoj dijagnostici VWB te bi se na temelju dobivenih rezultata i sam test TGA RB mogao koristiti za probir bolesnika s VWB.

10.SUMMARY

Von Willebrand's disease is the most common blood clotting disorder caused by a lack or pathological change of VWF. The aim of this work was to determine thrombin generation in patients with VWD using the commercially available TGA RB test on the Ceveron®s100 series analyzer (Technoclone, Vienna, Austria), that is, to determine the value of the said test in the diagnosis of VWD.

Samples of 72 subjects with clinical suspicion of VWD were analyzed and divided into 5 basic groups: type 1 VWD (N=21), type 2 VWD (N=23), type 3 VWD (N=7), "low VWF" (N=6) and patients without a proven mutation in the VWF gene (N=15). TGA RB test parameters (tLag, tPeak, Peak, VI and AUC) were compared between groups of subjects with and without VWD. The obtained results indicate the existence of a statistically significant difference in the measured parameters depending on the presence of the disease, but also on the type of disease itself. An additional analysis of the examined parameters of TGA RB was made with regard to the blood relationship of the subjects. A statistically significant difference is visible for Peak and VI between individual families. The correlation of the tested TGA RB parameters with VWF:Ag, VWF activity, APTV and FVIII activity was examined. The analysis revealed a weak or moderate to good correlation of all measured parameters with VWF:Ag, VWF activity, APTV and FVIII activity (with the exception of VWF activity and AUC).

The obtained results show that the rate of thrombin generation depends on whether the person tested is suffering from VWD or is healthy, and the type of VWD affects the rate of thrombin generation.. It was established that the formation of thrombin depends on the blood relationship, statistically significant differences are visible for the thrombin peak and VI between individual families. The TGA RB parameters are showing a good correlation with the parameters used in the routine diagnosis of VWD, and based on the obtained results, the TGA RB itself could be used to screen patients with VWD.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ANALIZA STVARANJA TROMBINA U BOLESNIKA S VON WILLEBRANDOVOM BOLESTI

Ana Majsec

SAŽETAK

Von Willebrandova bolest je najčešći poremećaj zgrušavanja krvi uzrokovan manjkom ili patološkom promjenom VWF. Cilj ovog rada bio je određivanje stvaranja trombina u bolesnika s VWB pomoću komercijalno dostupnog testa TGA RB na analizatoru Ceveron@s100 serije (Technoclone, Beč, Austrija), odnosno utvrditi vrijednost navedenog testa u dijagnostici VWB. Analizirani su uzorci 72 ispitanika s kliničkom sumnjom na VWB koji su podijeljeni u 5 osnovnih skupina: tip 1 VWB (N=21), tip 2 VWB (N=23), tip 3 VWB (N=7), „niski VWF“ (N=6) i bolesnici bez dokazane mutacije u genu za VWF (N=15). Parametri testa TGA RB (tLag, tPeak, Peak, VI i AUC) uspoređivani su između skupina ispitanika sa i bez VWB. Analizirani rezultati ukazuju na postojanje statistički značajne razlike izmjerenih parametara ovisno o prisutnosti bolesti, ali i o samom tipu bolesti. Dodatnom analizom ispitivanih parametara testa TGA RB s obzirom na krvno srodstvo ispitanika utvrđena je statistički značajna razlika za Peak i VI između pojedinih obitelji. Ispitana je korelacija ispitivanih parametara TGA RB s VWF:Ag, aktivnosti VWF, APTV-om i aktivnosti FVIII. Analizom je utvrđena slaba ili umjerenjena do dobra povezanost svih izmjerenih parametara s VWF:Ag, aktivnosti VWF, APTV-om i aktivnosti FVIII (uz izuzetak aktivnosti VWF i AUC). Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako brzina stvaranja trombina ovisi o tome boluje li ispitivana osoba od VWB ili je zdrava, a i tip VWB utječe na brzinu stvaranja trombina. Utvrđeno je da stvaranje trombina ovisi o krvnom srodstvu, vidljive su statistički značajne razlike za pik trombina i VI između pojedinih obitelji. Parametri TGA RB pokazuju dobru korelaciju s parametrima koji se koriste u rutinskoj dijagnostici VWB te bi se na temelju dobivenih rezultata i sam test TGA RB mogao koristiti za probir bolesnika s VWB.

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

Rad sadrži: 56 stranica, 9 grafičkih prikaza, 13 tablica i 40 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: von Willebrandova bolest, von Willebrandov faktor, test stvaranja trombina, test TGA RB

Mentor: **Dr.sc. Marija Grdić Rajković**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Désirée Coen Herak, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr.sc. Marija Grdić Rajković**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Željka Vogrinc, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Désirée Coen Herak, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: prosinac 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

ANALYSIS OF THROMBIN GENERATION IN PATIENTS WITH VON WILLEBRAND'S DISEASE

Ana Majsec

SUMMARY

Von Willebrand's disease is the most common blood clotting disorder caused by a lack or pathological change of VWF. The aim of this work was to determine thrombin generation in patients with VWD using the commercially available TGA RB test on the Ceveron@s100 series analyzer (Technoclone, Vienna, Austria), that is, to determine the value of the said test in the diagnosis of VWD. Samples of 72 subjects with clinical suspicion of VWD were analyzed and divided into 5 basic groups: type 1 VWD (N=21), type 2 VWD (N=23), type 3 VWD (N=7), "low VWF" (N=6) and patients without a proven mutation in the VWF gene (N=15). TGA RB test parameters (tLag, tPeak, Peak, VI and AUC) were compared between groups of subjects with and without VWD. The obtained results indicate the existence of a statistically significant difference in the measured parameters depending on the presence of the disease, but also on the type of disease itself. An additional analysis of the examined parameters of TGA RB was made with regard to the blood relationship of the subjects. A statistically significant difference is visible for Peak and VI between individual families. The correlation of the tested TGA RB parameters with VWF:Ag, VWF activity, APTV and FVIII activity was examined. The analysis revealed a weak or moderate to good correlation of all measured parameters with VWF:Ag, VWF activity, APTV and FVIII activity (with the exception of VWF activity and AUC). The obtained results show that the rate of thrombin generation depends on whether the person tested is suffering from VWD or is healthy, and the type of VWD affects the rate of thrombin generation. It was established that the formation of thrombin depends on the blood relationship, statistically significant differences are visible for the thrombin peak and VI between individual families. The TGA RB parameters are showing a good correlation with the parameters used in the routine diagnosis of VWD, and based on the obtained results, the TGA RB itself could be used to screen patients with VWD.

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

Thesis includes: 56 pages, 9 figures, 13 tables and 40 references. Original is in Croatian language.

Keywords: von Willebrand disease, von Willebrand factor, thrombin generation assay, TGA RB test

Mentor: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Désirée Coen Herak, Ph.D. *Assistant Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željka Vogrinc, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.
Désirée Coen Herak, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: December 2023.