

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A VON WILLEBRAND FAKTOR ÉS A GPIb/IX/V KOMPLEX
KÓROS MŰKÖDÉSÉNEK VIZSGÁLATA VON WILLEBRAND
BETEGSÉGBEN ÉS BERNARD - SOULIER
SZINDRÓMÁBAN**

Dr. Schlamadinger Ágota

Témavezető: Prof. Dr. Boda Zoltán

Programvezető: Prof. Dr. Muszbek László

**DEBRECENI EGYETEM ORVOS – ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
II. SZ. BELGYÓGYÁSZATI KLINIKA
HAEMOSTASEOLÓGIAI TANSZÉK
DEBRECEN**

2006

TARTALOMJEGYZÉK

	Oldalszám
Rövidítések listája	4
Bevezetés	6
Irodalmi áttekintés	8
A VWF genetikája és szerkezete	8
A VWF bioszintézise, szekréciója és lebontása	10
A VWF működése	12
A von Willebrand betegség előfordulása, tünettana	14
A von Willebrand betegség klasszifikációja	15
A von Willebrand betegség terápiája	18
A von Willebrand betegség laboratóriumi diagnosztikája	18
A GPIIb/IX/V komplex szerkezete	27
A Bernard-Soulier szindróma	30
A GPIIb/IX/V komplex genetikája	31
Célkitűzések	33
Betegek, anyagok és módszerek	34
A nagy nyíróerejű áramlási módszerek alkalmazhatóságának vizsgálata a von Willebrand betegség diagnosztikájában	34
A reuma faktor zavaró hatása az immunturbidimetriás elven működő VWF:Ag meghatározásra	37
A Bernard-Soulier szindrómás beteg vizsgálata	39

Eredmények	48
A nagy nyíróerejű áramlási módszerekkel kapott eredmények	48
A reuma faktor hatása az immunturbidimetriás elven működő VWF:Ag meghatározásra	54
A Bernard-Soulier szindrómás beteg vizsgálatával kapott eredmények	55
Megbeszélés	64
Összefoglalás	73
Irodalom	74
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	92
Az értekezéshez nem szorosan kapcsolódó közlemények	93
Az értekezéshez kapcsolódó idézhető absztrakt	95
Könyvfejezetek	95
Az értekezés témájához kapcsolódó, első szerzőként bemutatott kongresszusi anyagok	96
Köszönetnyilvánítás	99
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai	100

RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA

ACD	„acid citrate dextrose”
ADP	adenozin-difoszfát
ADAMTS13	„a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin repeats”
APTI	aktivált parciális tromboplasztin idő
BSS	Bernard-Soulier szindróma
DDAVP	dezamino-8-D-arginin-vazopresszin
DMSO	dimetilszulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxinukleotid-trifoszfát
EDTA	etiléndiamin-tetraacetát
FVIII	VIII-as alvadási faktor
FVIII:C	VIII-as faktor koaguláns aktivitás
GP	glikoprotein
HRP	„horse radish peroxidase” - tormaperoxidáz
Ig	immunglobulin
LRM	„leucin rich motif”
OPD	ortophenilendiamin
PBS	„phosphat buffered saline”
PCR	polimeráz láncreakció
PFA-100	„platelet function analyzer-100”
PRP	„platelet rich plasma”, trombocytadús plazma
RF	reuma faktor
RR	„reference range”, referencia tartomány
SDS	„sodium dodecylsulphate”
TRAP	„thrombin receptor activating peptide”
TBS	„tris buffered saline”
VWF	von Willebrand faktor

VWB	von Willebrand betegség
VWF:Ag	von Willebrand faktor antigén
VWF:CB	von Willebrand faktor kollagén kötő képesség
VWF:FVIII B	von Willebrand faktor FVIII kötő képesség

BEVEZETÉS

Haemostasison azon rendkívül bonyolult és jól szabályozott mechanizmusok összességét értjük, melyek biztosítják, hogy az érfal endothel rétegének megszakadását követően a sérülés helyén a vérzést megállító vérrög keletkezzen, s ugyanakkor az így keletkezett vérrög növekedése csak addig folytatódjon, amíg az a vérzés csillapításához szükséges. A feleslegessé vált thrombus ezután fokozatosan lebontódik, eltűnik a szervezetből.

Az elmúlt évtizedekben a haemostasis alapvető folyamatairól alkotott elképzelés keveset változott: az érfal sérülését vazokonstrikció követi, majd az endothel sérülés következtében a vérárammal kapcsolatba került subendothelialis struktúrákon egy vérlemezke réteg jön létre (adhézió), melyet további vérlemezke aktiváció és aggregáció követ. Ezt a primer haemostasisnak nevezett folyamatot a véralvadási kaskád aktiválódása követi (szekunder haemostasis). Az így keletkezett véralvadékot a fibrinolitikus rendszer bontja el.

Bár az alapvető mechanizmusokról alkotott fogalmaink keveset változtak, az elmúlt tíz évben azonban egyre hangsúlyosabb szerepet kapott a vér alkotóelemei és az érfal mellett a már Virchow által is említett harmadik tényező: a vér áramlási viszonyai. Míg a keringés vénás oldalán, ahol az áramlás lassú és az áramló vér rétegei között fellépő nyíróerő kicsi, az alvadási faktorok működése domináns, addig a nagy nyíróerővel jellemzett artériás keringésben, a mikrocirkuláció arterioláiban a primer haemostasis szerepe meghatározó. Nagy nyíróerejű áramlási

viszonyok között érfalsérülést követően a thrombocyta adhézió létrejöttéhez olyan nagy erejű kötésre van szükség, ami képes az áramló vörösvérsejtek által az érfal közelébe kizorított, nagy sebességgel haladó vérlemezkéket időlegesen a subendothelialis struktúrákhoz kötni, haladásukat lelassítani, megteremtve a feltételét annak, hogy az aktiválódott thrombocyták és az érfal között végleges, erős kötés, stabil adhézió alakulhasson ki. Ezt a nagy erejű kapcsolatot a szervezetben a von Willebrand faktor (VWF) biztosítja. A VWF jelenléte nélkülözhetetlen a nagy nyíróerejű áramlási viszonyok között kialakuló thrombocyta adhézióhoz. Hiányában egy gyakori, többnyire veleszületett vérzékenység, a von Willebrand betegség (VWB) alakul ki. A von Willebrand faktor receptora a vérlemezkék felszínén a glikoprotein (GP) Ib/IX/V komplex. Ennek hiánya vagy csökkent működése ugyancsak vérzékenységhez vezet, a VWB-nél jóval ritkábban előforduló Bernard-Soulier szindrómát okozza.

Jelen dolgozat célja a szerző VWF és a GPIb/IX/V receptor közötti kölcsönhatással kapcsolatban végzett laboratóriumi munkáinak összefoglalása. Külön hangsúlyt kap a nagy nyíróerejű áramlási viszonyokkal dolgozó módszerek szerepének vizsgálata és összehasonlítása a von Willebrand betegség szűrésében és diagnosztikájában valamint egy Bernard-Soulier szindrómás beteg klinikai és genetikai vizsgálata. Emellett helyet kap az irodalmi összefoglalás részeként a szerzőnek a VWB diagnosztikájában kialakult és közleményben megjelent munkamódszere, valamint egy megfigyelés, mely a Willebrand betegség diagnosztikájának egyik buktatójára hívja fel a figyelmet.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A von Willebrand faktor óriási, multimer szerkezetű glikoprotein, mely a plazmában, a vérlemezkék α -granulumaiban és az endothel sejtek Weibel-Palade testeiben fordul elő, valamint alkotórésze a subendothelialis mátrixnak. Két biológiai funkciója van: egyrészt a VIII-as alvadási faktor (FVIII) hordozó molekulája, másrészt alapvető szerepet játszik a sérült érfal és a vérlemezkék közti kapcsolat biztosításában nagy nyíróerejű áramlási körülmények között.

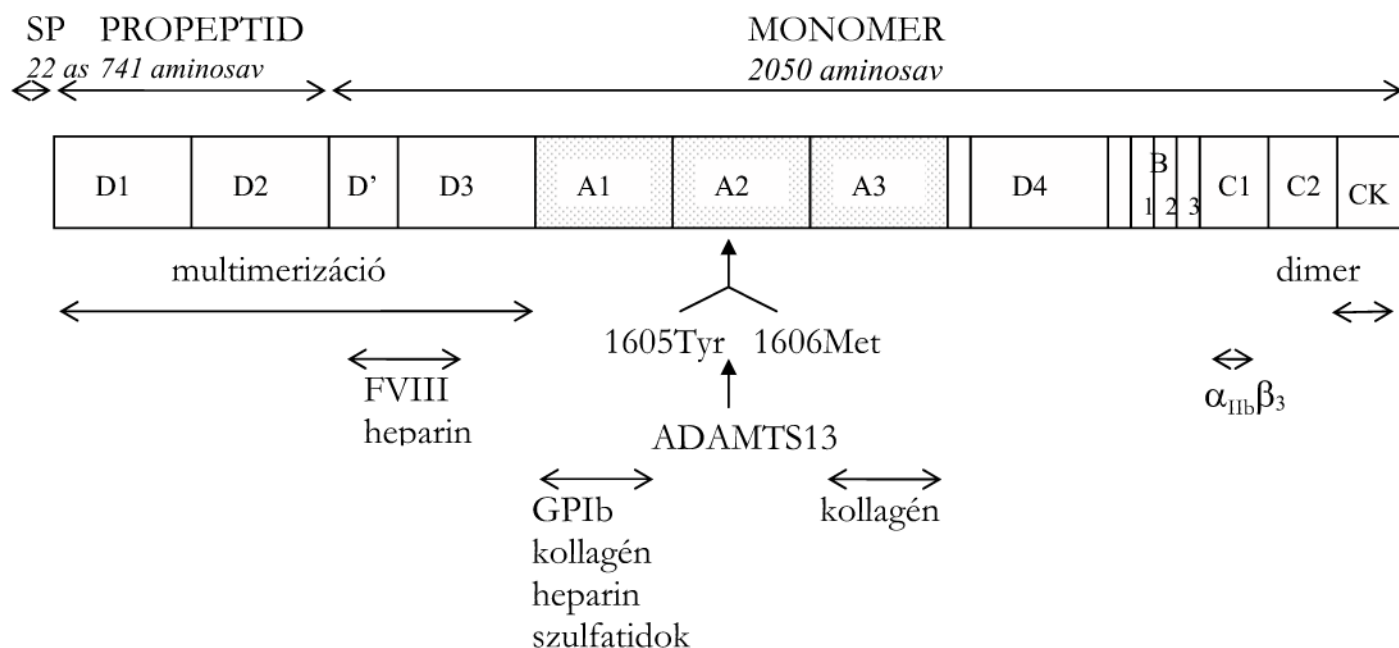
A von Willebrand faktor genetikája és szerkezete

A VWF génje a 12-es kromoszóma rövid karján található (Ginsburg, 1985), 180 kb nagyságú és 52 exont tartalmaz (Mancuso, 1989). A 22-es kromoszómán egy pseudogént írtak le (Mancuso, 1991), mely a 23-34-es exonok duplikációjának felel meg és aminosav sorrendje 97%-ban azonos az eredeti szekvenciával. A VWF gén transzkripciója az endothel sejtekre és a megakaryocytákra korlátozódik. Az elsődleges géntermék a pre-pro-VWF, mely 2813 aminosavból áll és tartalmaz egy 22 aminosav alkotta szignál peptidet, egy 741 aminosavból álló propeptidet és a 2050 aminosavból álló érett VWF alegységet. A jelenlegi nómenklatúra szerint az aminosavak számozása a szignál peptid első metioninjétől kezdődik, így az érett VWF alegység első aminosava a pre-pro-VWF 764. aminosavával egyezik meg (Goodeve, 2001). A fehérje ismétlődő doménekből épül fel, melyek sorrendje: D1–D2–D'–D3–A1–A2–A3–D4–B1–B2–B3–C1–C2–CK. A D1–D2 domének a

propeptid részei, diszulfid izomeráz aktivitásuk révén részt vesznek a multimerizációban. A D' és D3 domén a VIII-as faktor kapcsolódási helye, de tartalmaz egy heparin kötő szekvenciát is. A D3 domén ciszteinjei vesznek részt a multimer szerkezet kialakításában. Az A1 domén fő funkciója a thrombocyta membrán GPIb receptorához kapcsolódás, emellett heparin, kollagén (VI-os típus) és szulfatid kötő aktivitása is van. Az A3 domén a fő kollagén kötő receptor (I-es és III-as típusú kollagén). Az A2 doménben található az 1605-ös tirozin és az 1606-os metionin között a VWF proteolízisét végző ADAMTS13 enzim (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin repeats) hasító helye. A C1 domén része az Arg-Gly-Asp szekvencia, melyhez az $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$ integrin kötődik. A monomerek CK doménjei között kialakuló diszulfid hidak hozzák létre a multimerizáció kiinduló elemét jelentő dimert. A VWF szerkezetét és az egyes domének funkcióját szemlélteti az 1. ábra.

A VWF 10-19% szénhidrátot tartalmaz, egy monomerhez 22 oligoszacharid oldallánc kapcsolódik, 12 amino-, 10 hidroxigyökön keresztül (Titani, 1986). A szénhidrátláncok jelentősége nem teljesen tisztázott, de úgy tűnik, hogy szükséges a monomer-dimer átalakuláshoz (Wagner, 1986) és a VWF natív konformációjának megőrzéséhez: a szialav oldalláncok eltávolítása (aszialo-VWF) thrombocytadús plazmában aggregációt vált ki (Vermylen, 1974; 1976). A szénhidrát oldalláncok között az AB0 vércsoportrendszer oligoszacharidjai is megtalálhatók (Matsui, 1992). A 0-s vércsoportúak VWF szintje 30%-kal alacsonyabb az A illetve B vércsoportúakéhoz képest (Gill, 1987). A különbség oka feltehetőleg a VWF

rövidebb féléletidejében keresendő (Matsui, 1993, Bowen, 2003). A VWF szerkezetének másik kiemelhető sajátossága a nagy cisztein tartalom: a pre-pro-VWF 2813 aminosavából 234 cisztein (8,3%). Valamennyi cisztein inter- vagy intramolekuláris diszulfid hidak alkotásában vesz részt (Marti, 1987).



1. ábra A VWF szerkezete és kötőhelyei. SP: szignál peptid, as: aminosav

A VWF bioszintézise, szekréciója és lebontása

A szignál peptid eltávolítását és a kezdeti glikozilációt követően az endoplazmatikus retikulumban a pro-VWF molekulák a karboxi-terminális CK doménen keresztül dimerizálódnak, majd a Golgiban az N-terminális régió ciszteinjein keresztül multimerek alakulnak ki, a fehérje további glikozilációjával és szulfatálásával egy időben. Az endothel sejtek a multimerek 95%-át folyamatosan szekretálják, 5% pálcika alakú, membránnal fedett organellekben, az ún.

Weibel-Palade testekben tárolódik és csak bizonyos indukáló hatásokra (thrombin, hisztamin, adrenerg stressz, DDAVP) szabadul ki a keringésbe. A megakaryocytákban és a vérlemezkékben csak ez utóbbi, indukált szekréció működik, a multimerek az α -granulumokban tárolódnak. A VWF multimerek tömege 500 kD-tól (dimer) 20000 kD-ig változhat, a Weibel-Palade testekben és az α -granulumokban viszont ennél nagyobb, ún. ultranagy multimerek is jelen vannak és indukáló hatásra a keringésbe kerülnek.

A multimerek lebontását a már korábban említett, a von Willebrand faktort hasító specifikus metalloproteáz végzi, melyet az ADAMTS család 13-as számmal jelölt tagjaként azonosítottak (Fujikawa, 2001). Statikus körülmények között a VWF rezisztens az enzim jelenlétére, viszont gyorsan lebomlik nagy nyíróerejű áramlási viszonyok között (Tsai, 1996), feltehetőleg a nagy nyíróerő okozta konformáció változás hatására (Siedlecki, 1998). Ez magyarázza a súlyos aorta stenosisához társuló szerzett von Willebrand szindrómát és az ennek következtében kialakuló, angiodysplasiás eredetű gastrointestinális vérzéseket (Sadler, 2003; Vincentelli, 2003). Az A1 domén kapcsolódása a GPIb α -hoz illetve heparinhoz ugyancsak hozzáférhetővé teszi az ADAMTS13 számára az A2 doménben levő hasítási helyet (Nishio, 2004). Ez egyfajta ellenregulációs mechanizmusként hat, a nagy multimerek lebontását biztosítja az endothel sérülés és fokozott thrombocyta aktiváció helyén.

Az ADAMTS13 veleszületett vagy szerzett hiánya súlyos, életet veszélyeztető betegséget, microvascularis thrombosisokkal, haemolysissel és

sokszervi elégtelenséggel járó thrombotikus thrombocytopeniás purpurát okoz (Furlan M, 1998; Tsai HM, 1998). Az endothel sejtek különböző stimuláló vagy károsító hatásokra a tárolt ultranagy VWF multimerek szekréciójával válaszolnak, melyek P selectinhez horgonyozva összeköttetésben maradnak az endothel sejtek felszínével és a keringő VWF-ral való kapcsolódás révén hosszú VWF szálakat alkotnak (Savage, 2002). Normál körülmények között az ADAMTS13 gyorsan lebontja ezeket a rendkívül thrombogen molekulákat. ADAMTS13 hiányában viszont thrombocytá thróbusok jönnek létre, melyek a keletkezés helyén vagy onnan leszakadva és embolusokat alkotva elzárják a kis arteriolákat, szöveti ischaemiát és microvascularis haemolysist okozva. A széteső vörösvérsejtekből felszabaduló ADP tovább erősíti az aggregációs folyamatot (Lopez, 2004).

A VWF működése

A von Willebrand faktornak kettős funkciója van: egyrészt a FVIII szállító molekulája, megvédi a proteolízissel szemben. Ha a VWF mennyisége számottevően csökkent, a FVIII féleletideje rövidül, szintje alacsonyabb. Ilyenkor a primer haemostasis zavara a szekunder haemostasis zavarával társul.

A VWF másik funkciója, hogy biztosítja a primer haemostasis működését nagy nyíróerejű áramlási viszonyok között. Az erekben áramló vér sebessége változik az érfaltól való távolság függvényében: legnagyobb az ér közepén és fokozatosan csökken az érfalhoz közeledve. Ha a vért mint megszámlálhatatlan, egymással párhuzamosan elcsúszó réteget képzeljük el, a rétegek között

nyírófeszültség alakul ki. A nyíróarány (mely a rétegek sebességkülönbségéből és távolságukból ered) a legnagyobb az érfal közelében, éppen ott, ahol a nagyobb mennyiségű vörösvérsejt tömeg által a perifériára szorított vérlemezkék áramlanak. Fiziológias körülmények között a legnagyobb nyíróarány a mikrocirkuláció 10-50 μm -es kis arterioláiban, ahol 500 és 5000 s^{-1} között változik (Ruggeri, 1997). Patológias körülmények között, a verőereket szűkítő plakkok tetején a nyíróarány ennél jóval nagyobb, 20-40000 s^{-1} is lehet, amennyiben a szűkület mértéke eléri a 90%-ot (Ruggeri, 2003). A vénás rendszerben, ahol az áramlás lassú, a kollagén, fibrinogén, fibronectin és a megfelelő thrombocyta felszíni receptorok közötti kötés elég erős ahhoz, hogy a vérlemezkék adhézióját biztosítsa. Ugyanakkor nagy nyíróerő esetén ezen kötések kinetikája nem teszi lehetővé az adhézió elindítását. Ilyen körülmények között válik nélkülözhetetlenné a VWF: a vérlemezkék GPIIb receptora és a subendothelialis struktúrák között kötés jön létre, mely rövid féléletidejű, gyors asszociációs és disszociációs ráta jellemzi. Önmagában ez nem biztosítja a stabil adhéziót, viszont a thrombocyták sebessége jelentősen csökken, lassú görgő mozgást végeznek a sérült érfal mentén, miközben aktiválódnak. A felszínen megjelenő egyéb receptorok (pl. $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$) és szubsztrátjaik között kialakuló kapcsolódás már képes erős, stabil adhéziót biztosítani (Savage, 1996; 1998). A VWF-nak ebben a funkciójában meghatározó a molekula mérete: minél több receptor-ligand kapcsolódás alakulhat ki, annál erősebb kötés jöhet létre. Így a primer haemostasis elindításában a nagy multimerek a leghatásosabbak.

Normál körülmények között a globuláris szerkezetű von Willebrand faktor és a vérlemezkék egymás mellett vannak jelen a keringésben anélkül, hogy egymással kapcsolatba kerülnének. A VWF-GPIb interakció kialakulásához a VWF konformációjának megváltozása szükséges. Ezt fiziológiás körülmények között subendothelialis struktúrákhoz kapcsolódás illetve a nagy nyíróerő hozza létre (Siedlecki, 1998), bár vannak ettől eltérő kísérletes adatok is (Novák, 2002). Mesterséges, laboratóriumi körülmények között a VWF-GPIb kapcsolat kialakulását indukálhatjuk a szialsav oldalláncok eltávolításával (aszialo-VWF), egyes monoklonális antitestekkel (Tornai, 1993; Depraetere, 1998), illetve két anyaggal: egy glikopeptid antibiotikummal, a risztocetinnel és egy kígyó mérgéből előállított fehérjével, a botrocetinnel. Patológias körülmények között, a VWF vagy receptorának mutációja következtében a VWF-GPIb kapcsolódás spontán is bekövetkezhet (2B típusú illetve thrombocyta típusú, „platelet type” von Willebrand betegség).

A von Willebrand betegség előfordulása, tünettana

A von Willebrand faktor szintjének csökkenése vagy kóros működése egy gyakori, többnyire örökletes vérzékenységet, von Willebrand betegséget (VWB) okoz. A VWB előfordulási gyakoriságát egészséges populációkon végzett felmérések alapján 1%-nak adják meg (Rodeghiero, 1987), ugyanakkor a valóban tünetekkel járó betegség előfordulása ennél kisebb, kb. 1/10000 lehet (Sadler, 2000).

A VWB-re a bőr – és nyálkahártyavérzések a legjellemzőbbek. Különösen gyermekkorban gyakoriak az orrvérzések, előfordul fogínyvérzés, illetve fogextractiót követően jelentkező tartós, nehezen csillapítható vérzés. A betegséget nemegyszer gyermekkori tonsillectomiát követően fellépő utóvérzés kapcsán diagnosztizálják. A betegek bőrén kis, sokszor nem is észlelt traumára nagy véraláfutások jelennek meg. Haematuria és gastrointestinalis vérzés ritkább, ez utóbbi inkább 50 éves kor fölött fordul elő. Komoly gondot jelentenek viszont a – sok esetben – vashiány anaemiához vezető menorrhagia és a szülést követően kialakuló vérzéses komplikációk. Ezek gyakorisága miatt az autoszomálisan öröklődő betegség női predominanciát mutat. Súlyos von Willebrand betegségben, vagy egy speciális alcsoportban, ahol a FVIII kötés károsodott, a szekunder haemostasis zavara miatt haemophiliához hasonló szövetközi és ízületi vérzések is előfordulnak.

A von Willebrand betegség klasszifikációja

Az 1990-es évek elejére az egyes betegek részletes kivizsgálása kapcsán felgyűlt ismeretek a VWB rendkívül bonyolult beosztásához vezettek. Ezért született meg 1994-ben a ma is használt, a mindennapi gyakorlatban jól alkalmazható új klasszifikáció (Sadler, 1994). Eszerint a leggyakoribb 1-es típus a VWF mennyiségének csökkenését, a ritka és súlyos 3-as típus a VWF teljes hiányát jelenti. A 2-es típus a VWF funkcionális károsodásával járó állapotokat fedi, normális, vagy alig csökkent VWF szint mellett. A 2A altípusban a haemostasis

szempontjából legaktívabb nagy multimerek hiánya okoz vérzékenységet. A 2B altípusban a VWF affinitása fokozott a GPIb receptor iránt, ezért a nagy multimerek a receptorhoz kapcsolódva thrombocyta aggregátumokat hoznak létre, melyeket a szervezet eliminál a keringésből. Ennek eredménye a nagy multimerek hiánya és a thrombocytopenia, amelyek együttesen vérzékenységet okoznak. A 2M altípus funkcionális károsodást jelent normál multimer szerkezet mellett, míg 2N típusú VWB-ben a FVIII kötés károsodott, így haemophiliához hasonló tünetek jelenhetnek meg.

A leginkább tisztázott a genetikai háttér a többnyire autoszomális domináns öröklődést mutató 2-es típusú von Willebrand betegségben (Meyer, 2001; Schneppenheim, 2005). A 2A típusú VWB-t két csoportra szokták osztani: az *1-es csoportot* azok a mutációk okozzák, amelyek a dimerizáció-multimerizáció folyamatát érintik. Ezekben az esetekben a VWF intracelluláris transzportja és szekréciója zavart, mind a plazmában levő, mind a thrombocyta VWF kóros szerkezetű. Ide tartoznak a CK domén mutációi (régí nomenklátúra szerint IID típusú VWB), melyek a dimerizáció hibáját okozzák illetve a multimerizáció gátlásával járó, a D1 és D2 domént (IIC) és a D3 domént (IIE) érintő mutációk. A *2-es csoportot* azok az A2 domén azon mutációi alkotják, melyek a VWF-t fokozottan érzékennyé teszik a proteolízissel szemben. A nagy multimerek gyorsan eltűnnek a keringésből, ugyanakkor a thrombocytákban, a proteolízistől védett helyen továbbra is jelen vannak.

A fokozott VWF-GPIb interakcióval járó 2B típusú VWB-t az A1 domén mutációi okozzák, ugyanezen régió mutációi felelősek a 2M típusú Willebrand betegségért. Külön említendő a jelenleg 2M típusba sorolt Vicenza típusú VWB, melyre normál vagy enyhén megnyúlt vérzés idő mellett erősen csökkent VWF mennyiség és aktivitás jellemző a plazmában, míg a vérlemezkék VWF tartalma többnyire normális, bár egyes esetekben csökkent (Zieger, 1997). A plazmában ultranagy VWF multimerek mutathatók ki (Mannucci, 1988). 2M Vicenza típusú VWB-t a D2 és D3 domén mutációi okoznak (Castaman, 2000; Schneppenheim 2000). A 2M csoportba sorolhatók a VWF A3 doménjét érintő, csak a kollagén kötő képességet befolyásoló mutációk (Ribba, 2001; Schneppenheim, 2001) is. Az autoszomális recesszíven öröklődő 2N (Normandy) típusú VWB-t okozó mutációk a D' és D3 doménben helyezkednek el.

A VWF teljes hiányával járó 3-as típusú VWB autoszomális recesszíven öröklődik, deléciók, nonsense és frameshift mutációk okozzák. Az 1-es típusú VWB öröklődése jóval komplexebb, autoszomális domináns módon öröklődik inkomplett penetranciával. Mivel a von Willebrand faktor szintjét számos genetikai és nem genetikai tényező befolyásolja (vércsoport, polimorfizmusok, hormonális hatások, kor, stressz stb.) 1-es típusúnak diagnosztizált betegek esetében gyakran nem igazolódik mutáció a VWF génjében. Ugyanakkor a kötelezően heterozygota egyének VWF szintje nem egy esetben normál tartományba esik. Ezért egy újabb vélemény szerint az 1-es típusú VWB diagnózisát a vérzékenységi tüneteket mutató, alacsony (20% alatti) VWF szintű betegekre kell fenntartani, akiknek a

családjában a VWB autoszomális domináns módon öröklődik. Azoknak az esetében, akik nem felelnek meg ezeknek a kritériumoknak, de a VWF szintje alacsony, ezt mint egyfajta vérzékenységre hajlamosító tényezőt kell figyelembe venni (Sadler, 2003; 2005).

A von Willebrand betegség terápiája

A von Willebrand betegség egyik nem transzfúziós kezelési lehetősége a desmopressin (DDAVP), mely a vazopresszin szintetikus analógja. Az endothel raktárakban levő VWF-t szabadítja fel és néhány órára megfelelő haemostasist biztosít. Elsősorban 1-es típusú VWB-ben hatékony, 2-es típusban hatékonysága kérdéses, a 2B altípusban kontraindikált. Nem transzfúziós, kiegészítő kezelési lehetőségként a fibrinolízis gátlók (ε-aminokapronsav, tranexamsav) illetve ösztrogén-progeszteron készítmények jönnek szóba. Transzfúziós kezelésként leginkább a FVIII-VWF tartalmú faktorkoncentrátumokat alkalmazzuk (legelterjedtebben a Haemate-P-t), súlyos esetben kerül sor thrombocyta koncentrátum illetve rekombináns aktivált FVII adására.

A von Willebrand betegség laboratóriumi diagnosztikája

A von Willebrand betegség diagnózisának felállítása illetve a betegség pontos alcsoport meghatározása nem egyszerű feladat. Többféle tesztet igényel, olyanokat is, melyek nem részei a mindennapi laboratóriumi gyakorlatnak, s nem egyszer a vizsgálatok ismételése szükséges a biztos diagnózis kimondásához. A kapott

adatokat mindig körültekintően, a klinikai adatok (társbetegségek, gyógyszereszedés, vércsoport stb.) figyelembe vételével kell értékelni.

A VWB diagnosztikájában megkülönböztetünk gyorsan és egyszerűen kivitelezhető, a vérzékenység fennállását alátámasztó szűrőteszteket, a VWB diagnózisának kimondásához szükséges specifikus teszteket és az egyes altípusokat elkülönítő diszkriminatív teszteket.

A **szűrőtesztek**hez tartozik a *thrombocyta szám* meghatározás, mely része minden vérzékeny beteg kivizsgálásának. A VWB 2B altípusában és „thrombocyta típusú” VWB-ben csökkent lehet. Az alvadási idők közül az *aktivált parciális tromboplastin idő (APTI)* megnyúlt azokban az esetekben, ahol a FVIII szintje csökkent. A mindennapi laboratóriumi diagnosztikában a vérzékenység leggyakrabban használt szűrőtesztje még mindig a *vérzés idő* meghatározás. A jelenleg elfogadott metodika alapján 40 Hgmm nyomás mellett, a betegek alkarján végzik, egyszer használatos, standard méretű sebet ejtő eszközzel (Simplat II vagy Surgicut). A standardizálási próbálkozások ellenére sok kritika érte a módszer szenzitivitását, specificitását (Rodgers, 1990) és igazolták, hogy preoperatív mérése nem alkalmas a műtéti vérvesztesség megítélésére (Lind, 1991; De Caterina 1994; Gewirtz 1996). Kivitelezése erősen függ az asszisztens gyakorlottságától. A betegek rosszul tolerálják, a vizsgálat során keletkezett sebek hegekkel gyógyulnak. Mindezek miatt kerültek előtérbe azok az „in vitro vérzés idő” meghatározási módszerek, melyek alvadásában gátolt teljes vérrel dolgoznak és a nagy nyíróerejű áramlási viszonyok közötti thrombocyta adhéziót és aggregációt modellezik. A

legelterjedtebb ilyen eszköz a Dade Behring cég PFA-100 (Platelet Function Analyzer) készüléke. A gép $5000-6000\text{ s}^{-1}$ nyíróarányt hoz létre oly módon, hogy vákuum segítségével a vért egy kapillárison keresztül felszívja és átáramoltatja egy nitrocellulóz membrán $150\text{ }\mu\text{m}$ nagyságú pórusán. A sérült érfalat úgy modellezzik, hogy a membránt I-es típusú kollagénnel vonják be. A készülékhez két különböző patronrt gyártanak: az egyikben adrenalint, a másikban ADP-t adnak a kollagén mellé további aggregáló anyagként. Eredményként azt az időt adja meg a készülék, ami a nitrocellulóz membránon levő nyílás elzáródásához szükséges (Kundu, 1995). Antitestekkel és peptidekkel végzett gátlási kísérletekkel igazolták, hogy a záródási időt befolyásolja a VWF, a thrombocyták GPIb és GPIIb/IIIa (integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$) receptora. Független a fibrinogén jelenlététől (Kundu, 1996). Csökkenő thrombocytaszám és a haematokrit hatására a záródási idő egyenletesen nő, nem záródik 10 G/l thrombocytaszám és 10% haematokrit alatt (Harrison, 1999). Gyulladásos folyamatokban a VWF szintjének emelkedése miatt a záródási idő szignifikánsan rövidül (Homoncik, 2000 A). A PFA-100 készülékkel kapott záródási idő megnyúlt mindkét patronnal Bernard-Soulier szindrómában és Glanzmann thrombastheniában (Harrison, 1999). Storage pool betegségben és Hermansky-Pudlak szindrómában hosszúak a záródási idők adrenalinral, míg ADP-vel normális vagy megnyúlt értékek is előfordulnak (Harrison, 1999; Kerényi 1999). Normál értékeket kapunk afibrinogenaemiában (Harrison, 1999). A PFA-100 készüléket alkalmasnak találták a VWB szűrésére (Fressinaud, 1998; Cattaneo, 1999) és a desmopressin terápia monitorozására (Fressinaud, 1999). Ugyanakkor 3-

as típusú betegekben a faktorkoncentrátum alkalmazását követően a risztocetin kofaktor aktivitás normalizálódása ellenére a záródási idő hosszú marad, feltehetőleg a hiányzó legnagyobb VWF multimerek, illetve a thrombocyta VWF hiány miatt (Fressinaud, 1999; Meskal, 1999). A PFA-100 95%-os szenzitivitással jelzi az aspirin okozta szerzett thrombocytopathiát (Mammen, 1998). Dózis-függően hosszabbítja a kollagén/adrenalin patronnal kapott záródási időt (Homoncik, 2000 B) normál kollagén/ADP záródási idő mellett. A teoretikus megfontolások ellenére, bár a záródási idő tovább hosszabbodik, ha a beteg aspirin mellett thienopyridin származékot (ticlopidint vagy clopidogrelt) is szed (Kottke-Marchant, 1999), önmagában a thienopyridinek nem mindig okoznak záródási idő megnyúlást. A PFA-100 saját gyakorlati tapasztalataink szerint sem alkalmas a ticlopidin és a clopidogrel hatásának monitorozására. Bólusban adott GPIIb/IIIa gátló abciximab hatására a záródási idő azonnal mérhetetlenül hosszú lesz és a hatás csak 24 óra múlva szűnik meg (Madan, 2001).

Egy másik, nagy nyíróerejű áramlási viszonyokat modellező módszer az O'Brien által leírt filter teszt (O'Brien, 1987). A módszer lényege, hogy 0,1-3,4 μm átmérőjű üvegszálakból álló szűrőn heparinnal illetve citráttal antikoagulált teljes vért áramoltatunk át 40 Hgmm nyomással. A kapilláris méretű réseken átáramló vérben a thrombocyták aktiválódnak, aggregálódnak és az aggregátumok elzárják a filtert. A filteren átjutó cseppeket az első 5 s alatt (1. fázis) illetve a 20-40 s (2. fázis) között felfogjuk, a thrombocytaszámot meghatározzuk, és a kiindulási vérlemezke szám ismeretében a retineálódott thrombocyták mennyiségét meghatározzuk. A

másik jellemző paraméter a záró cseppszám, ami definíció szerint azt a cseppszámot jelenti, amelynél 5 s alatt már csak egy csepp vér jut át a szűrőn. A filter záródásához VWF és a thrombocytamembrán receptorai közül a GPIb illetve a GPIIb/IIIa szükséges (O'Brien, 1998). A filter záródása eltolódik illetve a retenció kisebb VWB-ben, Glanzmann thrombastheniában (Boda, 1996; Pareti 1996) és δ -storage pool betegségben (Cattaneo, 1995). A módszer alkalmas a DDAVP hatásának lemérésére, de a paraméterek nem normalizálódnak faktorkoncentrátum alkalmazását követően 3-as típusú VWB-ben (Pareti, 1998). A két módszer jellemzőit az 1. táblázat foglalja össze.

JELLEMZŐ	PFA-100	FILTERTESZT
Nyíróarány (s^{-1})	5000-6000	nincs adat
Vizsgálati anyag	teljes vér	teljes vér
Adhezív felszín	kollagén	üvegszálak
Aggregáló anyag	ADP vagy adrenalin	nincs
Pórus méret	150 μm	$\approx 5 \mu m$
Jellemző paraméter	záródási idő (s)	záró cseppszám thrombocyta retenció (%)
A zárásban szerepet játszó fehérjék	VWF, GPIb, GPIIb/IIIa	VWF, GPIb, GPIIb/IIIa
Érzékeny fibrinogén jelenlétére	nem	nem
VWB-ben kóros	igen	igen
Alkalmas a terápia monitorozására VWB-ben • DDAVP-vel • faktorkoncentrátummal	• igen • nem	• igen • nem
Aspirin érzékeny	igen (kollagén/adrenalin patron)	nem

1. táblázat: Az O'Brien-féle filterteszt és a PFA-100 jellemzőinek összehasonlítása

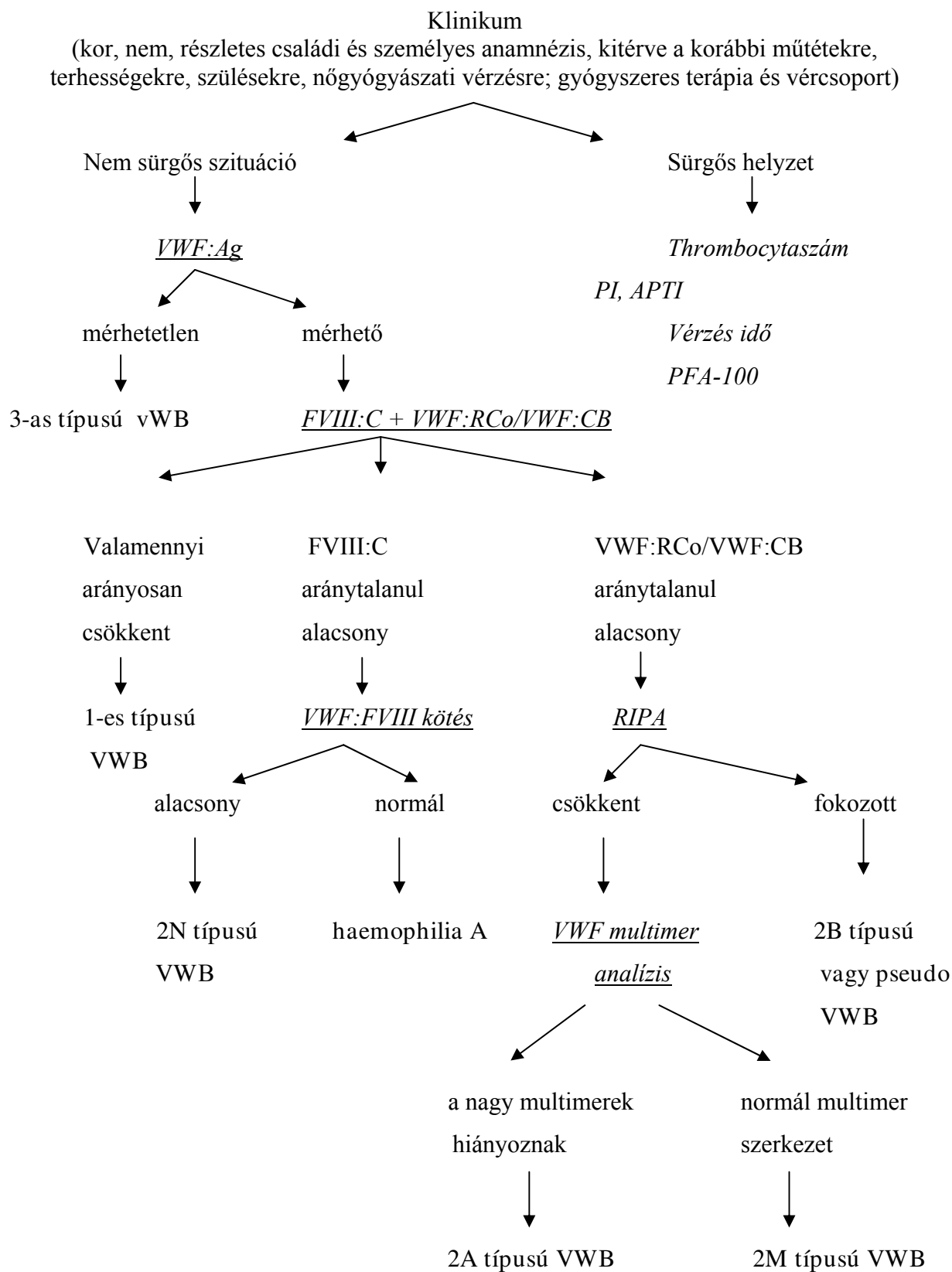
A **specifikus tesztek** közül a VWB diagnosztikájának alapja a *von Willebrand faktor antigén (VWF:Ag)* meghatározás, mely a VWF mennyiségét adja meg. A hagyományos meghatározási mód a Laurell-elektroforézis (Laurell, 1966; Zimmermann 1971). A legnagyobb szenzitivitása az ELISA módszerrel mért VWF:Ag szint mérésnek van (Favaloro, 1999 A), ugyanakkor egyszerűségük,

gyorsaságuk és automatizálhatóságuk miatt az utóbbi években egyre inkább teret nyertek a latex gyöngyökhöz kapcsolt VWF elleni antitestekkel, immunturbidimetriás elven működő VWF:Ag meghatározási módszerek (Veyradier, 1999). A VWB diagnosztikájának másik alapköve a VWF működésének vizsgálata. Erre a risztocetin kofaktor aktivitás (VWF:RCo), a kollagén kötő aktivitás (VWF:CB), illetve a FVIII koaguláns aktivitás (FVIII:C) meghatározása szolgál. A *VWF:RCo* a legelterjedtebb módszer. Azt vizsgálja, hogy a beteg plazmája kontrollhoz képest milyen mértékben agglutinálja 1 mg/ml risztocetin jelenlétében a formalin fixált vagy mosott thrombocytaikat. A módszer idő- és munkaigényes, aggregométert és a módszerben jártas asszisztentst igényel. Legfőbb hátránya azonban rossz reprodukálhatósága (Favaloro, 1999, B). Ezért jelentek meg a jobban standardizálható, ELISA módszeren alapuló risztocetin kofaktor tesztek, melyek a vizsgált plazma VWF tartalmának ELISA lemezhez kötött rekombináns GPIb fragmenthez (Vanhoorelbeke, 2000) illetve glycolicához (Vanhoorelbeke, 2005) való kötődését vizsgálják risztocetin jelenlétében. A *VWF:CB* a másik, kevésbé elterjedt funkcionális teszt, melyet szenzitívebbnek és reprodukálhatóbbnak tartanak a *VWF:RCo* tesztnél (Favarolo, 1999, A). ELISA módszer, mely különösen érzékeny a nagy multimerek jelenlétére (Casonato, 2001). A *FVIII:C aktivitás* APTI-n alapuló meghatározása indirekt módon a VWF mennyiségéről illetve FVIII kötő képességéről tájékoztat. Alacsony a VWF szintjének jelentős csökkenése illetve 2N típusú VWB esetén.

A **diszkriminatív tesztek** közé tartozik a *risztocetin indukálta thrombocyta aggregáció (RIPA)* mely a beteg thrombocytadús plazmájában, a risztocetin különböző koncentrációi (általában 0,5-1,5 mg/ml) hatására bekövetkező vérlemezke agglutinációt vizsgálja. Alacsony VWF aktivitás mellett a RIPA is csökken, de ez a módszer kvantitatív mérésre nem alkalmas. Diagnosztikai jelentősége 2B illetve „thrombocyta típusú” von Willebrand betegségben van, ahol aggregációt kapunk a normál esetben hatástalan, alacsony (0,5-0,6 mg/ml illetve ez alatt) risztocetin koncentrációk mellett. Az altípusok elkülönítésében ugyancsak nagy jelentőségű a *VWF multimer szerkezetének vizsgálata* SDS agaróz gélelektroforézissel. A különböző felbontású gélek lehetővé teszik a nagy (esetleg az ultranagy) multimerek jelenlétének megítélését és a proteolitikus fragmentek vizsgálatát. A *VWF FVIII kötő képességét* ELISA módszerrel vizsgálják (VWF:FVIII), ennek a 2N típusú VWB és a haemophilia A elkülönítésében van jelentősége. A *thrombocyta VWF:Ag, VWF:RCo és VWF multimer analízist* néhány speciális laboratórium végzi. Ennek alapján különíthetők el az 1-es típuson belül a normális vagy csökkent thrombocyta VWF tartalommal járó alcsoportok.

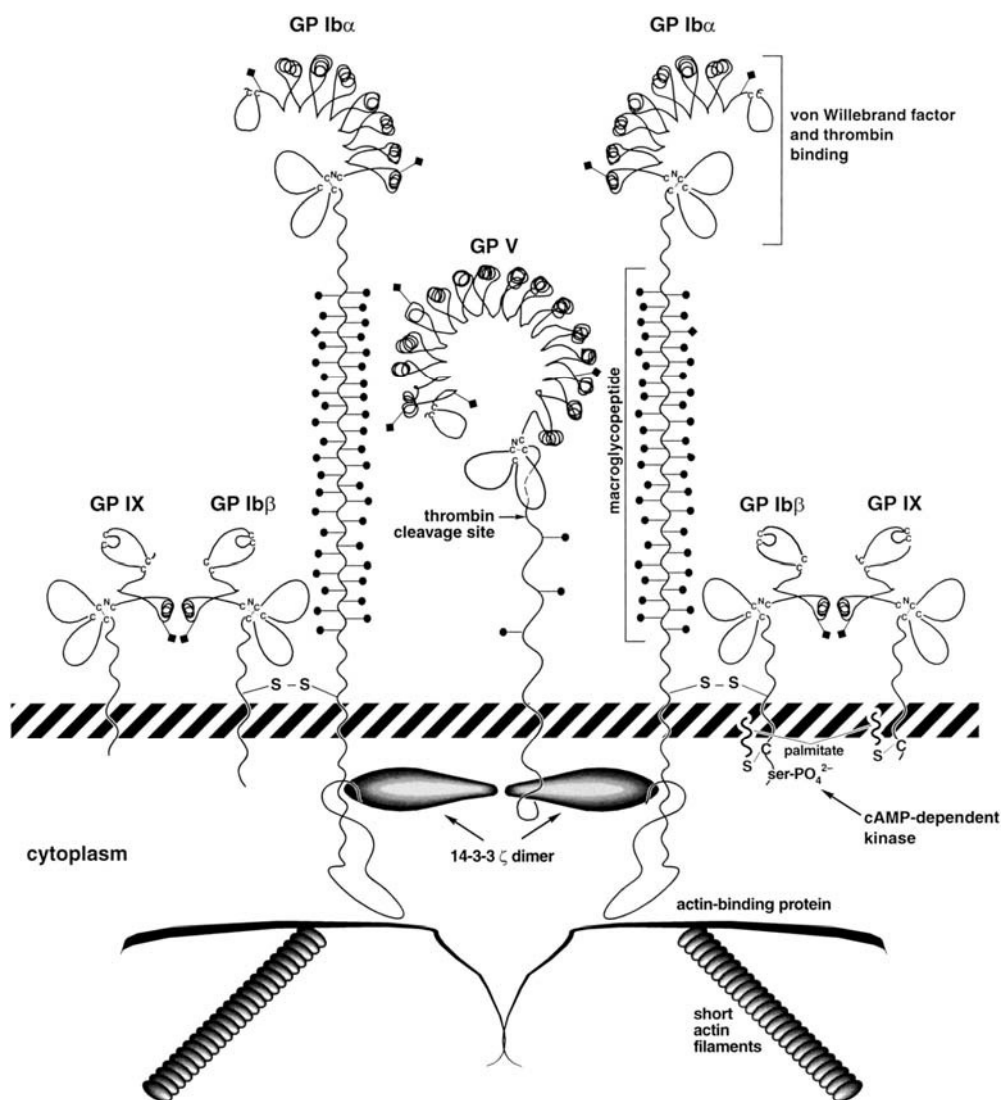
A von Willebrand betegség számos laboratóriumi tesztjét és azok alkalmazásának algoritmusát a 2. ábrán foglaltam össze. 2-es típusú VWB akkor merül fel, ha a funkcionális tesztek (FVIII:C, VWF:RCo, VWF:CB) és a VWF:Ag aránya 0,7 alatt van. A 2B típusú és a pseudo – (vagy „thrombocyta típusú”) VWB között keverékes tesztekkel tudunk differenciálni. 2B típusú VWB esetén a fokozott aggregációs készség a beteg plazmájával átvihető.

2. ábra A von Willebrand betegség diagnosztikája



A GPIb/IX/V komplex szerkezete

A von Willebrand faktor receptora a thrombocyták felszínén a GPIb/IX/V komplex. A komplexet négy transzmembrán glikoprotein alkotja: a GPIb α , a GPIb β , a GPIX és a GPV. A polipeptidek a komplex alkotásában 2:2:2:1 arányban vesznek részt. A GPIb α a VWF és a thrombin receptora, a GPIb β és a GPIX a komplex stabilitásához szükséges. A peptidszintézist követően a teljes komplex létrejön az endoplazmatikus retikulumban percekben belül, majd a Golgiban poszttranszlációs módosításokon, főként glikoziláción megy át. GPIb β és GPIX hiányában a GPIb α proteolízise jelentősen fokozódik (Dong, 1998). A GPV nem szükséges a többi fehérje expressziójához, és a GPV is megfelelő számban megjelenik transzfektált sejteken a komplex többi eleme nélkül, bár csökkent számban (Li, 1995). Valamennyi fehérje leucinban gazdag ismétlődő szekvenciákat tartalmaz változó számban. A GPIb α és a GPIb β között diszulfid híd biztosítja a kapcsolatot, míg a GPIX és V nem kovalens kötéssel kapcsolódik a komplex többi eleméhez. A GPIb/IX/V komplex sematikus vázlatát mutatja a 3. ábra.



3. ábra: A GPIb/IX/V komplex szerkezete. Forrás: Lopez, 1998.

Az egyes glikoproteinek szerkezete jól ismert (Clemetson, 1997; Lopez, 1998). A **GPIb α** (135 kD, 610 aminosav) N terminális globuláris doménja ív alakban 8 leucinban gazdag ismétlődő szekvenciát tartalmaz (Huizinga, 2002) N- és C terminális oldalszekvenciákkal, a C-terminális részén egy diszulfid hidakkal összetartott dupla hurokkal. Ezt egy 19 aminosavból álló, negatív töltésű, aszpartátban és glutamátban gazdag szekvencia követi három szulfatált tirozinnal, ez a régió a thrombin kötőhelye. Innen a membránig terjedő makroglikopeptid

régió hexaszacharid oldalláncokat tartalmaz minden 3. vagy 4. aminosavon. Ez a peptidszakasz a globuláris N terminális részt kb. 45 nm-re kiemeli a membrán fölé (Fox, 1988). A szénhidrát oldalláncok eltávolítása a molekula „összeesését” eredményezi, a VWF-t kötő N-terminális rész ekkor csak kb. 15 nm-re emelkedik a sejtmembrán fölé (Moshfegh, 1998). Bár a VWF kötő képességét megtartja, a receptor kevésbé hozzáférhetővé válik ligandjai számára. A risztocetin illetve botrocetin indukálta thrombocita aggregációhoz, illetve áramló vérben a thrombocita adhézió létrejöttéhez a makroglikopeptid rész épsége és megfelelő glikolizáltsága szükséges (Moshfegh, 1998; Li, 2002). A C terminális citoplazmatikus rész részint aktin kötő filamentumokon keresztül a thrombocita cytoskeletonhoz kapcsolódik, részint pedig a 14-3-3 jelű proteinhez, mely a sejten belüli szignalizációs folyamatok összehangolásában vesz részt.

A **GPIb β** (25 kD, 181 aminosav) és a **GPIX** (22 kD, 160 aminosav) hasonló szerkezetű a GPIb α -hoz, de csupán egy leucinban gazdag szekvenciát tartalmaz és hiányzik a makroglikopeptid régió. A **GPV** (82 kD, 544 aminosav) 15 leucinban gazdag szekvenciát tartalmaz patkó alakú elrendeződésben. A fehérje pontos feladata nem ismert, úgy tűnik, hogy a vérlemezke aktiváció negatív regulátoraként szerepel (Ramakrishnan, 1999). Egy thrombin hasítóhelyet tartalmaz. GPV hiányos egerekben illetve a fehérje proteolízisét követően fokozott a thrombin indukálta thrombocita aggregáció, feltehetőleg azért, hogy a GPV hasításával szabaddá válik a GPIb thrombin kötő helye. Ez a thrombosis készség fokozódásával jár együtt (Ni, 2001).

A Bernard-Soulier szindróma

A GPIIb/IX/V komplex hiánya vagy funkcionális defektusa következtében jön létre az első leírójáról Bernard-Soulier szindrómának (BSS) elnevezett kórkép (Bernard, 1948). A betegség klinikailag megkülönböztethetetlen a VWB illetve a vérlemezke működés egyéb zavarai által okozott vérzékenységtől: nyálkahártya és bőrvérzések jellemzőek (orrvérzés, fogínyvérzés, ecchymosisok, menometrorrhagia, gastrointestinalis vérzés). Gyakori a traumát, műtétet, szülést követően jelentkező vérzékes komplikáció. A Bernard-Soulier kór a von Willebrand betegségnél jóval ritkábban fordul elő, prevalenciája kisebb, mint 1/1 000 000 az irodalomban ismertetett esetek alapján (Lopez, 1998). Öröklődése többnyire autoszomális recesszív, autoszomális domináns öröklődés menetet csupán egy családban írtak le (Miller, 1992). A tünetmentes vagy enyhe tünetekkel járó, autoszomális dominánsan öröklődő macrothrombocytopeniák egy részének hátterében heterozygota BSS mutáció áll (Savoia, 2001). A BSS gyanúját a változó mértékű, többnyire mérsékelt thrombocytopenia, a vérkenetben észlelt óriás thrombocyták vethetik fel, a vérlemezkék mérete a 20-30 μm -t is eléri. A thrombocytopenia miatt nem egyszer a kórképet immun thrombocytopeniás purpurának tartják és a betegek ennek megfelelő kezelésben részesülnek. A diagnózist a risztocetin indukálta thrombocyta aggregáció hiánya erősíti meg, mely a von Willebrand betegséggel ellentétben normál plazmával nem korrigálható. Az ADP, adrenalin, kollagén és arachidonsav indukálta thrombocyta aggregáció

normális, a trombin indukálta aggregáció csökkent. A vérzés idő megnyúlt. A diagnózis a komplex fehérjének áramlási citometriával vagy immunoblottal igazolt hiánya vagy csökkent expressziója alapján igazolható. A vérzések kezelésének alapja a thrombocyta transzfúzió, mely alloantitestek kialakulásának veszélyével jár. A desmopressin egyes esetekben hatékony és beszámoltak a rekombináns aktivált FVII sikeres alkalmazásáról is (Peters 1998, Almeida 2003). Kiegészítő kezelésként fibrinolízis gátlók és a menorrhagia csökkentésére orális fogamzásgátlók alkalmazása jön szóba. Angiodysplasiás eredetű gastrointestinalis vérzés eredményes octreotid kezelését ismertették (Kaya, 2005). Súlyos Bernard-Soulier szindrómában két esetben sikeres csontvelőtranszplatációról is beszámoltak (Locatelli, 2003).

A GPIb/IX/V komplex genetikája

A GPIb α génje a 17-es kromoszóma rövid karján, a GPIb β génje a 22-es kromoszóma hosszú karján, a GPIX és a GPV génje a 3-as kromoszóma hosszú karján helyezkedik el. A gének kicsik és szerkezetük egyszerű (Wenger 1988, Hickey 1993, Lanza 1993, Yagi 1994). A GPIb β kivételével valamennyi gén kódoló szekvenciája egy exonon belül található, a GPIb β egy intront tartalmaz 10 bázispárra a kódoló szekvencia kezdetétől. Bernard-Soulier kórt a GPIb α -t a GPIb β -t és a GPIX-t érintő mutációk okoznak, nem ismert olyan beteg, akinél a GPV defektusa igazolódott volna. Az ismert mutációk különböző mechanizmussal eredményezik a komplex csökkent expresszióját illetve működését: 1) mutációk és

deléciók, melyek a transzmembrán szekvencia előtt a fehérjeszintézis korai befejezését okozzák, 2) a fehérjék szerkezetét érintő mutációk, melyek csökkent funkcióval illetve a komplex csökkent expressziójával járnak, 3) valamely gén promoter régióját érintő és csökkent transzkripciót okozó mutáció (Clemetson, 1997).

CÉLKITŰZÉSEK

1, A nagy nyíróerejű áramlási viszonyokkal dolgozó módszerek hatékonyságának megítélése saját beteganyagon a von Willebrand betegség szűrésében és diagnosztikájában.

- A, Az O'Brien filter teszt vizsgálata a VWB altípusaiban.
- B, A PFA-100 vizsgálata a VWB altípusaiban.
- C, A két teszt összehasonlítása.
- D, A nagy nyíróerejű áramlási módszerek összehasonlítása a hagyományos vérzés idő meghatározással.

2, Egy családvizsgálat kapcsán felhívni a figyelmet arra, hogy a reuma faktor különböző reagensek esetén eltérő mértékben zavarja a VWF:Ag szint immunturbidimetriás módszerrel történő meghatározását.

3, Egy Bernard-Soulier szindrómás beteg vizsgálata, a genetikai háttér tisztázása.

- A, A mutáció valószínű lokalizációjának meghatározása a GPIIb/IX/V komplex egyes elemeinek mennyiségi vizsgálatával.
- B, A GPIIb/IX/V komplex génjeinek PCR amplifikációja és szekvenálása.
- C, Restrikciós enzim analízissel a homo- vagy heterozygota állapot megállapítása.

BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1, A nagy nyíróerejű áramlási módszerek alkalmazhatóságának vizsgálata a von Willebrand betegség diagnosztikájában

Betegek és kontroll személyek: Harminc, korábban diagnosztizált, von Willebrand betegségben szenvedő betegünket vontuk be a vizsgálatba, húsz nőt és tíz férfit. Átlagéletkoruk $34,5 \pm 11$ (18 — 60) év volt. A VWB diagnózisa és klasszifikációja személyes és családi anamnesztikus adatokon, vérzés idő, VWF:Ag, VWF:RCo, APTI, FVIII:C meghatározásán, risztomycin indukálta thrombocytá-aggregációs vizsgálatokon (RIPA) és a multimer szerkezet SDS agaróz gélelektroforézissel történő vizsgálatán alapult. Harminc betegünk közül huszonkettőnek volt 1-es, kettőnek 2A, háromnak 2B és háromnak 3-as típusú betegsége, Sadler kritériumai alapján (Sadler, 1994). Az 1-es típusú vWD-ben szenvedő betegeknel a tünetek súlyossága alapján megkülönböztettünk „enyhe” és „súlyos” eseteket: a vérzékenységet akkor minősítettük enyhének, ha az anamnézisben nem szerepelt hospitalizációt, transzfúziót, VWF koncentrátum adását igénylő nagy vérzés. A kontroll csoportot húsz egészséges, önként vállalkozó személy (16 nő és 4 férfi) alkotta, átlagéletkoruk $32,1 \pm 8,5$ (23 — 50) év volt.

Anyagok és módszerek: A *kvantitatív vérkép* vizsgálata Sysmex K-4500 automatával történt (Toa Medical Electronics Co., LTD. Kobe, Japan). A *vérzés idő* meghatározást két, a vizsgálatban jártas asszisztensnő kivitelezte Simplate II R

egyszer használatos eszközzel (Organon Teknika, Boxtel, Hollandia). Az *APTI* mérése Platelin LS (Organon Teknika) reagenssel, Coag-a-Mate MTX (Organon Teknika) készüléken történt. A *VWF:Ag* meghatározás két poliklonális antitesttel (DAKO, Dánia) ELISA módszer szerint történt. A *VWF:RCO* aktivitást Chrono-Log 810 aggregométerben (Havertown, PA), a Ristocetin Cofactor Assay-vel (Helena Laboratories, Beaumont, Texas) határoztuk meg. A *FVIII:C* aktivitás mérése az *APTI* idő gyári hiányplazmával (Organon Teknika) történő meghatározásán alapult. A *thrombocyta-aggregációt* Chrono-Log 660 aggregométerben (Havertown, PA), 37 °C-on thrombocyta dús plazmában kiviteleztek, ADP-t (5µM, Aggristin Plus Kit, Reanal), adrenalin (40 µM, Aggristin Plus Kit, Reanal), kollagént (1µg/ml, Kollagenreagens Horm, NYCOMED, München, Németország) és arachidonsavat (1 µM, Sigma, St.Louis, MO) használva aggregáló anyagként. A thrombocyta dús plazmát citráttal (3.8 %) antikoagulált teljes vér 1000/min fordulatszámon, 20 percig tartó centrifugálásával nyertük. A RIPA vizsgálata 0.5, 0.6, 1.0, 1.2 és 1.5 mg/ml végkoncentrációjú risztomycinnel (Aggristin Kit, Reanal) történt. A *VWF multimer szerkezetét* SDS agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk.

Az *O'Brien-féle filtertesztet* az „Irodalmi áttekintés”-ben leírt módszer szerint kiviteleztek. Röviden: 5 ml heparinnal (Sodium Heparin Vacutainer cső, 7 ml, 143 I.U., Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) és citráttal (3.8%) antikoagulált teljes vért áramoltattunk át egy üvegszálakból álló szűrőn 40 Hgmm nyomással. A szűrőn átjutó cseppek számát egy érzékelő segítségével a műszer kijelezte és 5 másodpercenként írásban rögzítettük. Az első 5 másodpercben és a 20.-40.

másodperc között a szűrőn átjutott cseppeket felfogtuk, meghatároztuk a thrombocytaszámot és a kiindulási vérlemezkeszám ismeretében a visszatartott thrombocyta mennyiségét kiszámoltuk. A módszert a záró cseppszámmal (definíció szerint 5 másodperc alatt legfeljebb egy csepp jut át a filteren) és a százalékbán megadott thrombocyta retencióval jellemeztük.

A *PFA-100 (Platelet Function Analyzer*, Dade International Inc., Miami, FL, USA) működését az „Irodalmi áttekintés”-ben részleteztem. A vizsgálathoz 5 ml-es Vacutainer csőbe vett, citráttal (0,5 ml 105 mmol/l-es pufferolt Na-citrát) antikoagulált vért (800 µl) használtunk. A vizsgálat a vérvételtől számított két órán belül megtörtént. Az eredményt a záródási idővel (ZI) adtuk meg.

Statisztikai értékelés: Az eredményeket átlag $\pm$ SD-vel adtuk meg. A referencia tartományokat átlag $\pm$ 2 SD alapján számoltuk. A vérzés idő normál tartományának a gyártó által ajánlott 2,5-9,5 min értéket fogadtuk el. A *szenzitivitást* annak alapján számoltuk, hogy a betegek hány százalékában volt valóban kóros a teszt (szenzitivitás % = valóban pozitívak x 100 / valóban pozitívak + fals negatívak). A *specificitáson* azt értettük, hogy a kontroll személyek hány százalékánál volt valóban normál a teszt eredmény (specificitás % = valódi negatívak x 100/ valódi negatívak + fals pozitívak). A pozitív prediktív érték azt jelentette, hogy a kóros teszteredmény adók hány százaléka volt valóban beteg (pozitív prediktív érték % = valóban pozitív x 100/ valóban pozitív + fals pozitív). A negatív prediktív értéket annak alapján számoltuk, hogy a normál eredményt adók hány százaléka volt

valóban egészséges (negatív prediktív érték % = valóban negatív x 100/ valóban negatív + fals negatív).

2, A reuma faktor zavaró hatása az immunturbidimetriás elven működő VWF:Ag meghatározásra

J.K. 53 éves férfi betegünk anamnézisében gyermekkora óta szerepel vérzékenység. Orrvérzések és foghúzást követő erős vérzés miatt többször részesült transzfúzióban. Leánya és fia (J.I. és J.L.) szintén vérzékenyek (szülést követő vérzés, orrvérzések). Alacsony VWF:Ag és VWF:RCo szintek alapján betegségüket súlyos 1-es típusú VWB-nek tartottuk. A multimer analízist a nagyon alacsony antigén szintek miatt nem tudtuk elvégezni. A diagnózist később újabb laboratóriumi adatok és genetikai vizsgálat alapján 2M Vicenza típusra módosítottuk. A család mindhárom tagjánál a VWF génjének 27-es exonjában egy G3864A mutációt találtunk (Bodó, 1999). Ez a mutáció egy R1205H cserét eredményez a VWF aminosav sorrendjében. Olasz és német 2M Vicenza típusú családoknál írták le (Schneppenheim, 2000; Casonato, 2002). 2004 márciusában egy kontroll vizsgálat során párhuzamos VWF:Ag meghatározás történt a Debreceni Egyetem két laboratóriumában (Klinikai Kutató Központ és II. Belklinika Haemostasis Laboratórium). Mindkét laboratóriumban immunturbidimetriás elven működő tesztet használnak, de az egyikben az STA Liatest VWF-t (Diagnostica Stago, Asnieres, Franciaország), a másikban IL Test VWF-t (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA). A tesztek lényege, hogy a betegek plazmáját VWF

elleni poliklonális antitesttel fedett latex mikropartikulumokhoz adjuk. A bekövetkező agglutináció mértéke a mintában levő VWF mennyiségével arányos. Referenciaként meghatároztuk a *VWF:Ag szintet ELISA módszerrel*: az ELISA lemezt egy éjszakán át fedtük 4 °C-on VWF elleni poliklonális antitesttel (Dako, Glostrup, Dánia, végkoncentráció: 5 µg/ml). Háromszori TBS - 0,1% Tween20 (TBST) mosást követően a lemezt 2 órán át blokkoltuk szobahőmérsékleten 3%-os tejporral. Ismételt mosás után a plazmaminták 40x hígítását vittük a lemezre és feles hígítási sort készítettünk. A lemezt 1,5 órán át inkubáltuk 37 °C-on, majd ismételt mosás után 1/3000 hígított anti-VWF-HRP antitesttel (Dako) 1 órán át szobahőmérsékleten. Az eredményt OPD-vel hívtuk elő. A VWF:Ag szintet 25 egészséges kontroll személy plazmájából készült referencia görbe alapján számoltuk. A *risztocetin kofaktor aktivitás* meghatározása részben hagyományos módon, liofilizált vérlemezkék agglutinációjával történt Chrono-Log 810 aggregométerben (Havertown, PA), a Ristocetin Cofactor Assay-vel (Helena Laboratories, Beaumont, Texas). Másrészt elvégeztük a *VWF:RCo meghatározást egy új ELISA módszerrel*, mely a plazma VWF glycolicához való kötődését méri risztocetin jelenlétében (Vanhoorelbeke, 2005). Röviden: az ELISA lemezt egy éjszakán át 24B3 jelű, GPIIb/IIIa elleni monoklonális antitesttel inkubáltuk. A lemez blokkolása 3%-os tejporral történt két órán át szobahőmérsékleten. Mosást követően a lemezt glycolicinnel fedtük oly módon, hogy TBST-vel felére hígított thrombocytaszegény plazmával inkubáltuk 1,5 órán át 37 °C-on. Újabb mosás után az 1/32-1/1024 hígított mintákat a lemezre vittük. A hígítási sor úgy készült, hogy

valamennyi minta 1 mg/ml végkoncentrációjú risztocetint (Abp, New Jersey) tartalmazzon. A mintákat 1 órán át inkubáltuk 37 °C-on és 12x mosást követően (TBST) a glycolalicinhez kötődött VWF-t az antigén ELISA-nál leírt módon detektáltuk. A *kollagén kötő aktivitás (VWF:CB)* meghatározásához a lemezt humán III-as típusú kollagénnel fedtük (Sigma, St.Louis, MO). A lemezeket 3% tejporral (PBS-ben) blokkoltuk, majd a minták feles hígítási sorát a lemezre vittük (10x hígítással kezdve). 1,5 órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd mosás után a kötött VWF mennyiségét az előző ELISA-knál leírt módon meghatároztuk. A *reuma faktor* (RF) meghatározását a III. Belklinika Immunológiai Laboratóriuma végezte turbidimetriás módszerrel.

3, A Bernard-Soulier szindrómás beteg vizsgálata

Egy 38 éves belga nőbeteg vizsgálatát végeztük el.

A beteg klinikai kivizsgálása Brüsszelben történt (Hopital Erasme, Université Libre de Bruxelles). Kezelőorvosai dr. Oliver Pradier és dr. Walter Wijns voltak.

Klinikai adatok: A betegség vezető tünete a menarchetól kezdve jelentkező, vashiány anaemiát is okozó kifejezett meno–metrorrhagia volt. 10 esztendővel vizsgálatainkat megelőzően erős vérzés miatt curettage történt, ekkor transzfúzióban is részesült. Ezt követően hormonkezelés indult, mely a nőgyógyászati vérzést csökkentette. Kisebb sérülések után elhúzódó vérzéseket észlelt, bőrén kis traumára suffusiók jelentkeztek. Fogínyvérzések előfordultak, korábban foghúzást követően is vérzett. 1972-ben szövődménymentes

appendectomy történt. 1978-ban, egy alkalommal szült, a szülést követően erős vérzés jelentkezett. 1986-ban petefészek cysta eltávolítást követően haematoma alakult ki. A beteg szülei és 7 testvére vérzékenység szempontjából panaszmentesek voltak. A családon belül rokonházasságról a beteg nem tudott. Fia vérzékeny, három évesen tonsillectomiát követően transzfúzióra szorult. A fiú diagnózisa tisztázatlan volt, részletes laboratóriumi eredmények nem álltak rendelkezésre. A beteg egészséges férje haemostaseológiai és genetikai vizsgálatot nem vállalt.

A beteg *korábbi laboratóriumi adataiból* ismert volt thrombocytopeniája (44 - 82 G/l, referencia tartomány: 160-400 G/l). A vérkenetben óriás thrombocyták voltak megfigyelhetők. A prothrombin és aktivált parciális tromboplastin idő normál tartományba esett. A vérzés idő megnyúlt, 20 perc feletti volt. A von Willebrand faktor antigén szint és ristocetin kofaktor aktivitás mérése normál eredményt adott (VWF:Ag: 106%, referencia tartomány: 50-200%; VWF:RCo: 128% referencia tartomány: 50-200%). A DDAVP normalizálta a vérzés időt (> 20 min vs 5 min) és klinikailag is effektívnek bizonyult.

Thrombocyta aggregáció thrombocyta dús plazmában történt PAP-4 aggregométeren (Bio/Data Corporation, Hatboro, PA). A következő aggregáló anyagokat használtuk: ADP (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) végkoncentráció: 5 μ M, referencia tartomány: 64-100%, Horm Collagen (Nycomed, München, Németország) végkoncentráció: 2,5 μ g/ml, referencia tartomány: 79-100%, ristocetin (Paesel-Lorei, Duisburg, Németország) végkoncentráció: 1,2 mg/ml, referencia tartomány: 84-100%.

PFA-100 vizsgálat a fentiekben részletezett módon történt kollagén/adrenalin és kollagén/ADP patronokkal. A záródási idők helyi normál értéke 73-181 s volt a kollagén/adrenalin és 58-142 s a kollagén/ADP patronokkal.

A GPIb/IX/V komplex fehérjének a thrombocytamembrán felszínén történő azonosításához a következő *antitesteket* használtuk:

Anti-GPIb α :

26D1 (Laboratory for Thrombosis Research, Kortrijk, Belgium)

27C11 (Laboratory for Thrombosis Research, Kortrijk, Belgium)

SZ-2 (Immunotech, Marseille, Franciaország)

HIP-1 (Pharmingen, San Diego, CA)

Anti-GPIb β :

RAM-1 (patkány poliklonális antitest, Dr. F. Lanza ajándéka, INSERM U.311 Strasbourg, Franciaország)

nyúl poliklonális antitest (Dr. S. Shapiro ajándéka, Cardeza Foundation, Philadelphia, PA)

Anti-GPIX:

ALMA-16 (Dr. F. Lanza ajándéka)

BEB-1 (Dr. J. Kelton ajándéka, McMaster University, Ontario, Kanada)

BL-H6 (Sanbio B. V., Uden, Hollandia)

SZ-1 (Immunotech, Marseille, Franciaország)

Anti-GPV:

SW16 (Dr. von dem Borne ajándéka CLB, Amsterdam,
Hollandia)

V1 (Dr. F. Lanza ajándéka)

Anti-GPIIb/IIIa

Anti-CD61PerCP (clone RUU-PL 7F12) (Beckton Dickinson, San
Jose, CA)

Anti-thrombinreceptor (PAR-1)

SPAN12 (Immunotech)

WEDE15 (Immunotech)

Az áramlási citometriás méréseket Jean-Pierre Delville (Laboratoire D'Hematologie, Hopital Erasme, Université Libre de Bruxelles) végezte a közleményben részletezett metodika szerint Facscalibur (Beckton Dickinson) készüléken. A mérések thrombocytadús plazmán a 26D1, 27C11 (GPIb α), RAM-1 (GPIb β), BEB-1, ALMA-16 (GPIX), SW16 és V1 (GPV) jelű antitestekkel, teljes vérben az SZ2 és HIP1 (GPIb α), SZ1 (GPIX) és SPAN12, WEDE 15 (PAR-1) antitestekkel történtek. A GPIb/IX/V komplex egyes elemeinek mennyiségi meghatározását Cytoquant CD42 Quantification kittel (Biocythex, Marseille, Franciaország) végezték. Az ADP és TRAP indukálta thrombocyta aktiváció áramlási citometriás vizsgálatára PAC-1 FITC (Beckton Dickinson), anti-CD62p PE (Beckton

Dickinson) és anti-Fibrinogen FITC (Dako, Glostrup, Dánia) antitesteket használtak.

Vérlemezke lizátum készítése és Western blot analízis:

Vérvételhez anticoagulánsként ACD-t használtunk (1.5 ml ACD/10 ml vér). A mintákat 1000-es fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk, majd a leszívott thrombocytadús plazmát (PRP) háromszor mostuk 10% ACD-t tartalmazó PBS-ben. Ezt követően a mosott PRP-t pufferben (0,34 M Tris-HCl, 39% glycerol, 7,8% SDS) reszuspendáltuk úgy, hogy thrombocytaszám 5×10^8 /ml legyen. 20 μ l thrombocyta lizátumot nem redukáló (0,34 M Tris-HCl, 39% glycerol, 7,8% SDS, 0,01% brómfenolkék) és redukáló (+ 5% merkaptóethanol) pufferben 7.5% és 10%-os SDS-poliakrilamid gélen elektroforetizáltunk. A fehérjéket nitrocellulóz membránra (Schleicher & Schuell, Dassel, Németország) vittük át és 5%-os tejporral (PBS-ben) blokkoltuk egy éjszakán át. A membránokat 0,05% Tween 20-t tartalmazó PBS-sel mostuk, majd szobahőmérsékleten 1,5 órán át inkubáltuk a 27C11 jelű GPIb α monoklonális antitesttel (5 μ g/ml), valamint nyúlból származó, 300x hígított poliklonális GPIb β elleni antitesttel. A BL-H6 jelű, GPIX elleni monoklonális antitest 100x hígításával 16 órán át inkubáltuk a membránokat 4 °C-on. Az antitestek hígítására PBS - 0,05% Tween 20-t használtunk. Háromszori mosást követően a membránokat HRP jelzett egér-Ig (1/10000), illetve nyúl-Ig (1/5000) elleni poliklonális antitesttel inkubáltuk 1,5 órán át szobahőmérsékleten. Az eredményt ECL Western blot reagenssel (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Anglia) detektáltuk.

Genomiális DNS szeparálás

Genomiális DNS-t a QIAamp DNA Blood Midi Kit-tel (QIAGEN, Westburg, Hilden, Németország) szeparáltuk, a gyártó előírásainak megfelelően. Röviden: 2 ml, EDTA-val antikoagulált teljes vérhez QIAGEN proteázt és lízis puffert adtunk, majd az elegyet 70°C-on inkubáltuk 10 percen át. A lizátumból a DNS-t 2 ml tiszta etilalkohollal kicsaptuk majd az oldatot QIAamp Midi oszlopra vittük és 3000-es fordulatszámon (1850xg) 3 percen át centrifugáltuk. Két mosási és centrifugálási (5000-es fordulatszám, 4500xg) lépést követően az oszlopról a DNS-t pufferrel eluáltuk és a DNS koncentrációt az oldat 260 nm-en mért abszorbanciája alapján meghatároztuk.

PCR amplifikáció

A GPIb α , a GPIb β és a GPIX amplifikációja az irodalomban korábban leírt primerekkel történt (Noris, 1998, Kenny 1999, 2. táblázat).

Primerek	Számozás	Szekvencia
GPIb α (Noris, 1998)	(Wenger, 1988)	
GPIb α -1	534-554	5'CTCATGCCTCTCCTCCTCTTG3'
GPIb α -2	836-817	5'TAGATCCAGGGTCCCCAGCA3'
GPIb α -3	784-803	5'TCACCAAGCTCCAGGTCGAT3'
GPIb α -4	1126-1107	5'TCTTGGAGGAGAAGGGTGTC3'
GPIb α -5	1059-1079	5'AACTTGACTGAGCTCCCCGCT3'
GPIb α -6	1397-1377	5'ACCTTCATCACCAAGGGTGGG3'
GPIb α -7	1322-1340	5'GCAGTGTGACAATTCAGAC3'
GPIb α -8	1655-1637	5'GGAGAATGTGATGGATTCC3'

GPIb α -9	1587-1608	5'GAGCAGACCACATTCCCACCTA3'
GPIb α -10	1961-1938	5'TGGCTGATCAAGTTCAGGGATGGT3'
GPIb α -11	1861-1880	5'CCACAAGCCTGATCACTCCA3'
GPIb α -12	2192-2173	5'TGTGGTTTGTGTGGCTGTGG3'
GPIb α -13	2131-2151	5'TGAAACCACAGGCCCTGGACT3'
GPIb α -14	2466-2446	5'ATAGGAGAGCCCACAGGCTCT3'
GPIb β (Kenny, 1999)	(Lopez, 1998 Proc.)	
GPIb β -1	8-30	5'TGCCGTCTTCTCGCCATGGGCTC3'
GPIb β -2	791-767	5'AGGTGGGGTGGGTCTGAGAGATTGG3'
GPIX (Noris, 1998)	(EMBL)	
GPIX-1	1581-1602	5'CCCTGAGGATCGGTCCAGGCTG3'
GPIX-2	1749-1728	5'CAGCCCCATGGTTTCCAGGGCG3'
GPIX-3	1664-1663	5'CCCTGTTCTGCTCTGGGCC3'
GPIX-4	1926-1907	5'GAGGCTGCAGTCACAGTGCC3'
GPIX-5	1887-1906	5'CGATGTGACGCAGAACCCCT3'
GPIX-6	2230-2212	5'TGCCTCAGGGACTGGCCCC3'

2. táblázat: A GPIB/IX komplex génjeinek PCR amplifikációjához használt primerek.

A GPIX amplifikációja a következő módon történt: 50 μ l reakcióelegy, mely 1 μ g genomiális DNS-t, 20 pmol primert, 0,2 mM dNTP-t, 1x PCR puffert (20mM Tris-HCl, pH 8,4; 50mM KCl) és 0.75 mM MgCl₂-t tartalmaz. A mintákat 94 °C-on 10 percig inkubáltuk, majd 2E *Taq* DNS polimerázt (GIBCO, Life Technologies,

Paisley, Skócia) adtunk hozzá. Ezt 35 ciklus követte: 1 perc 94 °C-on, 1,5 perc 64 °C-on, 1 perc 72 °C-on és a végén 10 perc elongációs idő. A GPIb α amplifikációjához a MgCl₂ koncentrációkat és a kapcsolódási hőmérsékleteket változtattuk a reakció optimalizálása során (3. táblázat).

Primer párok	Kapcsolódási hőmérséklet (°C)	MgCl ₂ koncentráció (mM)
GPIb α -1 GPIb α -2	60	1,25
GPIb α -3 GPIb α -4	60	1,25
GPIb α -5 GPIb α -6	62	1,25
GPIb α -7 GPIb α -8	56	1,5
GPIb α -9 GPIb α -10	62	1,25
GPIb α -11 GPIb α -12	60	1,25
GPIb α -13 GPIb α -14	62	1,5

3. táblázat: A GPIb α amplifikációjához használt kapcsolódási hőmérsékletek és MgCl₂ koncentrációk.

A GPIb β PCR amplifikációja 2 E *Taq* polimerázzal történt. A reakcióelegy 1 μ g genomiális DNS-t, 30 pmol primert, 0,2 mM dNTP-t, 2 mM MgCl₂-t, 5% DMSO-t tartalmazott 50 μ l PCR pufferben. 10 perces inkubálást 94 °C-on 35 ciklus követett: 1 perc 94 °C, 1 perc 70 °C, 1 perc 72 °C. Az amplifikációt 10 perces elongáció zárta le 72 °C-on.

A PCR termékeket pCR4-TOPO vektorba ligáltuk (TOPO™ TA Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen BV, Groningen, Hollandia) és kithez tartozó kompetens TOP10 sejtek transzformációjával és tenyésztésével amplifikáltuk. A plazmid DNS-t QIAGEN Plasmid Purification Kit segítségével tisztítottuk.

DNS szekvenálás

A DNS szekvenálás részben manuális úton történt T7 szekvenáló kit segítségével (Pharmacia Biotech, Roosendaal, Hollandia) BioRad készüléken (BioRad, Hercules, USA), részben ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing kittel (PE Applied Biosystems, Warrington, Anglia) ABI PRISM 310 szekvenátoron.

Restrikciós enzim analízis

Restrikciós enzim analízissel a beteg és gyermekének vizsgálatára nyílt lehetőség.

A GPIX 3-4 PCR termékeket *Fnu*4H1 (New England Biolabs, Hitchin, Anglia) restrikciós enzimmal emésztettük és az eredményt agaróz gélen értékeltük.

EREDMÉNYEK

1. A nagy nyíróerejű áramlási módszerekkel kapott eredmények:

Harminc, ismerten von Willebrand kóros betegünk eredményeit a 4. és 5. táblázat foglalja össze. Klinikailag az 1. típusú betegek közül tizenháromnak voltak enyhe, kilencnek súlyos vérzékenységre utaló tünetei. Nyolc betegünk valamelyik variáns típusba tartozott, valamennyien súlyosan vérzékenyek voltak. A vizsgált betegek hemoglobin és fehérvérsejt szám értéke a normális tartományba esett, csupán egy 2B típusú betegségben szenvedő betegnél (Á.E.) észleltünk thrombocytopeniát (20 G/l).

Vérzés idő: Az enyhén vérzékeny 1. típusú betegek közül kettőnek (2/13, 15,4%) volt megnyúlt (>9,5 perc) a vérzés-ideje, a leghosszabb vérzés-idő 11,5 perc volt. Tizenegy esetben (11/13, 84,6%) normális eredményt kaptunk. Kilenc súlyosan vérzékeny 1. típusú betegünk közül hétnek (77,7%) volt a vérzés ideje $\geq 9,5$ perc, közülük kettőnek 20 perc feletti. A 2A és a 3-as típusba tartozó betegeinknél valamennyi esetben 20 perc feletti vérzés-időt észleltünk, míg 2B típusban a vérzés ideje csak annak a betegnek (Á.E.) volt jelentősen megnyúlt, akinek a thrombocytaszáma igen kicsi (20 G/l) volt. A normális thrombocytaszámmal rendelkező, klinikailag súlyos tünetekkel bíró másik két beteg esetében a vérzés-idő csak mérsékelten hosszabbodott illetve normális volt. A fentiek alapján valamennyi beteg eredményét figyelembe véve a vérzés idő meghatározás szenzitivitása 50%-nak adódott.

VIZSGÁLT ADATOK	NORMÁL ÉRTÉKEK	1. TÍPUSÚ VWB (ENYHE, n=13)	1. TÍPUSÚ VWB (SÚLYOS, n=9)
Kor (év)		33.9±8.5	38.9±11.4
Férfi:nő		2:11	5:4
APTI (s)	29.4-32,4	33,1±2,3	40,1±4,5
Vérzés-idő (min)	2,5-9,5	7,3±1,5	12,3±2,9 és két esetben >20
FVIII:C (E/ml))	0,5-2,0	0,9±0,1	0,3±0,2
VWF:Ag (E/ml)	0,5-1,5	0,39±0,06	0,097±0,04
VWF:RCo (%)	58-166	53,4±12,3	14,8±9,2
ZCS-h (filterteszt)	20,3±4,0 (12,3-28,3)	26,7±5,4 és nem zárt egy esetben	44,6±8,2 és nem zárt hat esetben
ZCS-c (filterteszt)	27,7±6,0 (15,7-39,7)	41,6±7,8	Valamennyi esetben hiányzó filterzárás
RET-1-h (%) (filterteszt)	72,2±10,8 (50,6-93,8)	48,9±8,7	49,8±9,6
RET-2-h (%) (filterteszt)	95±3,6 (87,8-100)	82,4±11,3	60,6±8,8
RET-1-c (%) (filterteszt)	68,3±8,4 (51,5-85,1)	46,4±8,7	29,0±12,5
RET-2-c (%) (filterteszt)	87,3±7,9 (71,5-100)	61±8,4	41,7±17,3
ZI (s) koll/epi (PFA-100)	102,2±19,7 (65-142)	158,8±22,9 és nem zárt két esetben	213,0 és nem zárt nyolc esetben
ZI (s) koll/ADP (PFA-100)	86,5±15,6 (55-118)	114,2±14,3 és nem zárt egy esetben	209,5±83,5 és nem zárt hét esetben
RIPA (risztomycin indukálta thrombocyta aggregáció)	Normális	Normális 10 esetben, csökkent 1,0 mg/ml koncentrációval 3 esetben	Normális 1 esetben, csökkent 1,2 mg/ml koncentrációval 3 esetben, csökkent 1,5mg/ml koncentrációval 5 esetben

4. táblázat: Az 1-es típusú von Willebrand-betegek eredményei (enyhe és súlyos tünetek). ZCS: záró cseppszám, RET-1: thrombocyta retenció az O'Brien-féle filterteszt első fázisában (0-5 s), RET-2: thrombocyta retenció a filterteszt második fázisában (20-40 s), h: heparinnal alvadásgátolt vérrel, c: citráttal alvadásgátolt vérrel, ZI: záródási idő a PFA-100 készülékkel koll/epi: kollagén-adrenalin patronnal, koll/ADP: kollagén-ADP patronnal.

VIZSGÁLT ADATOK	2A típusú vWD		2B típusú VWB			3 típusú VWB		
Betegek	J.M.	J.K.	R.K.	T.J.	A.E.	T.A.	B.P.	R.T.
Kor (év)	23	62	45	22	21	31	18	22
Nem	Nő	Férfi	Nő	Férfi	Nő	Nő	Férfi	Nő
APTI (s)	33.1	34,0	30.7	30,0	30.5	74,0	65.8	70.1
Vérzés idő (min)	>20	>20	8	6	16	>20	>20	>20
FVIII:C (E/ml)	0,76	0,70	0,86	0,95	0,75	0,080	0,020	0,030
VWF:Ag (E/ml)	0,32	0,24	0,61	0,31	0,34	<0,02	<0,02	<0,02
VWF:RCo (%)	31	20	52	76	30	0	0	11
ZCS-h (filtrateszt)	Nem zárt	Nincs adat	Nem zárt	28	Nem zárt	Nem zárt	Nem zárt	Nem zárt
ZCS-c (filtrateszt)	Nem zárt	Nem zárt	Nem zárt	45	Nem zárt	Nem zárt	Nem zárt	Nem zárt
RET-1-h (%) (filtrateszt)	50	Nincs adat	42	69	64	5	10	29
RET-2-h (%) (filtrateszt)	62	Nincs adat	57	96	74	16	19	44
RET-1-c (%) (filtrateszt)	48	36	18	51	54	20	15	16
RET-2-c (%) (filtrateszt)	51	45	45	81	70	9	12	16
ZI (s) koll/epi (PFA-100)	Nem zárt	Nem zárt	Nem zárt	136	Nem zárt	Nem zárt	Nem zárt	Nem zárt
ZI (s) koll/ADP (PFA-100)	Nem zárt	Nem zárt	Nem zárt	115	Nem zárt	Nem zárt	Nincs adat	Nem zárt
RIPA (risztomycin indukálta thrombocytá aggregáció)	Csökkent 1,2 mg/ml konc.-val	Csökkent 1,2 mg/ml konc.-val	Aggr. 0,5 mg/ml konc.	Aggr. 0,6 mg/ml konc.	Aggr. 0,5 mg/ml konc.	RIPA teljes hiánya	RIPA teljes hiánya	RIPA teljes hiánya

5. táblázat: A 2A, 2B és a 3-as típusú von Willebrand-kóros betegek eredményei.

Jelmagyarázat és normál értékek a 4. táblázatban.

Az O'Brien-féle filterteszt eredményei: A jellemző paraméterek közül a két antikoagulánssal kapott záró cseppszámot és a két fázisban kapott thrombocyta-retenciót értékeltük. Eredményeinket a 4. és a 5. táblázat foglalja össze. Bár az 1-es típusú, enyhén vérzékeny betegeknél csupán 53,8%-ban (heparin) illetve 58,3%-ban (citrát) kaptunk kóros eredményt a záró cseppszám vonatkozásában, citrátos vérmintával a 2. fázisban kapott retenció azonban 11/12 esetben (91,6%) csökkent volt. Súlyos tünetekkel rendelkező, 1-es típusú betegek esetén már minden betegnél a normál tartomány fölötti záró cseppszámot kaptunk, heparinnal 6/9, citráttal 8/8 esetben pedig egyáltalán nem észleltünk filterzárást. Citrátos mintáknál a thrombocyta retenció az első fázisban valamennyi betegnél, a másodikban 7/8 betegnél (87,5%) kisebb volt a laboratóriumi kontrollnál. A 2-es és 3-as típusba tartozó betegek esetében citráttal a záró cseppszám valamennyi esetben kóros volt, a filter nem ill. egy esetben (T.J. 2B típus) későn zárt, heparinnal 6/7 esetben nem tapasztaltunk filterzárást, egy betegben (T.J. 2B típus) a záró cseppszám éppen a felső határra esett. Ezen egy beteg kivételével a thrombocyta retenció is csökkent volt mindkét fázisban. A legszenzitívebb paraméternek a citrátos vérrel a 2. fázisban kapott vérlemezke retenció bizonyult. Ez a paraméter egyben specifikus (94,7%) és a pozitív és negatív prediktív értéke (96% ill. 81,8%) is ennek a jellemzőnek a legnagyobb az O'Brien-féle filterteszt vonatkozásában (6. és 8. táblázat).

BETEG- CSOPORT	ZCS-h	ZCS-c	RET-1-h	RET-2-h	RET-1-c	RET-2-c
1. típus (enyhe tünetek)	53.8%	58.3%	76.9%	46.2%	75%	91.6%
1. típus (súlyos tünetek)	100%	100%	44.4%	100%	100%	87.5%
2A, 2B és 3-as típus	85.7%	100%	71.4%	85.7%	87.5%	87.5%
Szenzitivitás a teljes betegcsoportban	75.8%	82.1%	65.5%	72.4%	85.7%	89.3%

6. táblázat. Az O'Brien-féle filterteszt szenzitivitása az egyes típusokban. Jelmagyarázat a 4. táblázat alapján.

PFA-100 készülékkel kapott eredményeket a 4. és az 5. táblázat foglalja össze.

Enyhe, 1-es típusú betegség esetén a kollagén-adrenalinok szenzitívebbek (76.9%) a kollagén-ADP-s patronoknál (38.5%), ez utóbbiak meglepően rosszul jelezték az enyhe VWB-t. Súlyos vérzékenység és variáns típus esetén azonban egy beteg (T.J., 2B típus) kivételével minden esetben a záródási idő a normál értéknél hosszabb volt, illetve az eszköz nem zárt. A vizsgálat mindkét patronnal specifikusnak bizonyult, és a pozitív valamint negatív prediktív értéke is nagy volt (7. és 8. táblázat).

	PFA-100	
BETEGCSOPORT	koll/epi	koll/ADP
1-es típus (enyhe tünetek)	76.9%	38,5%
1-es típus (súlyos tünetek)	100%	100%
2A, 2B és 3-as típus	87.5%	85.7%
Szenzitivitás a teljes betegcsoportban	86.6%	65.5%

7. táblázat: A PFA-100 szenzitivitása az egyes VWB típusokban. Koll/epi: kollagén-adrenalin patronnal, koll/ADP: kollagén-ADP patronnal.

A VIZSGÁLAT TÍPUSA	SPECIFICITÁS	POZITÍV PREDIKTÍV ÉRTÉK	NEGATÍV PREDIKTÍV ÉRTÉK
FILTER- TESZT			
ZCS-h	90%	91.6%	76%
ZCS-c	89.5%	92%	77.3%
RET-1-h	90%	90%	64.3%
RET-2-h	95%	88.8%	47.5%
RET-1-c	84.2%	88.8%	80%
RET-2-c	94.7%	96%	81.8%
PFA-100			
koll/epi	96.7%	96.3%	87.9%
koll/ADP	100%	100%	78.9%

8. táblázat: A két összehasonlított nagy nyíróerejű áramlási viszonyokat modellező módszer egyes jellemző paramétereinek specificitása, pozitív és negatív prediktív értéke. Jelmagyarázat az 4. táblázatban.

2. A reuma faktor hatása az immunturbidimetriás elven működő

VWF:Ag meghatározásra.

A beteg és két felnőtt gyermekének különböző tesztekkel kapott Willebrand faktor antigén és aktivitási eredményeit a 9. táblázat foglalja össze.

Beteg (életkor, év)	VWF:Ag LIA-1 (%)	VWF:Ag LIA-2 (%)	VWF:Ag ELISA (%)	VWF:RCo agglutináció (%)	VWF:RCo ELISA (%)	VWF:CBA ELISA (%)
J.K. (53)	150*	7*	14	<10	3	7
J.L. (30)	12	10	10	<10	3	6
J.I. (27)	14	12	13	<10	5	8
Normál tartomány	50-160	50-150	41-126	58-166	46-160	44-169

9. táblázat: A beteg (J.K.) és gyermekeinek (J.L. és J.I.) VWF:Ag, VWF:RCo és VWF:CB eredményei. VWF:Ag LIA-1: STA Liatest VWF-al kapott eredmények, VWF:Ag LIA-2: IL test VWF-al kapott eredmények. *-gal az egymásnak ellentmondó eredményeket emeltük ki.

Szembevetve, hogy a két immunturbidimetriás elven működő VWF:Ag meghatározás betegünk esetében jelentősen eltérő eredményt adott (150 % vs 7 %). Ezt az eltérést ismételt vizsgálatokkal is megerősítettük. Az ELISA módszerrel kapott VWF:Ag meghatározás az IL Test VWF-al kapott alacsony VWF szintet támasztotta alá és egybecsengett a beteg korábbi adataival. Gyermekei esetében is

alacsony VWF:Ag eredményeket kaptunk. Náluk nem tapasztaltunk ellentmondást a két immunturbidimetriás módszerrel kapott eredmény között. A VWF funkcionális tesztjei valamennyi beteg esetében erősen csökkent VWF aktivitást mutattak. A risztocetin kofaktor aktivitás két módszerrel történő meghatározásával kapott eredmények jól korreláltak egymással és a kollagén kötő aktivitással. Az ellentmondásos VWF:Ag eredmények magyarázatát keresve reuma faktor meghatározást végeztünk, mivel irodalmi adatok alapján (Veyradier, 1999) a reuma faktor befolyásolhatja latex immunassay-vel kapott eredményeket. Az apa esetében nagy titerű reuma faktor pozitivitás igazolódott (127 E/ml normál tartomány: 0-50 E/ml). Gyermekeinél nem volt kimutatható reuma faktor.

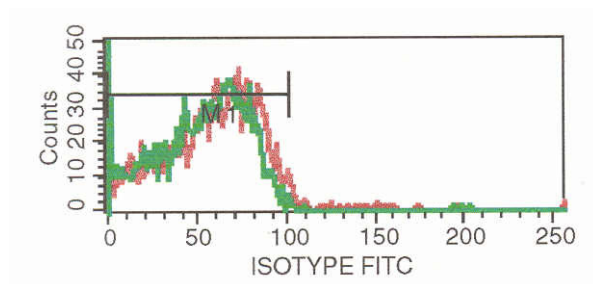
Az első megfigyelést követően két másik, súlyos von Willebrand kóros betegünkénél tapasztaltunk hasonlóan ellentmondásos eredményeket: K.J. 1-es típusú VWB esetében VWF:Ag LIA-1: 53 % vs. LIA-2: 10 % (VWF:RCo <10%), T.A. 3-as típusú betegnél LIA-1: 50 % vs. LIA-2: <2 % (VWF:RCo <10%). Mindkét betegnél RF pozitivitást találtunk

3, A Bernard-Soulier szindrómás beteg vizsgálatával kapott eredmények:

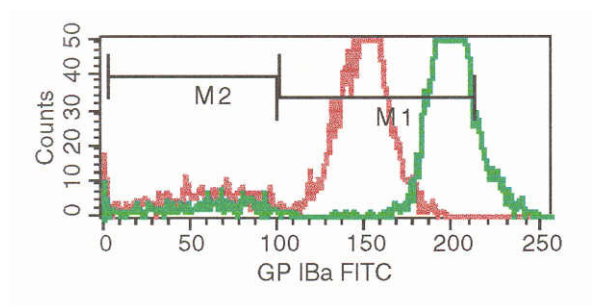
A *thrombocyta aggregáció* során normális aggregációt találtunk ADP-vel (71%, RR: 64-100%) és kollagénnel (87%, RR: 79-100%). Ugyanakkor a risztocetin indukálta thrombocyta aggregáció csökkent volt (6%, RR: 84-100%) és ezt normál plazma hozzáadása nem korrigálta.

A *PFA-100 vizsgálat* során mindkét patronnal jelentősen megnyúlt, 300 s feletti értéket kaptunk (RR:kollagén/adrenalin: 73-181 s, kollagén/ADP: 58-142 s).

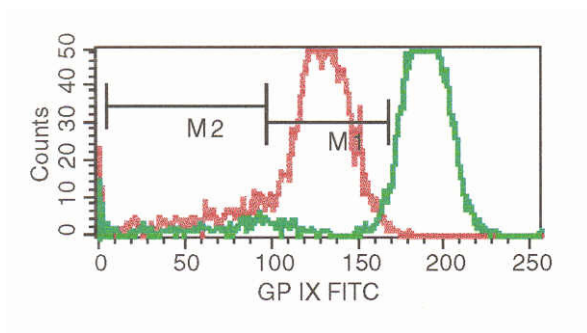
Az *áramlási citometriás mérések* eredményeit Jean-Pierre Delville (Hopital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Belgium) bocsátotta rendelkezésünkre. Az eredményeket a 4. ábra és a 10-11. táblázat foglalja össze. Különböző antitestekkel történt mérések eredménye szerint a GPIb α , a GPIb β és a GPIX expressziója hasonló mértékben csökkent a thrombocyták felszínén, a GPV kisebb csökkenést mutatott. A GPIb/IX/V komplex elemeinek mennyiségi meghatározására alkalmas Biocythex kit-tel kapott eredmények szerint a GPIb α , GPIX és GPV expresszió a kontroll 15%, 9,6% illetve 21%-a. A vérlemezkék nagyobb méretének megfelelően a GPIIb/IIIa és a PAR-1 expressziója a kontrollhoz képest fokozott volt. Az egészséges kontroll és a beteg ADP és TRAP indukálta thrombocyta aktivációja között különbség nem volt észlelhető.



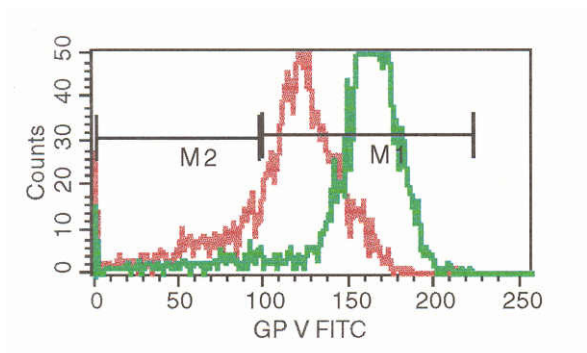
A, Izotípus kontroll (Cytoquant CD42 quantification kit)



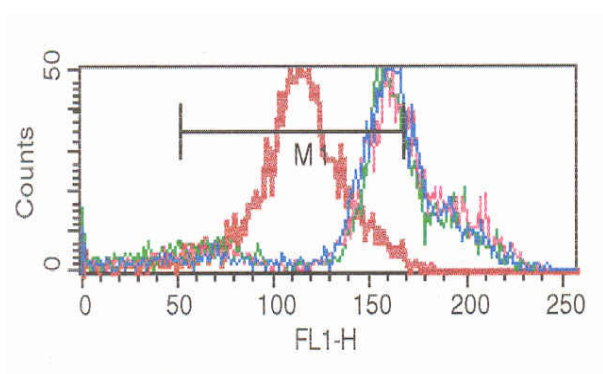
B, Anti-GPIb α (Cytoquant CD42 quantification kit)



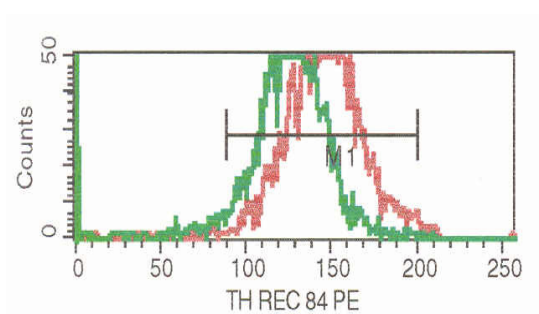
C, Anti-GPIX (Cytoquant CD42 quantification kit)



D, Anti-GPV (Cytoquant CD42 quantification kit)



E, Anti-GPIIb β (RAM-1),
thrombocytadús plazmán



F, Anti-PAR-1 (WEDE 15),
teljes vérben

4. ábra: Reprezentatív áramlási citometriás görbék. Az A-D görbék teljes vérben a Cytoquant CD42 quantification kit-tel (Biocythex, Marseille, Franciaország), az E görbe thrombocytadús plazmán RAM-1 antitesttel, az F görbe teljes vérben WEDE 15 anti-thrombin receptor antitesttel készült. Piros: beteg; zöld: kontroll.

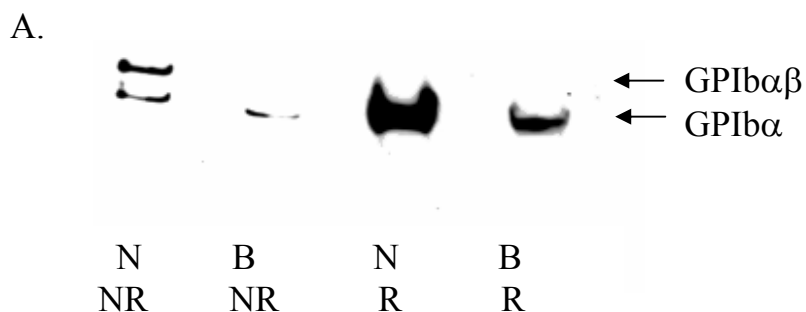
Antitest	Antigén	Kontroll (MFI)	Beteg (MFI)
Izotípus kontroll		53	56
26D1 ⁺	GPIb α	186	144
27C11 ⁺	GPIb α	198	154
RAM-1 ⁺	GPIb β	164	113
BEB-1 ⁺	GPIX	174	123
ALMA-16 ⁺	GPIX	146	104
SW16 ⁺	GPV	139	127
V1 ⁺	GPV	133	127
CD61 ⁺	GPIIb/IIIa	110	150
HIP-1 [§]	GPIb α	184	129
SZ-2 [§]	GPIb α	197	151
SZ-1 [§]	GPIX	192	128
SPAN12 [§]	PAR-1	124	139
WEDE15 [§]	PAR-1	106	118

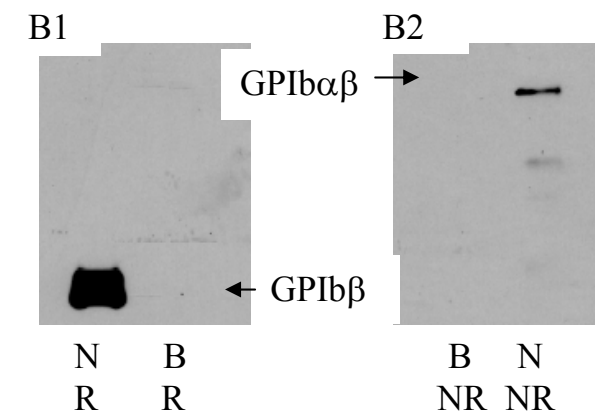
10. táblázat: A beteg felszíni glikoprotein expressziójának összehasonlítása egy egészséges kontrollal. Az eredményeket median fluoreszcencia intenzitással (MFI) fejeztük ki. +: thrombocytadús plazmán indirekt immunfluoreszcenciás mérésekkel kapott eredmények. §: teljes vérben direkt immunfluoreszcenciás mérésekkel kapott eredmények.

Antitest	MFI		Antitest kötő képesség/thrombocyta		
	Kontroll	Beteg	Kontroll	Beteg	Normál tartomány
Izotípus kontroll	51	57	192	153	
GPIb α	198	148	42987	6310	34000 $\pm$ 9000
GPIX	188	127	29286	2818	26000 $\pm$ 6000
GPV	161	120	10391	2154	12000 $\pm$ 4000

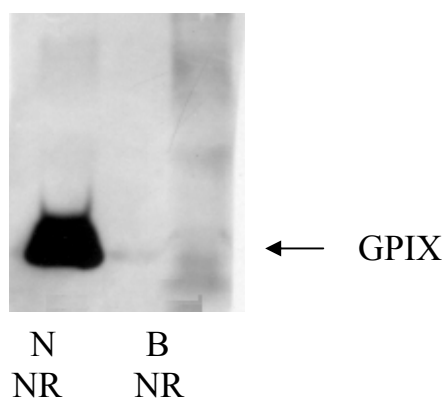
11. táblázat: A GPIb α , GPIX és GPV expresszió mennyiségi meghatározása Cytoquant CD42 quantification kit-tel. Az eredményeket median fluoreszcencia intenzitással (MFI) és az ebből számított vérlemezékenti antitest kötő képességgel fejeztük ki.

A vérlemezke lizátum Western blot analízisével a GPIb α csak nyomokban volt jelen, a GPIb β és a GPIX nem érte el a kimutathatósági szintet. A beteg mintájában nem volt detektálható a GPIb α -GPIb β komplex. (5. ábra)





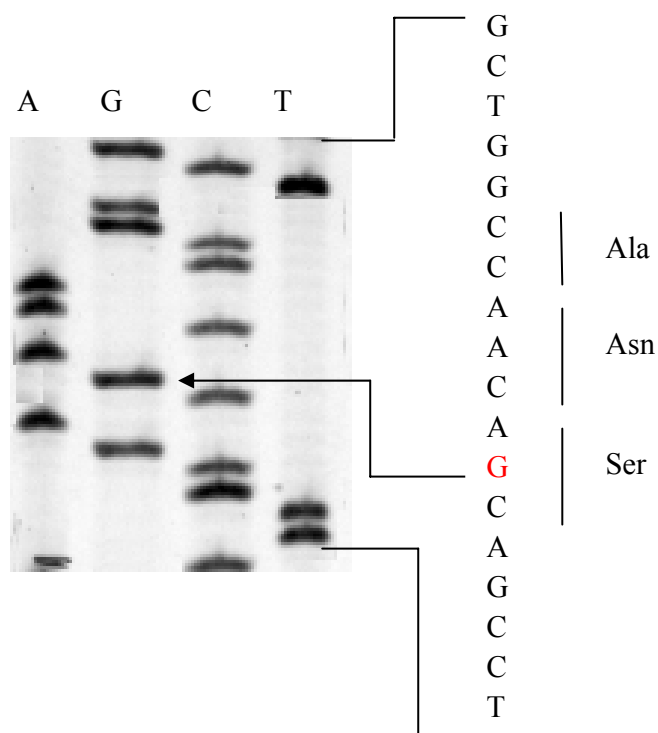
C



5. ábra: A beteg (B) és a normál kontroll (N) thrombocytá lizátumainak Western blot analízise. Az elektroforézis redukáló (R) és nem redukáló (NR) körülmények között 7,5%-os (A, B₁) és 10%-os (B₂,C) SDS poliakrilamid géleken történt, majd a mintákat nitrocellulóz membránra vittük át és a 27C11 jelű GPIbα elleni monoklonális antitesttel (A panel), nyúlban termelt poliklonális GPIbβ antitesttel (B panel) és BL-H6 jelű, GPIX elleni monoklonális antitesttel detektáltuk (C panel).

A GPIbα, a GPIbβ és a GPIX géneinek *PCR amplifikációját és szekvenálását* végeztük el. Ennek során egyetlen mutációt találtunk: a GPIX génjében az 1826.

helyen egy A → G cserét (6. ábra), mely a GPIX aminosav sorrendjében egy Asn45Ser cserét eredményez.



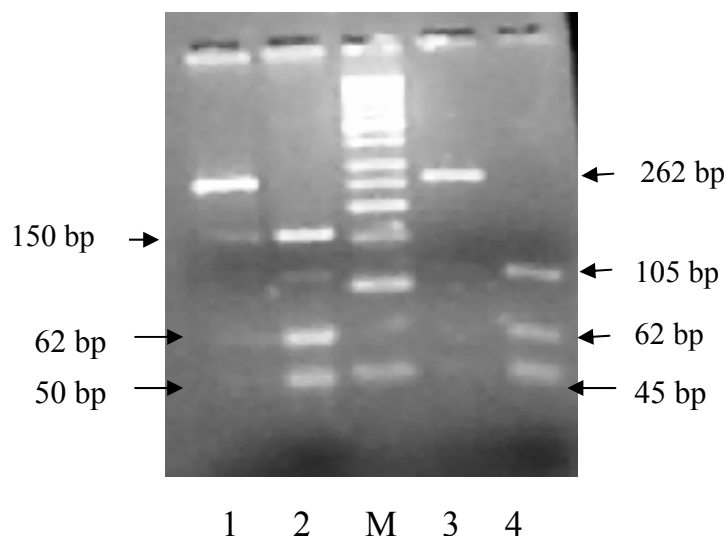
6. ábra: A beteg GPIX génjének 3-4 primerekkel történő PCR termékének szekvencia analízise. A piros színnel jelzett guanin helyén normál esetben egy adenin található. A báziscsere egy missense mutációt, Asn → Ser cserét eredményez.

Restrikciós enzim analízis

A kapott mutáció egy új hasítási helyet képez az *Fnu4H1* restrikciós enzim számára.

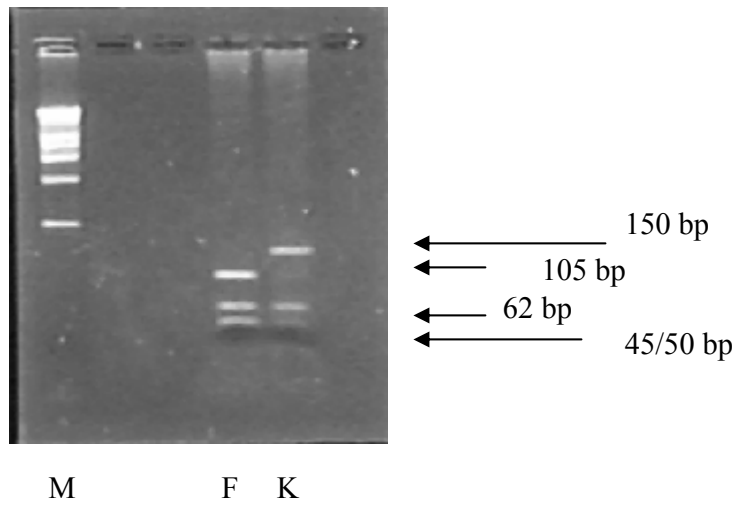
A 7. ábra szemlélteti a GPIX 3-4 fragment *Fnu4H1* hasításával kapott eredményeket a beteg és egy kontroll személy DNS-n. A kontroll minta emésztése egy 150, egy 62 és egy 50 bázispár (bp) nagyságú DNS szakaszt eredményezett. A

beteg mintájának emésztésekor a 150 bp nagyságú szakasz nem volt jelen, helyette a mutáció egy 105 és egy 45 bp nagyságú szakaszt eredményezett. A beteg ennek alapján homozygota a mutációra nézve.



7. ábra: A beteg és egy egészséges kontroll GPIX 3-4 DNS fragmentjének *Fnu*4H1 restrikciós enzimmal történő emésztésének eredménye. A mintákat 3%-os agaróz gélen analizáltuk. 1: nem emésztett egészséges kontroll DNS; 2: emésztett egészséges kontroll DNS; M: marker (50 bp); 3: a beteg nem emésztett DNS-e; 4: a beteg emésztett DNS-e.

A beteg fiának GPIX 3-4 fragmentjét is amplifikáltuk a korábban leírt módon majd emésztettük az *Fnu*4H1 restrikciós enzimmal. Az eredmény megegyezett az édesanyjánál kapott mintázattal. Ennek alapján a fiú ugyancsak homozygota a talált mutációra.



8. ábra: A beteg fiának DNS-vel végzett restrikciós enzim analízis. M: marker. F: fiú. K: kontroll.

MEGBESZÉLÉS

Ad 1. A von Willebrand kór klinikuma igen heterogén, a teljes tünetmentességtől (akiknek betegségére csak családvizsgálat során derül fény) a súlyos, életet veszélyeztető vérzésekre terjed. Azonban valamennyi beteg esetén igaz az, hogy valamely provokáló hatásra (fogextractio, műtét, szülés, stb.) súlyos vérzéses komplikációk jelentkezhetnek. Mivel ma már vannak a kezünkben olyan lehetőségek, melyekkel egy ilyen vérzés megelőzhető, illetve jól kezelhető (DDAVP, ill. VWF tartalmú faktor-koncentrátumok), nagyon fontos a betegség időben való felismerése.

A pontos diagnózis felállításához számos, a VWF mennyiségére, működésére, szerkezetére irányuló vizsgálat elvégzése szükséges. Ezen módszerek mindegyike időigényes, megfelelő laboratóriumi háttérrel igényel. A gyakorlatban szűrőtesztként használt vérzés idő meghatározást több, a vizsgálotól és a vizsgált betegről függő tényező befolyásolja. Szükség lenne tehát egy olyan módszerre, ami könnyen kivitelezhető, vizsgálotól független, a beteg számára nem jelent nagyobb megterhelést, és megfelelő eszköz birtokában bárhol elvégezhető.

A bevezetőben részleteztük, hogy a keringés artériás ágán az érfalsérülést követően kialakuló thrombocytá-thrombus létrejöttében alapvető szerepe van a von Willebrand faktornak. Ebből következik, hogy a nagy nyíróerejű áramlási viszonyok közötti thrombusképződést modellező eszközök elméletileg jól alkalmazhatók a VWF működésének vizsgálatára. Két ilyen módszer, az O'Brien féle filterteszt és a PFA-100 alkalmazását vizsgáltuk a von Willebrand betegség

diagnosztikájában. A két módszer közös vonása, hogy kapilláris méretű pórusokon teljes vért présel át nagy nyomással, ily módon nagy nyíróerejű áramlási viszonyokat hozva létre. Különböznek abban, hogy a PFA-100 esetében a membrán felszíne, az érfalsérülést közelebbről modellezendő, kollagénnel és valamely aggregáló ágenssel (ADP vagy adrenalin) van bevonva, míg az O'Brien-féle filtertesztben a vérlemezkék üvegszálakhoz tapadnak ki és aktiválódnak.

Harminc beteget vizsgáltunk, akiknek a diagnózisa és a betegség típusa korábbról már ismert volt. A vérzés idő gyakorlott vizsgálók kezében alkalmasnak mutatkozott a súlyosan vérzékeny 1-es típusú betegek valamint a 2A és 3-as típusú betegség esetében szűrőtesztnek, ugyanakkor az enyhén vérzékenyek között csupán két esetben volt megnyúlt. Érdekes, hogy 2B típusú betegeink közül csak annak volt jelentősen hosszabb a vérzés-ideje, akinek a thrombocytaszáma rendkívül alacsony volt (Á.E.), ugyanakkor ez a beteg az utóbbi tizenegy évben klinikailag teljesen panaszmentes. Kifejezett tünetekkel, nehezen befolyásolható vérzéssel hospitalizált betegünk (R.K.) vérzés ideje normális volt, míg mind a filtertesztben, mind a PFA-100 vizsgálat során súlyos VWF működési zavart tudtunk kimutatni. Harmadik 2B típusú betegünk (T.J.) érdekes módon mind a vérzés-idő, mind a PFA-100 normális tartományba esett, csak a filterteszt késői zárása tükrözte a VWF funkcionális vizsgálatait közül a beteg kifejezett vérzékenységét. Hangsúlyozzuk azonban, hogy a 2B típusú betegség diagnózisának felállításához továbbra is nélkülözhetetlen a risztocetin indukálta thrombocyta aggregáció vizsgálata, annak fokozott volta.

Az O'Brien-féle filtertesztel kapott eredmények szerint elegendő citráttal antikoagulált teljes vérrel elvégezni a vizsgálatot, mert heparinos vérrel a módszer kevésbé szenzitív, hasonló mértékben specifikus és negatív prediktív értéke kisebb, vagyis negatív eredmény esetén a VWB kisebb valószínűséggel zárható ki. A legszenzitívebb paraméter a VWB vonatkozásában a második fázisban citrátos vérrel kapott retenció, mely egyben specifikus és a pozitív és negatív prediktív értéke is ennek a jellemzőnek a legnagyobb. A záró cseppszám az enyhe betegséget kevésbé jelzi, de súlyos 1. típusú betegség és 2-es illetve 3-as típus esetében valamennyi betegnél kóros értéket adott.

A PFA-100 két különböző patronja közül a kollagén-adrenalinós patronnal végzett vizsgálat érzékenyebb az enyhe vérzékenységben szenvedők esetén, míg súlyos vérzékenység és variáns típusú betegségben nincs különbség a két különböző patronnal végzett vizsgálat szenzitivitásában. A kollagén-ADP-s patronokkal végzett vizsgálat specifikusabb, pozitív prediktív értéke adataink szerint 100%-os. A fentiek alapján a VWB szűrésére a kollagén-adrenalinós patronokkal végzett vizsgálat javasolható a nagyobb szenzitivitás miatt.

Két, nagy nyíróerejű áramlási viszonyokat modellező módszerünk nagyjából azonos mértékben (80-90%) mutatkozott alkalmasnak a VWB kimutatására, bár a korábbi adatokkal (Fressinaud, 1998) ellentétben a kollagén-ADP patronokkal kapott eredmények a PFA-100 készülékkel végzett vizsgálatban meglepően rosszul jelezték az enyhe VWB-t. Ugyanakkor éppen ebben a csoportban bizonyult nagy segítségnek az O'Brien-féle filterteszt: citrátos vérmintával a második fázisban

11/12 betegben (91,6%) csökkent retenciót észleltünk. A két módszer specificitása, pozitív és negatív prediktív értéke egybevetethető.

Összességében tehát mindkét, nagy nyíróerejű áramlási viszonyokat modellező módszerünk alkalmas a Willebrand betegség szűrésére. Különösen két esetben jelentenek előnyt a vérzés idő meghatározással szemben: enyhe Willebrand kór és 2B típusú betegség esetén. Ezen könnyen kivitelezhető, nagyobb gyakorlatot nem igénylő és a beteg számára a vérzés idő meghatározásnál kisebb megterhelést jelentő módszerek feltétlenül ajánlhatók a von Willebrand betegség szűrővizsgálatára.

Ad 2. A VWB diagnosztikájának alapvető tesztje a VWF:Ag szint meghatározás. A legpontosabb eredményt az ELISA módszerrel történő VWF:Ag szint mérés adja. Az utóbbi években azonban egyre inkább elterjedtebbé váltak az immunturbidimetriás elven működő VWF:Ag tesztek egyszerűségük, gyorsaságuk, olcsóságuk és automatizálhatóságuk miatt. Egy családvizsgálat során tapasztaltuk, hogy a különböző gyártótól származó, de azonos elven működő immunturbidimetriás tesztek a RF jelenléte eltérő mértékben befolyásolja. Az első megfigyelés később két másik, súlyos von Willebrand kóros beteg esetén is megerősítést nyert. Ezek az eltérések nagy jelentőségűek, hiszen tévesen magasnak mért VWF:Ag szint egyes esetekben a VWB diagnózisának kizárásához vezethet, máskor – a VWF:RCo-val vagy VWF:CB-al együtt értékelve – a betegség téves altípusba sorolásához. Fontos, hogy a klinikumnak ellentmondó eredmény vagy

valamilyen autoimmun betegség fennállása esetén a VWF:Ag szint több módszerrel történő meghatározására törekedjünk, illetve a vizsgálatokat reuma faktor meghatározással egészítsük ki.

Ad 3 Egy 38 esztendőes belga nőbeteg vizsgálatát végeztük el. A Bernard-Soulier betegség diagnózisa a thrombocytopenián, a perifériás vérkenetben észlelt óriás thrombocytákon és a normál von Willebrand faktor antigén és aktivitás mellett mért jelentősen csökkent risztocetin indukálta thrombocyta aggregáción alapult. Az ADP és a kollagén indukálta thrombocyta aggregáció normális volt és ugyancsak normál eredményt adott az áramlási citometriával vizsgált ADP és TRAP indukálta thrombocyta aktiváció. A beteg vérzés ideje Ivy módszerrel megnyúlt volt, a PFA-100 záródási idő 300 s feletti.

A GPIb/IX/V komplexet alkotó glikoproteinek jelenlétét a beteg vérlemezkéin áramlási citometriával és a vérlemezke lizátum Western blot analízisével vizsgáltuk. Áramlási citometriával valamennyi glikoprotein jelenléte kimutatható volt, mennyiségi meghatározással legkifejezettebben a GPIX, legkevésbé a GPV mennyisége csökkent. Western blot analízissel nem volt detektálható mennyiségű GPIX és GPIb β . A GPIb α mennyisége csökkent. Ugyanakkor nem tudtuk GPIb α -GPIb β komplex jelenlétét igazolni a beteg thrombocyta lizátumában.

A GPIX génjének szekvenálásával egy missense pontmutációt, az 1826. helyen egy adenin-guanin cserét találtunk, mely a fehérje aminosav sorrendjében

Asn45Ser cserét eredményez. A mutáció egy új restrikciós hasítási helyet hoz létre az *Fnu4H1* enzim számára. Ennek segítségével igazoltuk, hogy a beteg homozygota erre a mutációra. A beteg ugyancsak vérzékeny fia a GPIX 3-4 PCR fragment restrikciós enzim analízise alapján szintén homozygotának bizonyult az Asn45Ser mutációra. A GPIb α és a GPIb β génjében mutációt nem találtunk.

Eddigi ismereteink szerint Bernard-Soulier szindrómát a GPIb α , a GPIb β és a GPIX génjének mutációja okoz. A GPV-t érintő mutációt eddig még nem ismertettek és kísérletes adatok is amellett szólnak, hogy a GPV hiánya nem okoz vérzékenységet (Kahn, 1999). A GPIX-t érintő ismert mutációkat a 12. táblázat foglalja össze.

Egy, a közelmúltban ismertetett, kilenc nukleotidot érintő deléciót (Drouin, 2005) kivéve a mutációk túlnyomó többsége missense mutáció. A Cys73Tyr, a Cys97Tyr és a Cys8Arg az intramolekuláris diszulfid hidak kialakulásának gátlását és a szekunder molekulaszervezet megváltozását eredményezi. A Japánban többször leírt Trp126stop mutáció a transzmembrán régió hiányát okozza, az Ala140Thr csere magát a transzmembrán régiót érinti és a fehérje membránba történő beágyazódását gátolja. A szignál peptidet érintő Leu7Pro mutáció a szignál peptid konformációjának megváltozását okozza és ennek révén az endoplazmatikus retikulum membránjához történő kapcsolódását akadályozza meg, ami a GPIX teljes hiányához vezet.

12. táblázat

MUTÁCIÓ	ÉRINTETT RÉGIÓ	REFERENCIA
Leu40Pro	LRM	Noris P, 1998
Phe55Ser	LRM	Noris P, 1997 Suzuki K, 1997
Trp126stop	A transzmembrán és a C-terminális régió hiánya	Noda M, 1995 Iwanaga M, 1998 Toyohama T, 2003
Cys73Tyr	A Cys73 és Cys97 közötti intramolekuláris diszulfid híd hiánya, konformáció változás	Noda M, 1996
Cys97Tyr	A Cys73 és Cys97 közötti intramolekuláris diszulfid híd hiánya, konformáció változás	Kunishima S, 1999
Ala140Thr	A transzmembrán régió mutációja, a membránba történő beágyazódás gátlása	Wang Z, 2004
Cys8Arg	A Cys8 és Cys12 közötti intramolekuláris diszulfid híd hiánya, konformáció változás	Rivera CE, 2001
Leu7Pro	Szignál peptid struktúrájának megváltoztatása, az endoplazmatikus retikulum membránjába való beépülés gátlása.	Lanza F, 2002
Asp21Gly	LRM	Wright S, 1993
Asn45Ser	LRM	Wright S, 1993 Clemetson M, 1994 Donner M, 1996 Koskela S, 1999 Vanhoorelbeke K, 2001 Sachs U, 2003 Drouin J, 2005
Deléción (9 nukletid)	Asn86Ala Del 87,88,89	Drouin J, 2005

A missense mutációk egy csoportja – köztük az általunk talált mutáció is – a leucinban gazdag régiót (LRM, 40-63 aminosav, mutációk: Leu40Pro, Phe55Ser, Asn45Ser) vagy annak aminoterminális oldalrégióját (20-39 aminosav, mutáció: Asp21Gly) érintik. Az LRM és oldalszekvenciáinak pontos funkciója nem tisztázott, de a GPIX és a GPIb β közötti kapcsolat kialakításában van szerepe. Ebben rokonságot mutat más LRM tartalmú proteinekkel, például a *Drosophila* toll, chaoptin és connectin fehérjével, melyek más sejtek azonos szerkezetű receptorainak összekapcsolása révén biztosítják a sejtek közötti összeköttetést. A GPIb β központi helyet tölt be a GPIb α -GPIb β -GPIX komplex létrehozásában (Lopez, 1994; Kenny, 1999). A GPIb α -hoz kovalens kötéssel, egy diszulfid hídon keresztül kapcsolódik, míg a GPIX-hez nem kovalens kötéssel. A GPIb β N-terminális 15-32 közötti aminosavának szerepe bizonyított a GPIb β -GPIX közötti kapcsolat kialakításában (Kenny, 2002). A GPIX GPIb β kötő helye nem ismert, de az N-terminális oldalszekvenciájának Asp21Gly mutációja illetve az LRM Asn45Ser és Phe55Ser mutációja transzfektált sejtekben gátolja a GPIb β -GPIX közötti nem kovalens kapcsolat létrejöttét, a GPIb β -GPIX komplex kialakulását (Sae-Tung, 1996, Suzuki, 1999). A GPIb β -GPIX komplex hiányában a GPIb α stabilitása romlik, lebomlása fokozódik, ami a felszíni expresszió jelentős csökkenéséhez és Bernard-Soulier szindróma kialakulásához vezet (Dong, 1998).

A belga betegnél talált mutációt először egy „compound” heterozygota angol betegben írták le (Wright, 1993), később egy homozygota osztrák

(Clemetson, 1994), egy svéd (Donner, 1996) és hét finn betegben (Koskela S, 1999). Saját közlésünket követően még négy német (Sachs, 2003) és egy „compound” heterozygota kanadai betegnél (Drouin, 2005) találták ugyanezt a mutációt. A kanadai beteg francia-ír származású édesanyjától örökölte az Asn45Ser cserét. Saját esetünk külön érdekessége, hogy a beteg fia, akinek részletes haemostaseológiai vizsgálatára nem volt lehetőségünk, ugyancsak homozygota erre a mutációra, így édesanyjával rokonságban nem álló édesapjának is hordoznia kellett ezt az aminosavcserét. Az ugyancsak részletesen vizsgált japán és olasz Bernard-Soulier szindrómás betegcsoportban ugyanakkor nem fordult elő ez a genetikai eltérés. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy az Asn45Ser mutáció az észak- és nyugat-európai népesség legelterjedtebb, Bernard-Soulier szindrómát okozó mutációja. Figyelembe véve, hogy az ismertetett betegek többségének diagnózisa kezdetben immun thrombocytopeniás purpura (ITP) volt és ennek megfelelő terápiában részesültek, terápia refrakter ITP esetén a Bernard-Soulier szindróma lehetősége illetve annak hordozó állapota mérlegelendő. Ennek lehetőségét figyelembe kell venni a terápiára refrakter ITP-s betegek differenciális diagnózisában. Ilyen esetekben a rendelkezésre álló tesztek közül első lépcsőben a RIPA elvégzése ajánlható.

ÖSSZEFOGLALÁS

Nagy nyíróerejű áramlási viszonyok között a thrombocyta adhéziót a von Willebrand faktor biztosítja. A VWF receptora a vérlemezkék felszínén a GPIb/IX/V komplex. Ha a VWF és a GPIb közötti kapcsolat megbomlik, vérzékenység alakul ki. Munkánk során a VWF és a GPIb károsodásával járó állapotok, a von Willebrand betegség és a Bernard-Soulier szindróma diagnosztikai lehetőségeit igyekeztünk bővíteni.

Az irodalomban az elsők között vizsgáltuk a nagy nyíróerejű áramlási viszonyokkal dolgozó módszerek, a PFA-100 készülék és az O'Brien-féle filterteszt szerepét a VWB diagnosztikájában. Megállapítottuk, hogy mindkét módszer szenzitívebb a hagyományos vérzés idő meghatározásnál. A két módszer szenzitivása, specificitása, pozitív és negatív prediktív értéke egybevethető volt.

Megfigyeltük, hogy az immunturbidimetriás elven működő VWF:Ag meghatározást a reuma faktor jelenléte zavarja. Új eredményként megállapítottuk, hogy ez a hatás reagenstől függően jelentkezik. A reuma faktor befolyásoló hatása komoly tévedésre ad lehetőséget a VWB diagnosztikájában.

Egy Bernard-Soulier szindrómás beteg klinikai és genetikai vizsgálatát végeztük el. A GPIX-ben talált Asn45Ser mutáció az észak- és nyugat európai lakosság leggyakoribb, BSS-t okozó mutációja. Ennek lehetőségét figyelembe kell venni a terápia refrakter ITP-s esetek differenciális diagnózisában.

IRODALOM

Almeida AM, Khair K, Hann I, Liesner R: The use of recombinant factor VIIa in children with inherited platelet function disorders. *Br. J. Haematol.* 2003; 121: 477-481.

Bernard J, Soulier JP: Sur une nouvelle variété de dystrophie thrombocytaire-hémorragique congénitale. *Semaine Des Hopitaux De Paris* 1948; 24: 3217.

Boda Z, Tornai I, Rák K: Studies of the platelet filter test (shear dependent platelet aggregation) in patients with uncommon haemorrhagic disorders *Blood Coagul. Fibrinolysis* 1996; 7: 162-164.

Bodó I, Katsumi A, Tuley E, Schlamadinger A, Boda Z, Sadler JE: Mutations causing type 1 von Willebrand disease with high penetrance. *Blood* 1999 (Suppl.1) 94:373a.

Bowen DJ: An influence of AB0 blood group on the rate of proteolysis of von Willebrand factor by ADAMTS 13. *J. Thromb. Haemost.* 2003; 1: 33-40.

Casonato A, Pontara E, Bertomoro A, Sartorello F, Cattini MG, Girolami A: Von Willebrand factor collagen binding activity in the diagnosis of von Willebrand disease: an alternative to ristocetin co-factor activity? *Br. J. Haematol.* 2001; 112: 578-583.

Casonato A, Pontara E, Sartorello F, Cattini MG, Sartori MT, Padriani R, Girolami A: Reduced von Willebrand factor survival in type 1 von Willebrand disease. *Blood* 2002; 99: 180-184.

Castaman G, Missiaglia E, Federici AB, Schneppenheim R, Rodeghiero F: An additional unique candidate mutation (G2470A; M740I) in the original families with von Willebrand disease type 2M Vicenza and the G3864A (R1205H) mutation. *Thromb. Haemost.* 2000; 84: 350-351.

Cattaneo M, Federici AB, Lecchi A, Agati B, Lombardi R, Stabile F, Bucciarelli P: Evaluation of the PFA-100® system in the diagnosis and the therapeutic monitoring of patients with von Willebrand disease. *Thromb. Haemost.* 1999; 82: 35-39.

Cattaneo M, Pareti FI, Zighetti ML, Lecchi A, Lombardi R, Mannucci PM: Platelet aggregation at high shear is impaired in patients with congenital defects of platelet secretion and is corrected by DDAVP: correlation with the bleeding time. *J. Lab. Clin. Med.* 1995; 125: 540-547.

Clemetson JM, Kyrle PA, Brenner B, Clemetson KJ: Variant Bernard-Soulier syndrome associated with a homozygous mutation in the leucine-rich domain of glycoprotein IX. *Blood* 1994; 84: 1124-1131.

Clemetson KJ: Platelet GPIb-V-IX complex. *Thromb. Haemost.* 1997; 78: 266-270.

De Caterina R, Lanza M, Manca G, Strata GB, Maffei S, Salvatore L: Bleeding time and bleeding: an analysis of the relationship of the bleeding time test with parameters of surgical bleeding. *Blood* 1994; 84: 3363-3370.

Depraetere H, Ajzenberg N, Girma J-P, Lacombe C, Meyer D, Deckmyn H, Baruch D: Platelet aggregation induced by a monoclonal antibody to the A1 domain of von Willebrand factor. *Blood* 1998; 91: 3792-3799.

Dong JF, Gao S, Lopez JA: Synthesis, assembly and intracellular transport of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 31449-31454.

Donner M, Karpman D, Kristoffersson AC, Windqvist I, Holmberg L: Recurrent mutation Asn45Ser of glycoprotein IX in Bernard-Soulier syndrome. *Eur. J Haematol.* 1996; 57: 178-179.

Drouin J, Carson N, Laneuville O: Compound heterozygosity for a novel nine nucleotide deletion in the Asn45Ser missense mutation in the glycoprotein IX gene in a patient with Bernard-Soulier syndrome. *Am. J. Hematol.* 2005; 78: 41-48.

Favaloro EJ, Smith J, Petinos P, Hertzberg M, Koutts J: Laboratory testing for von Willebrand's disease: an assessment of current diagnostic practice and efficacy by means of a multi-laboratory survey. *Thromb. Haemost.* 1999; 82: 1276-1282. (A)

Favaloro EJ: Laboratory assessment as a critical component of the appropriate diagnosis and sub-classification of von Willebrand's disease. *Blood Reviews* 1999; 13: 185-204. (B)

Fox JE, Aggerbeck LP, Berndt MC: Structure of the glycoprotein Ib-IX complex from plasma membranes. *J. Biol.Chem.* 1988; 263: 4882-4890.

Fressinaud E, Veyradier A, Sigaud M, Boyer-Neumann C, Le Boterff C, Meyer D. Therapeutic monitoring of von Willebrand disease: interest and limits of a platelet function analyser at high shear rates. *Br. J. Haematol.* 1999; 106: 777-783.

Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, Martin I, Boyer-Neumann C, Trossaert M, Meyer D: Screening for von Willebrand disease with a new analyzer using high shear stress: a study of 60 cases. *Blood* 1998; 91: 1325-1331.

Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, Chung D: Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloprotease family. *Blood* 2001; 98: 1662-1666.

Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, Krause M, Scharrer I, Aumann V, Mittler U, Solenthaler M, Lämmle B: Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 1578-1584.

Gewirtz AS, Miller ML, Keys TF.: The clinical usefulness of the preoperative bleeding time. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1996; 120: 353-356.

Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Narks WJJ, Montgomery RR: The effect of AB0 blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987; 69: 1691-1695.

Ginsburg D, Handin RI, Bonthron DT, Donlon TA, Bruns GAP, Latt SA, Orkin SH: Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science* 1985; 228: 1401-1406.

Goodeve AC, Eikenboom JCJ, Ginsburg D, Hilbert L, Mazurier C, Peake IR, Sadler JE, Rodeghiero F: A standard nomenclature for von Willebrand factor gene mutations and polymorphisms. *Thromb. Haemost.* 2001; 85: 929-31.

Harrison P, Robinson MSC, Mackie IJ, Joseph J, McDonald SJ, Liesner R, Savidge GF, Pasi J, Machin SJ: Performance of the platelet function analyzer PFA-100® in testing abnormalities of primary haemostasis. *Blood Coag. Fibrinol.* 1999; 10: 25-31.

Hickey MJ, Roth GJ: Characterization of the gene encoding human glycoprotein IX. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 3438-3443.

Homoncik M, Blann AD, Hollenstein U, Pernerstorfer T, Eichler H-G, Jilma B: Systemic inflammation increases shear stress-induced platelet formation measured by the PFA-100. *Br. J. Haematol.* 2000; 111: 1250-1252. (A).

Homoncik M, Jilma B, Hergovich N, Stohlawetz P, Panzer S, Speiser W: Monitoring of aspirin (ASA) pharmacodynamics with the platelet function analyzer PFA-100. *Thromb. Haemost.* 2000; 83: 316-321. (B)

Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RAP, Schiphorst ME, de Groot PG, Sixma JJ, Gros P: Structures of glycoprotein Ib α and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science* 2002; 297: 1176-1179.

Iwanaga M, Kunishima S, Ikeda S, Tomonaga M, Naga T: Vulnerable mutation Trp→stop of glycoprotein IX in Japanese Bernard-Soulier syndrome. *Eur. J. Haematol.* 1998; 60: 264-266.

Kahn ML, Diacovo TG, Bainton DF, Lanza F, Trejo J, Coughlin SR: Glycoprotein V-deficient platelets have undiminished thrombin responsiveness and do not exhibit a Bernard-Soulier phenotype. *Blood* 1999; 94: 4112-4121.

Kaya Z, Gursel T, Dalgic B, Aslan D: Gastric angiodysplasia in a child with Bernard-Soulier syndrome: efficacy of octreotide in long-term management. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 2005; 22: 223-227.

Kenny D, Morateck A, Montgomery RR: The cysteine knot of platelet glycoprotein Ib β (GPIb β) is critical for the interaction of GPIb β and GPIX. *Blood* 2002; 99: 4428-4433.

Kenny D, Morateck PA, Gill JC, Montgomery RR: The critical interaction of glycoprotein (GP) IB β with GPIX – A genetic cause of Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 1999; 93: 2968-2975.

Kerényi A, Schlammadinger Á, Ajzner É, Szegedi I, Kiss Cs, Pap Z, Boda Z, Muszbek L: Comparison of the PFA-100 closure time and template bleeding time of patients with inherited disorders causing defective platelet function. *Thromb. Res.* 1999; 96: 487-492.

Koskela S, Javela K, Jouppila J, Juvonen E, Nyblom O, Partanen J, Kekomäki R: Variant Bernard-Soulier syndrome due to homozygous Asn45Ser mutation in the platelet glycoprotein (GP) IX in seven patients of five unrelated Finnish families. *Eur. J. Haematol.* 1999; 62: 256-264.

Kottke-Marchant K, Powers JB, Brooks L, Kundu S, Christie DJ: The effect of antiplatelet drugs, heparin and preanalytical variables on platelet function detected by the platelet function analyzer (PFA-100). *Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis* 1999; 5: 122-130.

Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Ostgaard RA : Characterization of an in vitro platelet function analyzer, PFA-100™. Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis 1996; 2: 214-249.

Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Ostgaard RA: Description of an in vitro platelet function analyzer – PFA-100. Semin. Thromb. Hemost. 1995; 21 (Suppl. 2): 106-112.

Kunishima S, Tomiyama Y, Honda S, Kurata Y, Kamiya T, Ozawa K, Saito H: Cys97→Tyr mutation in the glycoprotein IX gene associated with Bernard-Soulier syndrome. Br. J. Haematol. 1999; 107: 539-545.

Lanza F, De la Salle C, Baas MJ, Schwartz A, Boval B, Cazenave JP, Caen JP: A Leu7Pro mutation in the signal peptide of platelet glycoprotein (GP)IX in a case of Bernard-Soulier syndrome abolishes surface expression of the GPIb-V-IX complex. Br. J. Haematol. 2002; 118: 260-266.

Lanza F, Morales M, de La SC, Cazenave JP, Clemetson KJ, Shimomura T, Phillips DR: Cloning et characterization of the gene encoding the human platelet glycoprotein V. A member of the leucin-rich glycoprotein family cleaved during thrombin induced platelet activation. J. Biol. Chem. 1993; 268: 20801-20807.

Laurell C: Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. Anal. Biochem. 1966; 15: 45.

Li CQ, Dong JF, Lanza F, Sanan DA, Sae-Tung G, Lopez JA: Expression of platelet glycoprotein (GP) V in heterologous cells and evidence for its association with GPIb α in forming a GPIb-IX-V complex on the cell surface. J. Biol. Chem. 1995; 270: 16302-16307.

Li CQ, Dong JF, Lopez JA: The mucin-like macroglycopeptid region of glycoprotein Ib α is required for cell adhesion to immobilized von Willebrand factor (VWF) under flow but not for static VWF binding. *Thromb. Haemost.* 2002; 88: 673-677.

Lind SE: The bleeding time does not predict surgical bleeding. *Blood* 1991; 77: 2547-2552.

Locatelli F, Rossi G, Balduini C: Hematopoietic stem-cell transplantation for Bernard-Soulier syndrome. *Ann. Intern. Med.* 2003; 138: 79.

Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC: Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 1998; 91: 4397-4418.

Lopez JA, Chung DW, Fujikawa K, Hagen FS, Davie EW, Roth GJ: The α and β chains of human platelet glycoprotein Ib are both transmembrane proteins containing a leucin-rich amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 2135-2139.

Lopez JA, Dong JF: Cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13 on endothelial cells. *Semin. Hematol.* 2004; 41: 15-23.

Lopez JA, Weisman S, Sanan DA, Sih T, Chambers M, Li CQ: Glycoprotein (GP) Ib β is the critical subunit linking GPIb α and GPIX in the GPIb-IX complex. Analysis of partial complexes. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 23716-23721.

Madan M, Berkowitz SD, Christie DJ, Jennings LK, Smit AC, Sigmon KN, Glazer S, Tchong JE: Rapid assessment of glycoprotein IIb/IIIa blockade with the platelet

function analyzer (PFA-100) during percutaneous coronary intervention. *Am. Heart J.* 2001; 141: 226-233.

Mammen EF, Comp PC, Gosselin R, Greenberg C, Hoots K, Kessler CM, Larkin EC, Liles D, Nugent DJ: PFA-100TM system: a new method for assessment of platelet dysfunction. *Semin. Thromb. Haemost.* 1998; 24: 195-202.

Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Lester-Mancuso TL, Le Beau MM, Sorace JM, Sadler JE: Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry* 1991; 30: 253-269.

Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Alevy YG, Sadler JE : Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 19514-19527.

Mannucci PM, Lombardi R, Castaman G, Dent JA, Lattuada A, Rodeghiero F, Zimmermann TS: Von Willebrand disease "Vicenza" with larger-than-normal (supranormal) von Willebrand factor multimers. *Blood* 1988; 71: 65-70.

Marti T, Roesslet S, Titani K, Walsh KA: Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry* 1987; 26: 8099-8109.

Matsui T, Fujimura Y, Nishida S, Titani K: Human plasma alpha 2-macroglobulin and von Willebrand factor possess covalently linked AB0(H) blood group antigens in subjects with with corresponding AB0 phenotype. *Blood* 1993; 82: 663-668.

Matsui T, Titani K, Mizuochi T: Structures of the asparagine-linked oligosaccharide chains of human von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 8723-8731.

Meskal A, Vertessen F, Van der Planken M, Berneman ZN. The platelet function analyzer (PFA-100) may not be suitable for monitoring the therapeutic efficiency of von Willebrand concentrate in type III von Willebrand disease. *Ann. Hematol.* 1999; 78: 426-430.

Meyer D, Fressinaud E, Hilbert L, Ribba AS, Lavergne JM, Mazurier C: Type 2 von Willebrand disease causing defective von Willebrand factor-dependent platelet function. *Best Practice and Research Clinical Haematology* 2001; 14: 349-364.

Miller JL, Lyle VA, Cunningham D: Mutation of leucin-57 to phenylalanine in a platelet glycoprotein Ib α - leucin tandem repeat occurring in patients with an autosomal dominant variant of Bernard-Soulier disease. *Blood* 1992; 79: 439-446.

Moshfegh K, Lengweiler S, Häner M, Aebi U, Steiner B, Beer JH: Fine structural and functional consequences of the deglycosilation of the platelet adhesion receptor GPIb-IX (CD42b). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 249: 903-909.

Ni H, Ramakrishnan V, Ruggeri ZM, Papalia JM, Phillips DR, Wagner DD: Increased thrombogenesis and embolus formation in mice lacking glycoprotein V. *Blood* 2001; 98: 368-373.

Nishio K, Anderson PJ, Zheng X, Sadler JE: Binding of platelet glycoprotein Ib α to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2004; 101: 10578-10583.

Noda M, Fujimura K, Takafuta T, Shimomura T, Fujii T, Katsutani S, Fujimoto T, Kuramoto A, Yamazaki T, Mochizuki T, Matsuzaki M, Sano M: A point mutation in glycoprotein IX coding sequence (Cys73(TGT) to Tyr(TAT)) causes impaired surface expression of GPIb/IX/V complex in two families with Bernard-Soulier syndrome. *Thromb. Haemost.* 1996; 76: 874-878.

Noda M, Fujimura K, Takafuta T, Shimomura T, Fujimoto T, Yamamoto N, Tanoue K, Arai M, Suehiro A, Kikishita E, Shimasaki A, Kuramoto A: Heterogenous expression of glycoprotein Ib, IX and V in platelets from two patients with Bernard-Soulier Syndrome caused by different genetic abnormalities. *Thromb. Haemost.* 1995; 74: 1411-1415.

Noris P, Arbustini E, Spedini P, Belletti S, Balduini CL: A new variant of Bernard-Soulier syndrome characterized by dysfunctional glycoprotein (GP) Ib and severely reduced amounts of GPIX and GPV. *Br. J. Haematol.* 1998; 103: 1004-1013.

Noris P, Simsek S, Stibbe J, von dem Borne AEGKr: A phenylalanine-55 to serine amino-acid substitution in the human glycoprotein IX leucine-rich repeat is associated with Bernard-Soulier syndrome. *Br. J. Haematol.* 1997; 97: 312-320.

Novák L, Deckmyn H, Damjanovich S, Hársfalvi J: Shear-dependent morphology of von Willebrand factor bound to immobilized collagen. *Blood* 2002; 99: 2070-2076.

O'Brien JR, Etherington MD: Anti-glycoprotein Ib causes platelet aggregation: different effects of blocking glycoprotein Ib and glycoprotein IIb/IIIa in the high shear filterometer. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 1998; 9: 453-461.

O'Brien JR, Salmon GP: Shear stress activation of platelet glycoprotein IIb/IIIa plus von Willebrand factor causes aggregation: filter blockage and the long bleeding time in von Willebrand's disease. *Blood* 1987; 70: 1354-1361.

Pareti FI, Cattaneo M, Carpinelli L, Zighetti ML, Bressi C, Mannucci PM, Ruggeri ZM: Evaluation of the abnormal platelet function in von Willebrand disease by the blood filtration test. *Thromb. Haemost.* 1996; 75: 460-468.

Peters M, Heijboer H: Treatment of a patient with Bernard-Soulier syndrome and recurrent nose-bleeds with recombinant FVIIa. *Thromb. Haemost.* 1998;80: 352.

Ramakhrisnan V, Reeves PS, DeGuzman F, Deshpande U, Ministri-Madrid K, DuBridge R, Phillips DR: Increased thrombin responsiveness in platelets from mice lacking glycoprotein V. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 96: 13336-13341.

Ribba AS, Loisel I, Lavergne JM, Juhan-Vague I, Obert B, Cherel G: Ser968Thr mutation within the A3 domain of von Willebrand factor (VWF) in two related patients leads to a defective binding of VWF to collagen. *Thromb. Haemost.* 2001; 86: 848-854.

Rivera CE, Villagra J, Riordan M, Williams S, Lindstrom JK, Rick ME: Identification of a new mutation in platelet glycoprotein IX (GPIX) in a patient with Bernard-Soulier syndrome. *Br. J. Haematol.* 2001; 112: 105-108.

Rodeghiero F, Castaman G, Dini E: Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 1987; 69: 454-459.

Rodgers RP, Levin J: A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin. Thromb. Hemost.* 1990; 16: 1-20.

Ruggeri ZM: Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J. Thromb. Haemost.* 2003; 1: 1335-1342.

Ruggeri ZM: Von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* 1997; 100: S41-S46.

Sachs UJH, Kroll H, Matzdorff AC, Berghöfer H, Lopez JA, Santoso S: Bernard-Soulier syndrome due to the homozygous Asn-45Ser mutation in GPIX: an unexpected, frequent finding in Germany *Br. J. Haematol* 2003; 123: 127-131.

Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E, Bochkov N, Boulyjenkov V, Ginsburg D, Meyer D, Peake I, Rodeghiero F, Srivastava A: Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromb. Haemost.* 2000; 84: 160-174.

Sadler JE: A revised classification of von Willebrand disease. *Thromb. Haemost.* 1994; 71: 520-525.

Sadler JE: Aortic stenosis, von Willebrand factor and bleeding. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349: 323-325.

Sadler JE: New concepts in von Willebrand disease. *Annu. Rev. Med.* 2005; 56: 173-191.

Sadler JE: Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. *Blood* 2003; 101: 2089-2093.

Sae-Tung G, Dong JF, Lopez JA: Biosynthetic defect in platelet glycoprotein IX mutants associated with Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 1996; 87: 1361-1367.

Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM: Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998; 94: 657-666.

Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM: Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996; 84: 289-297.

Savage B, Sixma JJ, Ruggeri ZM: Functional self-association of von Willebrand factor during platelet adhesion under flow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 425-430.

Savoia A, Balduini CL, Savino M, Noris P, Del Vecchio M, Perotta S, Belletti S, Poggi V, Iolascon A: Autosomal dominant macrothrombocytopenia in Italy is most frequently a type of heterozygous Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 2001; 97: 1330-1335.

Schneppenheim R, Obser T, Drewke E, Gross-Wieltsch U, Oyen F, Sutor AH: Isolated molecular defects of von Willebrand factor binding to collagen do not correlate with bleeding symptoms. *Blood* 2001; 98: 165 (abstr.)

Schneppenheim R, Budde U: Phenotypic and genotypic diagnosis of von Willebrand disease: A 2004 update. *Semin. Hematol.* 2005; 42: 15-28.

Schneppenheim R, Federici AB, Budde U, Castaman G, Drewke E, Krey S, Mannucci PM, Riesen G, Rodeghiero F, Zieger B, Zimmermann R: Von Willebrand disease type 2M Vicenza in Italian and German patients: identification of the first candidate mutation (G3864A; R1205H) in 8 families. *Thromb. Haemost.* 2000; 82: 136-140.

Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant K, Eppell SJ, Wilson LD, Marchant RE: Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* 1996; 88: 2939-2950.

Suzuki K, Hayashi T, Akiba J, Satoh S, Kato T: Phenotypic consequence of the gene abnormality in the platelet glycoprotein IX gene observed in a patient with Bernard-Soulier syndrome through mammalian cell expression system. *Thromb. Res.* 1999; 95: 295-302.

Suzuki K, Hayashi T, Yahagi A, Akiba J, Tajima K, Satoh S, Sasaki H: Novel point mutation in the leucine-rich motif of the platelet glycoprotein IX associated with Bernard-Soulier syndrome. *Br. J. Haematol.* 1997; 99: 794-800.

Titani K, Kumar S, Takio K, Ericsson LH, Wade RD, Ashida K, Walsh KA, Chopek MW, Sadler JE, Fujikawa K: Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry* 1986; 25: 3171-3184.

Tornai I, Arnout J, Deckmyn H, Peerlink K, Vermeylen J: A monoclonal antibody recognizes a von Willebrand factor domain within the amino-terminal portion of the subunit that modulates the function of the glycoprotein Ib- and IIb/IIIa-binding domains. *J. Clin. Invest.* 1993; 91: 273-282.

Toyohama T, Nagasaki A, Gushi K, Tamaki K, Masuda M, Takasu N: Recurrent mutation Trp126→stop of glycoprotein IX in Japanese Bernard-Soulier syndrome. *Platelets* 2003; 14: 197-198.

Tsai HM, Lian ECY: Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 1585-1594.

Tsai HM: Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* 1996; 87: 4235-4244.

Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs N, Vauterin S, Schlammadinger A, Mazurier C, Deckmyn H: A reliable and reproducible ELISA method to measure ristocetin cofactor activity of von Willebrand factor. *Thromb. Haemost.* 2000; 83: 107-113.

Vanhoorelbeke K, Pareyn I, Schlammadinger A, Vauterin S, Hoylaerts MF, Arnout J, Deckmyn H: Plasma glyocalicin as a source of GPIIb/IIIa in the von Willebrand factor ristocetin cofactor ELISA. *Thromb. Haemost.* 2005; 93: 165-171.

Vermynen J, Bottecchia D, Szpilman H: Factor VIII and human platelet aggregation. III. Further studies on aggregation of human platelets by neuraminidase-treated human factor VIII. *Br. J. Haematol.* 1976; 34: 321-330.

Vermynen J, De Gaetano G, Donati MB, Verstraete M: Platelet aggregating activity in neuraminidase-treated human cryoprecipitates: its correlation with factor VIII related antigen. *Br. J. Haematol.* 1974; 26: 645-650.

Veyradier A, Fressinaud E, Sigaud M, Wolf M, Meyer D: A new automated method for von Willebrand factor antigen measurement using latex particles. *Thromb. Haemost.* 1999; 81: 320-321.

Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T, Six I, Fabre O, Juthier F, Bauters A, Decoene C, Goudemand J, Prat A, Jude B: Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349: 343-349.

Wagner DD, Mayadas T, Marder WJ: Initial glycosylation and acidic pH in the Golgi apparatus are required for multimerization of von Willebrand factor. *J. Cell Biol.* 1986; 102: 1320-1324.

Wang Z, Zhao X, Duan W, Fu J, Lu M, Wang G, Bai X, Ruan C: A novel mutation in the transmembrane region of glycoprotein IX associated with Bernard-Soulier syndrome. *Thromb. Haemost.* 2004; 92: 606-613.

Wenger RH, Kieffer N, Wicki AN, Clemetson KJ: Structure of the human blood platelet membrane glycoprotein Ib alpha gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 156: 389-395.

Wenger RH, Kieffer N, Wicki AN, Clemetson KJ: Structure of the human blood platelet membrane glycoprotein Ib α gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1988; 156: 389-395.

Wright SD, Michaelides K, Johnson DJD, West NC, Tuddenham EGD: Double heterozygosity for mutations in the platelet glycoprotein IX gene in three siblings with Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 1993; 81: 2339-2347.

Yagi M, Edelhoff S, Disteche CM, Roth GJ: Structural characterization and chromosomal location of the gene encoding human platelet glycoprotein Ib beta. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 17424-17427.

Zieger B, Budde U, Jessat U, Zimmermann R, Simon M, Kätzel R, Sutor AH: New families with von Willebrand disease type 2M (Vicenza). *Thromb. Res.* 1997; 87: 57-64.

Zimmerman TS, Ratnoff OD, Powell AE: Immunologic differentiation of classic hemophilia (FVIII deficiency) and von Willebrand's disease. With observations on

combined deficiencies of antihemophilic factor and proaccelerin (Factor V) and on an acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor. J. Clin. Invest. 1971; 50: 244-254.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Kerényi A, **Schlammdinger Á**, Ajzner É, Szegedi I, Kiss Cs, Pap Z, Boda Z, Muszbek L: Comparison of the PFA-100 closure time and the template bleeding time of patients with inherited disorders causing defective platelet function. Thrombosis Research 1999; 96: 487-492.

Impakt faktor: 1,207

Schlammdinger Á, Kerényi A, Muszbek L, Boda Z: Comparison of the O'Brien filter test and the PFA-100 platelet analyzer in the screening and laboratory diagnosis of von Willebrand's disease. Thrombosis and Haemostasis, 2000,; 84: 88-92.

Impakt faktor: 4,372

Schlammdinger Á, Kerényi A, Muszbek L, Boda Z: A nagy nyíróerejű áramlási viszonyokat vizsgáló módszerek szerepe a von Willebrand betegség szűrésében és diagnosztikájában Orvosi Hetilap, 2000; 141 (41), 2245-2250.

Vanhoorelbeke K, **Schlammdinger A**, Delville JP, Handsaeme J, Vandecasteele G, Vauterin S, Pradier O, Wijns W, Deckmyn H: Occurrence of the Asn45Ser mutation in the GPIX gene in a Belgian patient with Bernard-Soulier syndrome. Platelets, 2001; 12 (2): 114-120.

Impakt faktor: 0,778

Schlammdinger A, Boda Z.: Laboratory screening and diagnosis of von Willebrand's disease. Clinical Laboratory. 2002; 48(7-8): 385-93.

Schlammdinger Á, Vanhoorelbeke K, László P, Bereczky Zs, Muszbek L, Deckmyn H, Boda Z: Von Willebrand factor antigen latex immunoassays are

affected to a different extent by rheumatoid factor. Közlésre elfogadva a Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis-ba

Impakt faktor (2004): 1,086

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 7,443

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ SZOROSAN NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Boda Z, László P, Pfliegler Gy, Tornai I, Rejtő L, **Schlammadinger Á**: Thrombophilia, anticoaguláns terápia és terhesség. Orvosi Hetilap 1998; 139 (52) 3113-6.

Rejtő L, **Schlammadinger Á**, László P, Kiss A, Telek B, Boda Z : Az O'Brien-féle filterteszt szerepe a nagy thrombocytaszámmal járó kórképek differenciális diagnózisában. Orvosi Hetilap 1998; 139: 1961-64.

Boda Z, László P, Pfliegler Gy, Tornai I, Rejtő L, **Schlammadinger Á**: Low molecular weight heparin as thromboprophylaxis throughout pregnancy in heritable thrombophilic women. Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis 1999; 5 (3): 198-199.

Impakt faktor: 0,659

Tornai I, Juhász A, Boda Z, **Schlammadinger Á**, Juhász A, Cauwenberghs N, Deckmyn H, Hársfalvi J: Acquired Bernard-Soulier syndrome: a case with necrotizing vasculitis and thrombosis. Haemostasis 1999; 29: 229-236.

Impakt faktor: 0,879

Rejtő L, **Schlammadinger Á**, László P, Kiss A, Telek B, Boda Z : Use of a platelet filter test in patients with thrombocytosis. Platelets 2000; 11:38-42.

Impakt faktor: 0,965

Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs N, Vauterin S, **Schlammadinger Á**, Mazurier C, Deckmyn H: A reliable and reproducible ELISA method to measure ristocetin cofactor activity of von Willebrand factor. *Thromb. Haemost.* 2000; 83: 107-113

Impakt faktor: 4,372

Cauwenberghs N, **Schlammadinger A**, Vauterin S, Cooper S, Descheemaeker G, Tornai I, Deckmyn H: Fc-receptor dependent platelet aggregation induced by monoclonal antibodies against platelet glycoprotein Ib or von Willebrand factor. *Thrombosis and Haemostasis* 2001; 85: 679-85.

Impakt faktor: 4,91

Boda Z, **Schlammadinger A**, László P, Lakos G, Kerényi A, Pfliegler Gy, Rázsó K, Pósn E: Nagy dózisú kis molekulatömegű heparinprofilaxis sikere antifoszfolipid szindrómás terhesekben. *Orvosi Hetilap* 2003; 144 (23), 1131-1134.

Vanhoorelbeke K, Pareyn I, **Schlammadinger A**, Vauterin S, Hoylaerts MF, Arnout J, Deckmyn H: Plasma glycocalicin as a source of GPIbalph in the von Willebrand factor ristocetin cofactor ELISA. *Thrombosis and Haemostasis* 2005; 93(1): 165-71.

Impakt faktor (2004) : 3,41

**Az értekezés témájához nem szorosan kapcsolódó közlemények
összasított impakt faktora: 15,195**

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ IDÉZHETŐ ABSZTRAKT

Bodó I, Katsumi A, Tuley E, **Schlamadinger Á**, Boda Z, Sadler JE: Mutations causing dominant type 1 von Willebrand disease with high penetrance (abstract) Blood 1999; 94 (10) Suppl. 1. P:373

KÖNYVFEJEZETEK

- 1, Akut myocardialis infarctus thrombolyticus kezelése
- 2, „Aspirin-like” betegség
- 3, Bernard-Soulier-szindróma
- 4, Christmas betegség
- 5, Glanzmann thrombasthenia
- 6, Haemophilia A
- 7, „Storage pool” betegség
- 8, Willebrand-betegség

In: Betegség enciklopédia, Springer Tudományos Kiadó, Budapest, 2002.

- 1, A von Willebrand betegség története
- 2, A von Willebrand betegség tünetei
- 3, A von Willebrand betegség terápiája

In: Thrombosis és vérzékenység, Medicina Kiadó, Budapest, 2006.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ, ELSŐ SZERZŐKÉNT BEMUTATOTT KONGRESSZUSI ANYAGOK

Schlammdinger Á, Boda Z: A vénás occlusio hatása az O'Brien-féle filtertesztre. (Országos Ph.D Konferencia, Debrecen, 1996).

Schlammdinger Á, Boda Z: A nagy nyíróerejű áramlási viszonyok közötti thrombocyta aggregáció vizsgálata artériás érbetegekben (Fiatal Kutatók Fóruma, Országos Cserhádi István Emlékülés, Szeged, 1996).

Schlammdinger Á, Rejtő L, Boda Z: Az O'Brien-féle filterteszt szerepe a nagy thrombocytaszámmal járó állapotok differenciális diagnózisában (Belgyógyász Szakcsoporthülés, 1997 Miskolc, Ph.D Konferencia, Debrecen, 1998).

Schlammdinger Á, Kerényi A, Muszbek L, Boda Z: Comparison of the O'Brien filter test and the PFA-100 in the diagnosis of vWD (12th Symposium of the Danubian League against Thrombosis and Haemorrhagic Disorders Homburg/Saar, Németország, 2000).

Schlammdinger Á, Kerényi A, László P., Muszbek L., Boda Z.: Comparison of the PFA-100 system and the O'Brien filter test in the screening and diagnosis of von Willebrand's disease. (XVIIth Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis, Washington D.C., Egyesült Államok, 1999).

Schlammdinger Á, Bodó I, Boda Z: Von Willebrand kóros beteg esete: A betegről a génig. (A Magyar Thrombosis és Haemostasis Társaság Debreceni Szimpóziuma és a Magyar Laboratóriumi Társaság Haemostasis Munkacsoport Fóruma, Debrecen, 2002).

Schlammadinger Á, Altorjay I, Boda Z: Súlyos, recidiváló gastrointestinalis vérzés kezelése 2B típusú Willebrand betegségben (esetismertetés). (A Magyar Belgyógyász Társaság Északkelet-Magyarországi Szakcsoportjának Tudományos Ülése, Eger, 2002).

Schlammadinger Á, Rázsó K, Pósn E, Pfliegler Gy, Boda Z: Thrombocyta koncentrátum a Willebrand kóros betegek súlyos vérzéseinek kezelésében (a Magyar Belgyógyász Társaság XXXIX. Nagygyűlése, Budapest, 2002).

Schlammadinger Á: Új módszerek a von Willebrand betegség diagnosztikájában. (A von Willebrand betegség szülészeti és nőgyógyászati vonatkozásai szimpózium. Budapest, 2003).

Schlammadinger Á, Rázsó K, Pósn E, Pfliegler Gy, Boda Z: The role of platelet concentrate in the treatment of von Willebrand's disease (XIXth Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis, Birmingham, Anglia, 2003).

Schlammadinger Á: Von Willebrand's disease. New aspects of the diagnosis. (10th Anniversary of the Laboratory for Thrombosis Research, Kortrijk, Belgium. 2004).

Schlammadinger Á, Bereczky Zs, László P, Muszbek L, Boda Z: A reuma faktor zavaró hatása az immunturbidimetriás elven működő von Willebrand faktor antigén meghatározásra. (A Magyar Belgyógyász Társaság XL. Nagygyűlése. Budapest, 2004).

Schlammadinger Á: A VWF antigén szint mérése. A DDAVP terhelés és VWF tesztek. (A von Willebrand betegség laboratóriumi diagnosztikája szimpózium. Budapest, 2005).

Schlammdinger Á: Új eredmények a von Willebrand betegség klinikai kutatásában. (Nagyerdei Belgyógyászati Tudományos Napok. Debrecen, 2005).

Schlammdinger Á, Ligeti R, Oláh Zs, Rázsó K, László P, Boda Z: Recurrent haemorrhagic corpus luteum in a patient with severe von Willebrand's disease. (International Symposium on Women's Health Issues in Thrombosis and Haemostasis, Budapest, Magyarország, 2005).

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm mindenekelőtt témavezetőmnek, Boda Zoltán professzor úrnak, hogy elindított a haemostaseologia irányába és az elmúlt években mindig bízott bennem és támogatott.

Köszönettel tartozom Hársfalvi Jolán tanárnőnek és Tornai István tanár úrnak, akik lehetővé tették számomra, hogy bekapcsolódhassak a Leuveni Katolikus Egyetem Kortrijki Campusán folyó haemostasis kutatásba és szükség esetén tanácsaikkal segítségemre voltak.

Nagyon sok hálával gondolok belgiumi tutoraimra, Hans Deckmyn professzor úrra és Karen Vanhoorelbeke professzornőre a tőlük kapott szakmai és emberi segítségért.

Köszönöm Szüleimnek, hogy szeretetükkel és bölcsességükkel mindig mellettem voltak.

**AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK
KÜLÖNLENYOMATAI**