

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Dr. Schlammadinger Ágota

Témavezető: Prof. Dr. Boda Zoltán

Programvezető: Prof. Dr. Muszbek László

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
BELGYÓGYÁSZATI INTÉZET
II. SZ. BELGYÓGYÁSZATI KLINIKA
HAEMOSTASEOLOGIAI TANSZÉK
DEBRECEN**

2006

BEVEZETÉS

Haemostasison azon rendkívül bonyolult és jól szabályozott folyamatok összességét értjük, melyek biztosítják, hogy az érpálya megszakadását követően a vérzés megálljon, és a feleslegessé váló vérrög lebontódjon. Ez a folyamat több lépcsőből áll: első az adhézió, a vérlemezkék kitapadása a sérült érfalhoz, melyet a thrombocyták aktiválódása és aggregációja követ (primer haemostasis). Ezzel párhuzamosan megindul a véralvadási kaszkád, és ennek eredményeként létrejön a thrombocytá thrömbust megerősítő fibrinháló (szekunder haemostasis). A keletkezett véralvadékat a fibrinolitikus rendszer bontja el. A keringés artériás oldalán, különösen a mikrocirkuláció arterioláiban a gyors áramlás és a vér rétegei között fellépő nagy nyíróerő miatt az adhézió létrejöttéhez igen nagy erejű kötésre van szükség, mely az áramló thrombocytaakat az érfalhoz pályvázza, mozgásukat lelassítja, és lehetővé teszi, hogy a most már lassan görgő vérlemezkék aktiválódjanak, és az érfalhoz stabilan kapcsolódjanak. Ezt az alapvető fontosságú, nagy erejű, gyors kinetikájú kötetést a von Willebrand faktor (VWF) hozza létre a subendotheliális struktúrák és thrombocytá felszíni receptora, a GPIIb/IIIa/V komplex között.

A von Willebrand faktor óriási, multimer szerkezetű glikoprotein, mely a megakaryocytákban és az endothel sejtekben szintetizálódik. Az endothel sejtek a multimerék 95 %-át folyamatosan szekretálják, 5 % pálcika alakú, membránnal fedett organelumokban, az ún. Weibel-Palade testekben tárolódik és csak bizonyos indukáló hatásokra (thrombin, hisztamin, adrenerg stressz, 1-deamino-8-D-arginin vazopresszin – DDAVP) szabadul ki a keringésbe. A megakaryocytákban és a vérlemezkékben csak ez utóbbi, indukált szekréció működik, a multimerék az α -granulumokban tárolódnak. A VWF multimerék tömege 500 kD-tól (dimer) 20000 kD-ig változhat, a Weibel-Palade testekben és az α -granulumokban viszont még ennél is nagyobb, ún. ultranagy multimerék is jelen vannak és indukáló hatásra a

keringésbe kerülnek. A VWF-nak kettős funkciója van: egyrészt biztosítja az adhézió létrejöttét nagy nyíróerejű áramlási viszonyok között, másrészt a véralvadás VIII-as faktorát (FVIII) stabilizálja, megvédi a proteolízistól.

Ha a VWF mennyisége csökken vagy funkciója károsodik, változó súlyosságú, bőr – és nyálkahártya vérzésekkel járó vérzékenység, von Willebrand betegség (VWB) alakul ki. A VWB a leggyakoribb veleszületett vérzékenység, prevalenciáját egyes források 1%-nak adják meg. 1-es és 3-as típusú VWB kvantitatív VWF defektust jelent: az 1-es típus a VWF részleges, a 3-as a VWF teljes hiányát. A 2-es típus lényege a VWF funkcionális károsodása: 2A altípusban a dimerizáció/multimerizáció zavara vagy a VWF-t bontó metalloproteáz (ADAMTS13) iránti fokozott érzékenység miatt hiányoznak a haemostasis szempontjából legaktívabb nagy multimerok. 2B típusban a VWF GPIb-t kötő A1 doménjének mutációja következtében fokozott a VWF-GPIb kapcsolódás, ami a nagy multimerok eltűnésével és thrombocytopeniával jár. 2M típusú VWB károsodott VWF funkciót jelez multimer eltérés nélkül, míg a 2N altípus a FVIII kötés zavarát jelöli.

A VWB diagnosztikája számos, speciális, időigényes laboratóriumi vizsgálatot igényel. Ezért van szükség gyorsan és egyszerűen kivitelezhető, a vérzékenységet megerősítő szűrőtesztekre, melyek bárhol elérhetőek. A mindennapi laboratóriumi diagnosztikában a vérzékenység leggyakrabban használt szűrőtesztje még mindig a *vérzés idő* meghatározás. A standardizálási próbálkozások ellenére sok kritika érte a módszer szenzitivitását. 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 vérral dolgoznak és a nagy nyíróerejű áramlási viszonyok közötti thrombocyta adhéziót és aggregációt modellezik. A legelterjedtebb ilyen eszköz a *PFA-100 (Platelet Function Analyzer)* készülék. A gép 5000-6000 s⁻¹ nyíróarányt hoz létre oly módon, hogy vákuum segítségével a citráttal antikoagulált

vért egy kapillárison keresztül felszívja és átáramoltatja egy nitrocellulóz membrán 150 µm nagyságú nyílásán. A sérült érfalat úgy modellezzük, hogy a membránt I-es típusú kollagénnel vonják be. A készülékhez két különböző patront gyártanak: az egyikben adrenalin, 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. Egy másik, nagy nyíróerejű áramlási viszonyokat modellező módszer az *O'Brien* által leírt *filter teszt*. A módszer lényege, hogy 0,1-3,4 µm átmérőjű üvegszálakból álló filteren 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 arányát megadjuk. A másik jellemző paraméter a záró csepkszám. Definíció szerint azt a csepkszámot jelenti, amelynél 5 s alatt már csak egy csepp vér jut át a filteren. A két módszer közös vonása, hogy kapilláris méretű pórusokon teljes vért présel át nagy nyomással, így módon nagy nyíróerejű áramlási viszonyokat hozva létre. Működésükhöz a VWF és a GPIb és a GPIIb/IIIa thrombocyta receptorok jelenléte szükséges.

A VWB-re specifikus tesztek közül a diagnózis alapja a VWF mennyiségét tükröző *von Willebrand faktor antigén (VWF:Ag)* meghatározás. A hagyományos meghatározási mód a Laurell-elektroforézis. A legnagyobb szenzitivitása az ELISA módszerrel mért VWF:Ag szint mérésnek van, 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. 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. Ha a VWF mennyisége és aktivitása párhuzamosan csökken, a VWF szintézis mennyiségi zavaráról van szó. Ha a funkcionális tesztek csökkenése domináns (aktivitási teszt/VWF:Ag < 0,7), 2-es típusú VWB feltételezhető. Ezen belül az altípusokat diszkriminatív tesztek segítségével különíthetjük el. Ezen tesztek közé tartozik a risztocetin indukálta thrombocytá aggregáció (RIPA) vizsgálata, a VWF multimer analízise SDS agaróz gélelektroforézissel illetve a VIII-as faktor kötő képesség (VWF:FVIII B) ELISA módszerrel történő meghatározása.

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. 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 hiánya vagy funkcionális defektusa következtében jön létre az első leíróról Bernard-Soulier szindrómának (BSS) elnevezett kórkép. Klinikailag – a VWB-hez hasonlóan – bőr- és nyálkahártyavérzések jellemzik. A BSS a von Willebrand betegségnél jóval ritkábban fordul elő, prevalenciája kisebb, mint 1/1000000 az irodalomban ismertett esetek alapján. Öröklődése autoszomális recesszív. A BSS gyanúját a változó mértékű, többnyire mérsékelt thrombocytopenia és a vérkenetben észlelt óriás thrombocyták vethetik fel. A thrombocytopenia miatt nem egyszer a kórképet immun thrombocytopeniás purpurának tartják és a betegek ennek megfelelő kezelésben részesülnek. A diagnózist a risztocetin indukálta thrombocytá aggregáció hiánya erősíti meg, mely a von Willebrand betegséggel ellentétben normál plazmával nem korrigálható. 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. GPIIb β kivételével valamennyi gén kódoló szekvenciája egy exonon belül található. Bernard-Soulier kórt a GPI α -t, a GPI 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.

CÉLKITŰZÉSEK

- 1, A nagy nyíróerejű áramlási viszonyokkal dolgozó módszerek hatékonyságának vizsgálata saját betegeinknél 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 összevetése a hagyományos vérzés idő meghatározással.

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

- 3, Egy BSS-ben szenvedő beteg vizsgálata, a genetikai háttér tisztázása.
- A, A mutáció valószínű lokalizációjának meghatározása a GPIb/IX/V komplex egyes elemeinek mennyiségi vizsgálatával.
 - B, A GPIb/IX/V komplex génjeinek PCR amplifikációja és szekvenálása.
 - C, Restriktációs enzim analízissel a homo- vagy heterozygota állapot megállapítása.

BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Ad 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. Harminc betegünk közül huszonkettőnek volt 1-es, kettőnek 2A, háromnak 2B és háromnak 3-as típusú betegsége. Az 1-es típusú vWB-ben szenvedő betegeknél 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 ± 8.5 (23 — 50) év volt.

A *quantitatív 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, USA), a Ristocetin Cofactor Assay-vel (Helena Laboratories, Beaumont, Texas) határoztuk meg. A *FVIII:C* aktivitás mérése az APTI időgyári hiányplazmával (Organon Teknika) történő meghatározásán alapult. A *risztomycin indukálta thrombocyta aggregáció (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 „Bevezetésben” leírt módon kivitelezük. Röviden: heparinnal és citráttal antikoagulált teljes vért áramoltattunk át egy üvegszálakból álló szűrőn. Az átjutó cseppek számát egy érzékelő segítségével a műszer kijelezte és ezt 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 vérlemezke szám ismeretében a visszatartott thrombocyták mennyiségét kiszámoltuk. A módszert a záró cseppszámmal és a százalékban megadott thrombocyta retenciával jellemeztük.

A *PFA-100 (Platelet Function Analyzer, Dade International Inc., Miami, FL, USA)* működését az „Bevezetés”-ben részleteztük. A vizsgálathoz citráttal antikoagulált vért használtunk. A vizsgálat a vérvételtől számított két órán belül megtörtént. Eredményként a záródási időt (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. Az egyes módszereket szenzitivitásuk, specificitásuk, pozitív és negatív prediktív értékük alapján jellemeztük.

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

J.K. 53 éves betegünk anamnézisében gyermekkora óta szerepel vérzékenység. Orrvérzések és foghúzást követő erős vérzés miatt többször részesült transzfúzióban. Gyermekei (J.I. és J.L.) szintén vérzékenyek (szülést követő vérzés, orrvérzések). Részletes laboratóriumi és genetikai vizsgálatok alapján 2M Vicenza típusú VWB igazolódott. 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). Referenciaként meghatároztuk a *VWF:Ag szintet ELISA módszerrel*, VWF elleni poliklonális antitestekkel (Dako, Glostrup, Dánia). A *risztocetin kofaktor aktivitás* mérése részben hagyományos módon, liofilizált vérlemezkék agglutinációjával történt a Ristocetin Cofactor Assay-vel, részben pedig *egy új ELISA módszerrel*, mely a plazma VWF glycolalicinhez való kötődését méri risztocetin jelenlétében. Röviden: az ELISA lemezt 24B3 jelű, GPIIb α elleni monoklonális antitesttel inkubáltuk, 3%-os tejpórral blokkoltuk és thrombocytaszegény plazmával történő inkubáció révén glycolalicinnel fedtük. A lemezre vitt minták 1 mg/ml végkoncentrációjú risztocetint (Abp, New Jersey, USA) tartalmaztak. A glycolalicinhez kötődött VWF mennyiségét tormaperoxidáz jelzett poliklonális VWF elleni antitesttel mértük. A *kollagén kötő aktivitás (VWF:CB)* meghatározása ELISA módszerrel történt, humán III-as típusú kollagénnel (Sigma, St.Louis, MO) fedett lemezeken. A *reuma faktor* meghatározását a III. Belklinika Immunológiai Laboratóriuma végezte turbidimetriás módszerrel.

Ad 3. A Bernard-Soulier szindrómás beteg vizsgálata

Egy 38 éves belga nőbeteg vizsgálatát végeztük el. A betegség vezető tünete a menarchetól kezdve jelentkező, vashiány anaemiát is okozó kifejezett meno–metrorrhagia volt. Szülést követően is erős vérzés jelentkezett. Fia szintén vérzékeny volt, három évesen tonsillectomiát követően transzfúzióra szorult. A beteg korábbi laboratóriumi adataiból ismert volt thrombocytopeniája (44 - 82 G/l, referencia tartomány: 160-400 G/l). A vérkenetben óriás thrombocyták voltak megfigyelhetők. Vérzés ideje 20 perc feletti volt. Az alvadási idők és a VWF paraméterek normál tartományba estek. *Thrombocyta aggregáció* thrombocyta dús plazmában (PRP) történt ADP-vel (végkoncentráció: 5 μ M), kollagénnel (végkoncentráció: 2,5 μ g/ml) és risztocetinnel (végkoncentráció: 1,2 mg/ml). A thrombocyták felszínén a GPIb/IX/V komplex jelenlétét áramlási citometriával és Western blot analízissel vizsgáltuk. Az *áramlási citometriás* méréseket Jean-Pierre Delville (Laboratoire D'Hematologie, Hopital Erasme, Universite Libre de Bruxelles) végezte a komplex egyes elemei elleni monoklonális antitestekkel Facscalibur (Beckton Dickinson, San Jose, CA) készüléken PRP-ben indirekt immunfluoreszcenciás módszerrel és teljes vérben direkt immunfluoreszcenciával. A GPIb/IX/V komplex egyes elemeinek mennyiségi meghatározása Cytoquant CD42 Quantification kit-tel (Biocytex, Marseille, Franciaország) történt. A *vérlemezke lizátum* készítéséhez a mosott PRP-t pufferben (0,34 M Tris-HCl, 39% glycerol, 7,8% SDS) reszuszpendáltunk, 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 és Schuell, Dassel, Németország) vittük át és GPIb α valamint GPIX elleni monoklonális, illetve GPIb β elleni poliklonális antitesttel jelöltük. A *genomiális DNS-t* a QIAamp DNA Blood Midi Kit-tel (QIAGEN, Westburg, Hilden, Németország) *szeparáltuk*, és a GPIb α , a GPIb β és a GPIX génjét PCR módszerrel amplifikáltuk. A PCR termékeket

pCR4-TOPO vektorba ligáltuk (TOPO™ TA Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen BV, Groningen, Hollandia). 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. A homo- illetve heterozygota állapot megállapításához a GPIX 3-4 PCR termékeket *Fnu4H1* (New England Biolabs, Hitchin, Anglia) restriktációs enzimmal emésztettük és az eredményt agaróz gélen értékeltük.

EREDMÉNYEK

Ad 1. A nagy nyírőerejű áramlási módszerekkel kapott eredmények

Vérzés idő: Az enyhén vérzékeny 1. típusú betegek közül kettőnek (2/13, 15,4%) volt megnyúlt (> 9,5 perc) a vérzés-ideje. 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.

Az O'Brien-féle filterteszt eredményei: A jellemző paraméterek közül a két antikoagulánssal kapott záró cseppszámot és a két fázisban kapott thrombocyta-retenciót értékeltük. 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 2B típusú betegnél későn zárt. Heparinnal 6/7 esetben nem tapasztaltunk filterzárást és az előbb említett betegnél 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.

PFA-100 készülékkel kapott eredmények: Enyhe, 1. 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 kivételével minden esetben a záródási idő a normál értéknél hosszabb volt, illetve az eszköz nem zárt. A vizsgálat mindkét patronnal specifikusnak bizonyult (koll/epi: 96.7% , koll/ADP: 100%) és a pozitív (koll/epi: 96,3%, koll/ADP 100%) valamint negatív prediktív értéke (koll/epi: 87.9%, koll/ADP: 78,9%) is nagy volt.

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

Megfigyelésünk lényege, hogy a két azonos, 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 (14%). Gyermekei esetében is alacsony VWF:Ag értékeket kaptunk és náluk nem tapasztaltunk ellentmondást a két immunturbidimetriás módszerrel kapott eredmény között (J.L.: 12% vs 10%; ELISA: 10%, J.I.: 14% vs 12%; ELISA: 13%). 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 irodalmi adatok alapján reuma faktor meghatározást végeztünk.. Az apa esetében nagy titerű reuma faktor pozitívitas 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 betegünknel tapasztaltunk hasonlóan ellentmondásos eredményeket: egy 1-es típusú VWB esetében a VWF:Ag 53 % vs. 10 % (VWF:RCo < 10%), egy 3-as típusú betegnél VWF:Ag 50 % vs. < 2 % (VWF:RCo < 10%). Mindkét betegnél RF pozitívitas találtunk.

Ad 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 korigálta. Ez az eredmény megerősítette a beteg klinikai tünetei, thrombocytopeniája és óriás thrombocytái által felvetett Bernard-Soulier szindróma lehetőségét.

Áramlási citometriás vizsgálatok során a 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.

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.

A GPIb α , a GPIb β és a GPIX génjeinek *PCR amplifikációját és szekvenálását* végeztük el. Ennek során egyetlen mutációt találtunk: a GPIX génjében az 1826. helyen egy A \rightarrow G cserét, mely a GPIX aminosav sorrendjében egy Asn45Ser cserét eredményez.

A kapott mutáció egy új hasítási helyet képez az Fnu4H1 restrikciós enzim számára. *Restrikciós enzim analízis*el megállapítottuk, hogy a beteg homozygota a kapott mutációra. Érdekes módon a beteg fia, akinek részletesebb haemostaseologiai vizsgálatára nem volt lehetőségünk, ugyancsak homozygotának bizonyult.

MEGBESZÉLÉS

Ad 1. A von Willebrand kór klinikuma igen heterogén, a teljes tünetmentességtől (akiknek betegségére csak családvizsgálat során derül fény) a súlyos, életet veszélyeztető vérzésekig terjed. Azonban valamennyi beteg esetén igaz az, hogy valamely provokáló hatásra (foghúzás, 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 számos, 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 VWF alapvető szerepet játszik a nagy nyíróerejű áramlási viszonyok között bekövetkező thrombocita adhézióban. Ennek alapján a nagy nyíróerejű áramlási viszonyok közötti thrombusképződést modellező eszközöknek alkalmazhatóknak kell lenniük a VWF működésének vizsgálatára. Két ilyen módszer, az O'Brien féle filterteszt és a PFA-100 alkalmazását vizsgáltuk a VWB diagnosztikájában. A két módszer közös vonása, hogy kapilláris méretű pórusokon teljes vért présel át nagy nyomással. Különböznek abban, hogy a PFA-100 esetében a membrán felszíne – az érfalsérülést közelebbről modellezendő – kollagénnel és egy 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 szűrőtesztnak, 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, ugyanakkor ez a beteg az utóbbi hat évben klinikailag teljesen panaszmentes. Kifejezett tünetekkel, nehezen befolyásolható vérzéssel hospitalizált betegünk vérzés ideje normális volt, míg mind a filtertesztben, mind a PFA-100 vizsgálat során súlyos VWF működési zavart tudtunk kimutatni. Az O'Brien-féle filterteszt

citrátos vérrel végezve érzékenyebbnek bizonyult. 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 von Willebrand betegség 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 von Willebrand betegség kimutatására, bár a korábbi irodalmi adatokkal 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 egybevethető.

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 módszere a VWF:Ag szint meghatározás. Az utóbbi években egyre inkább elterjedtek az immunturbidimetriás elven működő VWF:Ag tesztek. A reuma faktor jelenléte az ezen az elven működő VWF:Ag meghatározásokat befolyásolhatja. Megfigyelésünk újdonsága, hogy a reuma faktor eltérő mértékű hatással van a különböző gyártótól származó VWF:Ag tesztekre. 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 esztendős belga nőbeteg vizsgálatát végeztük el. A Bernard-Soulier betegség diagnózisa a thrombocytopenián, a perifériás kenetben észlelt óriás thrombocytákon és a normál von Willebrand faktor antigén és aktivitás mellett mért jelentősen csökkent riztocetin indukálta thrombocyta aggregáción alapult. 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. Az áramlási citometriás mérések eredménye alapján először a GPIX szekvenálását végeztük el. Ennek során egy missense pontmutációt, az 1826. helyen egy adenin-guanin cserét találtunk, mely a fehérje aminosav sorrendjében Asn45Ser cserét eredményez. Restrikciós enzim analízis

alapján a beteg homozygota volt erre a mutációra. A GPIb α és a GPIb β szekvenálásával újabb mutációra nem derült fény. Az Asn45Ser mutáció a GPIX leucinban gazdag régióját (LRM) érinti. Az LRM pontos funkciója nem tisztázott, de a GPIX és a GPIb β közötti nem kovalens kapcsolat kialakításában van szerepe. Ebben rokonságot mutat más LRM tartalmú proteinekkel, például a Drosophila toll, chaoptin és connectin fehérjéivel, melyek más sejtek azonos szerkezetű receptorainak összekapcsolása révén biztosítják a sejtek közötti összeköttetést. Az LRM Asn45Ser mutációja transzfektált sejtekben gátolta a GPIb β - GPIX közötti kapcsolat létrejöttét. 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. A belga betegünkénél talált mutációt először egy „compound” heterozygota angol betegben írták le, később egy homozygota osztrák, egy svéd és hét finn betegben. Saját közlésünket követően még négy német és egy „compound” heterozygota kanadai betegnél találták ugyanezt a mutációt. A kanadai beteg francia-ír származású édesanyjától örökölte az Asn45Ser cserét. Saját esetünk külön érdekessége, hogy a beteg fia 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 a felsorolt 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. Ilyen esetekben feltétlenül ajánljuk a risztocetin indukálta thrombocyta aggregáció elvégzését a diagnózis tisztázása céljából.

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 GPIIX-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.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Kerényi A, **Schlammadinger 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

Schlammadinger 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

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

Impakt faktor: 0,778

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

Schlammadinger 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 KAPCSOLÓDÓ IDÉZHETŐ ABSZTRAKT

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

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖNYVFEJEZETEK

- 1, Bernard-Soulier szindróma
- 2, Willebrand-betegség

In: Betegség enciklopédia, Springer Tudományos Kiadó, 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, 2006.

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM SZOROSAN 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. Clinical and Applied 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. *Thrombosis and Haemostasis* 2000; 83: 107-113.

Impakt faktor: 4,372

Cauwenberghs N, **Schlammadinger Á**, 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: 4,910

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

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

Impakt faktor (2004): 3,410

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

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ, ELSŐ SZERZŐKÉNT BEMUTATOTT KONGRESSZUSI ANYAGOK

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

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

Schlammadinger 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).

Schlammadinger 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).

Schlammadinger 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).

Schlammadinger Á, Bodó I, Boda Z: Von Willebrand kóros beteg esete: A betegtől 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 Szakcsoporthülés 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).

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

Schlammadinger 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, 2005).