

MTA doktori értekezés

**VELESZÜLETETT ÉS SZERZETT  
RITKA HEMOSZTÁZIS BETEGSÉGEK  
PATOGENETIKÁJÁNAK VIZSGÁLATA,  
DIAGNOSZTIKÁJÁNAK ÉS  
TERÁPIÁJÁNAK FEJLESZTÉSE**

Bodó Imre

Semmelweis Egyetem

Belgyógyászati és Hematológiai Klinika

Budapest, 2024

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
Előszó.....	6
Bevezetés, háttér.....	7
von Willebrand faktor és von Willebrand betegség.....	8
A szerzett inhibitoros hemofília.....	20
Tromboembóliás betegségek.....	22
Célkitűzések.....	25
Betegek, módszerek.....	29
Eredmények és következtetések.....	56
Vérzéses tünetek és propeptid szintek a 3-as típusú von Willebrand betegségben <sup>167,168</sup> .....	57
A VWF bioszintézissel inkompatibilis génhibák: a 3-as típusú von Willebrand kór molekuláris patogenezise. A „magyar mutáció” keletkezése és az inhibitor képződés kérdései <sup>38,81,169,170</sup> .....	62
Egy izgalmas nyomozás: a VWF dimer diszulfid szerkezetének felgöngyölítése <sup>52</sup> .....	83
A nagy penetranciájú súlyos 1-es típusú VWB. A VWF „minőségi ellenőrzése” az ER-ban, és a p.C1149R mutáció patomechanizmusa <sup>208</sup> .....	103
A VWF clearance jelentősége: A Vicenza variáns molekuláris patogenezise <sup>235</sup> .....	116
Tegyük rendet a mérési módszerek között: a von Willebrand faktor trombocita-függő aktivitási tesztjeinek nomenklatúrája <sup>244</sup> .....	129
A GPIb kötő VWF aktivitási tesztek objektív összehasonlítása egy vakon mért mintákkal történő nemzetközi vizsgálatban: COMPASS-VWF – I. <sup>276,277</sup> .....	134
Bizonyos típusú minták esetében a GPIb kötő VWF aktivitási tesztek egymástól eltérő eredményeket adnak: COMPASS-VWF – II. <sup>276,277</sup> .....	142
A von Willebrand betegség kezelési elvei <sup>282-284</sup> .....	153
Az autoimmun szerzett hemofília A kezelése: hatékony immunszuppresszív kezelési protokoll kidolgozása – CyDRi <sup>310</sup> .....	156
A trombofília kivizsgálás klinikai haszna vénás tromboembóliában szenvedő betegekben <sup>314</sup> .....	170
Trombózishajlam szisztémás lupus erythematosusban szenvedő betegekben <sup>332</sup> .....	180
Jatrogén trombofília – az aszparagináz okozta trombózis kezelése <sup>376</sup> .....	191
A PNH az agresszív trombofiliák jellegzetes példája <sup>391-394</sup> .....	194
A rituximab a folyamatos plazmaferézis mellett is a keringő CD20 <sup>+</sup> T- és B-sejtek korai eltávolításához vezet <sup>408</sup> .....	201
Összefoglalás, zárszó.....	206
Köszönetnyilvánítás.....	208
Irodalomjegyzék.....	209

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>3WINTERS-IPS</b>	3-as típusú VWB nemzetközi vizsgálata. Type 3 Von Willebrand International Registries Inhibitor Prospective Study
<b>4VP</b>	4-vinylpyridine
<b>ADAMTS13</b>	a VWF hasító enzime. ( <u>a</u> <u>disintegrin</u> <u>and</u> <u>metalloprotease with thrombospondin repeats</u> <u>13</u> )
<b>AHA</b>	szerzett hemofília A ( <u>a</u> <u>cquired</u> <u>h</u> <u>emophilia</u> <u>A</u> )
<b>ALL</b>	akut limfoblasztos leukémia
<b>Alu elemek</b>	Kb. 300 bp repetitív DSN szakaszok. Az artrobacter luteus (Alu) endonukleáz révén fedezték fel őket. A humán genom több, mint 1 millió transzponálható Alu elemet tartalmaz.
<b>APLA</b>	anti-foszfolipid antitest
<b>APS</b>	anti-foszfolipid szindróma
<b>AT</b>	antitrombin
<b>ATE</b>	artériás tromboembólia
<b>bp</b>	bázispár
<b>BTH</b>	Áttöréses hemolízis ( <u>b</u> <u>reakthrough</u> <u>h</u> <u>emolysis</u> )
<b>BU</b>	FVIII inhibitor titer mérésére használt Bethesda egység ( <u>B</u> <u>ethesda</u> <u>U</u> <u>nit</u> )
<b>cAMP</b>	ciklikus adenzin-monofoszfát
<b>CI</b>	konfidencia intervallum
<b>CK</b>	cisztin csomó ( <i>cystine knot</i> ); a VWF karboxi terminális részének domén neve
<b>CNBr</b>	cianogén bromid
<b>COMPASS-VWF</b>	a VWF aktivitási tesztek összehasonlító vizsgálata: <u>C</u> <u>OMP</u> <u>arison of</u> <u>A</u> <u>SS</u> <u>ays</u> <u>m</u> <u>easuring</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>F</u> <u>a</u> <u>ctivity</u>
<b>COS sejt</b>	Fibroblaszt sejt vonal ( <u>C</u> <u>V</u> -1 in <u>O</u> <u>ri</u> <u>g</u> <u>i</u> <u>n</u> with <u>S</u> <u>V</u> 40 <u>g</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>e</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>c</u> <u>m</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>r</u> <u>i</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>i</u> <u>a</u> <u>l</u> )
<b>CR</b>	komplett remisszió
<b>CRF</b>	Esetjelentő űrlap ( <u>c</u> <u>a</u> <u>s</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>p</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>t</u> <u>f</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>m</u> )
<b>CV</b>	Variációs koefficiens ( <u>C</u> <u>o</u> <u>e</u> <u>f</u> <u>f</u> <u>i</u> <u>c</u> <u>i</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>o</u> <u>f</u> <u>v</u> <u>a</u> <u>r</u> <u>i</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>n</u> )
<b>CyDRi</b>	<u>C</u> <u>y</u> <u>c</u> <u>l</u> <u>o</u> <u>f</u> <u>o</u> <u>s</u> <u>z</u> <u>f</u> <u>a</u> <u>m</u> <u>i</u> <u>d</u> , <u>D</u> <u>e</u> <u>x</u> <u>a</u> <u>m</u> <u>e</u> <u>t</u> <u>h</u> <u>a</u> <u>s</u> <u>o</u> <u>n</u> , <u>R</u> <u>i</u> <u>t</u> <u>u</u> <u>x</u> <u>i</u> <u>m</u> <u>a</u> <u>b</u>
<b>DDAVP</b>	dezmopresszin; deamio-D-arginine-vasopressin
<b>DOAC</b>	direkt ható orális antikoaguláns gyógyszerek
<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>ECOG PS</b>	a beteg általános állapotának jellemzője ( <u>E</u> <u>a</u> <u>s</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>n</u> <u>C</u> <u>o</u> <u>o</u> <u>p</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>v</u> <u>e</u> <u>O</u> <u>n</u> <u>c</u> <u>o</u> <u>l</u> <u>o</u> <u>g</u> <u>y</u> <u>G</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>p</u> <u>P</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>f</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>m</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>c</u> <u>e</u> <u>S</u> <u>t</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>u</u> <u>s</u> )
<b>ELISA</b>	enzimmel jelölt immunoszorbens teszt ( <u>e</u> <u>n</u> <u>z</u> <u>y</u> <u>m</u> <u>e</u> - <u>l</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>k</u> <u>e</u> <u>d</u> <u>i</u> <u>m</u> <u>m</u> <u>u</u> <u>n</u> <u>o</u> <u>s</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>b</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>a</u> <u>s</u> <u>s</u> <u>a</u> <u>y</u> )
<b>ER</b>	endoplazmás retikulum
<b>ES-Cys</b>	S-ethylsuccinimidocystein
<b>FIIM</b>	a protrombin (FII) gén G20210A mutációja
<b>FPLC</b>	gyors folyadékkromatográfia ( <u>f</u> <u>a</u> <u>s</u> <u>t</u> <u>p</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>l</u> <u>i</u> <u>q</u> <u>u</u> <u>i</u> <u>d</u> <u>c</u> <u>h</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>m</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>o</u> <u>g</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>p</u> <u>h</u> <u>y</u> )
<b>FVIII</b>	VIII-as faktor (a többi alvadási faktort is hasonlóan rövidítjük).
<b>FVIIIa</b>	Az aktivált FVIII jele
<b>FVL</b>	a FV Leiden mutációja
<b>GP</b>	glikoprotein. Számos molekula nevében szerepel, pl. GPIb, vagy GP-alfa(IIb)beta(3)
<b>HIT</b>	Heparin-indukálta trombocitopénia
<b>HMWM</b>	nagy molekulatömegű multimer ( <u>h</u> <u>i</u> <u>g</u> <u>h</u> <u>m</u> <u>o</u> <u>l</u> <u>e</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>l</u> <u>a</u> <u>r</u> <u>w</u> <u>e</u> <u>i</u> <u>g</u> <u>h</u> <u>m</u> <u>u</u> <u>l</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>m</u> <u>e</u> <u>r</u> )
<b>HPLC</b>	nagy nyomású/teljesítményű folyadékkromatográfia ( <u>h</u> <u>i</u> <u>g</u> <u>h</u> <u>p</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>s</u> <u>s</u> <u>u</u> <u>r</u> <u>e</u> <u></u> <u>p</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>f</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>m</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>c</u> <u>e</u> <u>l</u> <u>i</u> <u>q</u> <u>u</u> <u>i</u> <u>d</u> <u>c</u> <u>h</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>m</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>o</u> <u>g</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>p</u> <u>h</u> <u>y</u> )
<b>HRP</b>	Torma peroxidáz ( <u>h</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>s</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>d</u> <u>i</u> <u>s</u> <u>h</u> <u>p</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>x</u> <u>i</u> <u>d</u> <u>a</u> <u>s</u> <u>e</u> )
<b>ICAM</b>	intercelluláris sejtadhéziós molekula
<b>IST</b>	immunszuppressziós terápia
<b>ISTH</b>	Nemzetközi Trombózis és Hemosztázis Társaság ( <u>I</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>n</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>a</u> <u>l</u> <u>S</u> <u>o</u> <u>c</u> <u>i</u> <u>e</u> <u>t</u> <u>y</u> <u>o</u> <u>f</u> <u>T</u> <u>h</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>m</u> <u>b</u> <u>o</u> <u>s</u> <u>i</u> <u>s</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>d</u> <u>H</u> <u>a</u> <u>e</u> <u>m</u> <u>o</u> <u>s</u> <u>t</u> <u>a</u> <u>s</u> <u>i</u> <u>s</u> )
<b>ITP</b>	immun-trombocitopénia
<b>IQR</b>	Interkvartilis tartomány ( <u>i</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>q</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>r</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>l</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>g</u> <u>e</u> )

IRB	Intézeti Etikai Bizottság ( <i>I</i> nstitutional <i>R</i> eview <i>B</i> oard)
kb	kilobázis
L-Asp	L-aszparagináz
LIA	Latex alapú immunturbidimetriás mérés ( <i>L</i> atex <i>i</i> mmunoturbidimetry <i>a</i> ssay)
LLMI	alsó méréshatár ( <i>L</i> ower <i>l</i> imit of <i>m</i> easuring <i>i</i> nterval)
LMWH	kis molekulásúlyú heparin ( <i>l</i> ow <i>m</i> olecular <i>w</i> eight <i>h</i> eparin)
LMWM	kis molekulatömegű multimer ( <i>l</i> ow <i>m</i> olecular <i>w</i> eight <i>m</i> ultimer)
LOD	<i>L</i> imit of <i>d</i> etection – a mérésenkél a kimutathatóság alsó határa
MAC	<i>m</i> embrane <i>a</i> ttack <i>c</i> omplex
MAHA	mikroangiopátiás hemolitikus anémia
MIRL	Protektin, más néven a <i>m</i> embrane <i>i</i> nhibitor of <i>r</i> eactive <i>l</i> ysis
MPN	Mieloproliferatív neoplazmák
NE	nemzetközi egység
NEM	N-ethylmaleimide
Ni-NTA	<i>n</i> ickel- <i>n</i> itri <i>l</i> o <i>t</i> ri <i>a</i> ctic acid agarose
OS	Teljes túlélés ( <i>o</i> verall <i>s</i> urvival)
OVSZ	Országos Vérellátó Szolgálat
PC	protein C
PCR	polimeráz láncreakció ( <i>p</i> olymerase <i>c</i> hain <i>r</i> eaction)
PE-Cys	S-pyridylethylcystein
PD-BTH, PK-BTH	Farmakokinetikus és farmakodinamikus áttöréssel hemolízis ( <i>p</i> harmacokinetic or <i>p</i> harmacodynamic <i>b</i> reakthrough <i>h</i> emolysis)
PMSF	phenylmethyl sulfonyl fluorid
PNH	paroxizmális nokturnális hemoglobinuria
PS	protein S
PSM	<i>p</i> orcine <i>s</i> ubmaxillary <i>m</i> ucin
PTH	phenylthiohydantoin
PVDF	polyvinyliden difluorid
RES	retikulo-endoteliális rendszer
RP-HPLC	reverz fázisú nagynyomású kromatográfia ( <i>r</i> everse- <i>p</i> hase <i>h</i> igh- <i>p</i> erformance <i>l</i> iquid <i>c</i> hromatography)
SDS PAGE	nátrium dodecil szulfát ( <i>s</i> odium <i>d</i> odecyl <i>s</i> ulphate) poliakrilamid gél elektroforézis
SNP	<i>S</i> ingle <i>n</i> ucleotide <i>p</i> olymorphism
SSC	Scientific and Standardization Committee
TAE	tris-acetát ETDA puffer
TCEP	tris (2-carboxyethyl) phosphine
TE	tromboembólia, tromboembóliás
TFMS	trifluorometán szulfonsav
TFPI	Szöveti faktor útvonal inhibitora ( <i>t</i> issue <i>f</i> actor <i>p</i> athway <i>i</i> nhibitor)
TGF-β	<i>t</i> ransforming <i>g</i> rowth <i>f</i> actor- <i>β</i>
TPEx	terápiás plazmacsere, plazmaferezis ( <i>p</i> lasma <i>e</i> xchange)
TTCR	a komplett remisszió eléréhez szükséges idő ( <i>t</i> ime to <i>C</i> R)
TTP	trombotikus trombocitopéniás purpura (iTTP az autoimmun eredetre utal)
UL-VWF	igen nagyméretű von Willebrand faktor ( <i>u</i> ltra <i>l</i> arge <i>V</i> WF)
VCAM	vaszkuláris sejtadhéziós molekula
VM	Vérzésmutató (angolul bleeding score, vagy bleeding assessment tool – BAT)
VNTR	<i>V</i> ariable <i>n</i> umber of <i>t</i> andem <i>r</i> epeats
VTE	vénás tromboembólia
VWB	von Willebrand betegség
VWF	von Willebrand faktor
VWF:Ab	VWF aktivitási teszt – lásd 21. táblázat
VWF:Ag	von Willebrand faktor antigénszint

<b>VWF:CB</b>	von Willebrand faktor aktivitás: kollagénköti képesség ( <i>collagen binding</i> )
<b>VWF:GPIbM</b>	VWF aktivitási teszt – lásd <b>21. táblázat</b>
<b>VWF:GPIbR</b>	VWF aktivitási teszt – lásd <b>21. táblázat</b>
<b>VWF:RCo</b>	von Willebrand faktor aktivitás: ristocetin kofaktor aktivitás
<b>W-P test</b>	Weibel–Palade-test
<b><math>\alpha</math>-FII</b>	anti-protrombin
<b><math>\alpha</math>-Ph-Ser</b>	anti-foszfatidil-szerin
<b><math>\alpha</math>-<math>\beta</math>2-GP1</b>	anti-béta2-glikoprotein 1

Midőn ezt írtam, tiszta volt az ég.  
Zöld ág virított a föld ormain.  
Munkában élt az ember mint a hangya:  
Küzdött a kéz, a szellem működött,  
Lángolt a gondos ész, a szív remélt,  
S a béke izzadt homlokát törölvén  
Meghozni készült a legszebb jutalmat,  
Az emberüdvöt, melyért fáradozt.  
.....  
A vész kitört. Vérfagyaló keze  
Emberfejekkel labdázott az égre,  
Emberszívekben dúltak lábai.

Majd eljön a hajfodrász, a tavasz,  
S az agg föld tán vendégéhat veszen,  
Virágok bársonyába öltözik.  
Üveg szemén a fagy fölengedend,  
S illattal elkendőzött arcain  
Jökedvet és ifjúságot hazud:  
Kérdjétek akkor ezt a vén kacért,  
Hová tévé boldogtalan fiait?

Vörösmarty: Előszó

## ELŐSZÓ

„Midőn ezt írtam, tiszta volt az ég.” Vörösmarty Előszó c. költeményének ez a sora jutott eszembe, amikor nekiültem, hogy az elmúlt negyedszázad során készült munkáim összerendezett együttese elé előszót írjak. És valóban, most olyan fellegek gyülekeznek az égen, „az elsötétült égnek arcain”, melyekhez képest a huszonöt évvel ezelőtti állapotok napsütötte horizontnak tűnnek. E súlyosbodó nehézségek közepette igazán szerencsésnek érzem magam, hogy kutatni volt/van lehetőségem a hemosztázis betegségeinek több izgalmas kérdéséről. Kutatásban részt venni a klinikus számára szellemi felüdülést jelent.

A von Willebrand betegséggel Péterfy Miklós diákköröként találkoztam először, majd az élet úgy hozta, hogy Evan Sadler laboratóriumában tölthettem két esztendő. Ez a két élmény határozta meg későbbi érdeklődésem irányát. Kutatásaimat úgy igyekeztem alakítani, hogy egy szűk terület kérdéskörének minél mélyebb megismerését szolgálják. Az itt közölt munkák egy részét még Evan Sadler munkatársaként végeztem, nagyobbik részét a hazatérésem után létrehozott kutatócsoport vezetőjeként közöltem. Az eredmények egy része az Emory Egyetemmel kialakított együttműködés gyümölcse.

A fejezetek tematikusan követik egymást, nem a munkák elvégzésének időrendjében következnek. A bevezető részben igyekeztem általános ismereteket adni és megvilágítani a vizsgált kérdések háttérének leglényegesebb elemeit.

Járvány és háború kellős közepén vagyunk. Kinézek az ablakon, „most tél van és csend és hó....” Mikor jön már „a hajfodrász, a tavasz”?

Budapest, 2023. október

## **BEVEZETÉS, HÁTTÉR**

A hemosztázis – ez az összetett, és minden részletében még nem is egészen megfejtett szabályozás alatt álló rendszer – meghibásodása súlyos betegségek kialakulásához vezet akkor is, ha alulműködik és akkor is, ha túlműködik. Érdekes filogenetikai kérdéseket is fölvet, hogy a rendszer alulműködése, a vérzékenység, a ritka betegségek közé tartozik, míg túlműködése, a tromboembóliás betegségek köre a civilizált világban az egyik vezető halálok. Mindazonáltal az igazán súlyos trombózishajlam gyakran szintén ritka betegségek következménye. A hemosztázis-kutatás a rendszer részleteinek pontosabb megértését, illetve az így szerzett ismereteknek a betegek gyógyításába való beillesztését szolgálja. E disszertációban a hemosztázis kérdéseiben végzett kutatásaimat foglaltam össze. E kutatások több évtizedes munka eredményei, melyeket részben az Egyesült Államokban, nagyobb részt idehaza, Magyarországon végeztem. A bevezetésben áttekintem a kutatási terület hátterét, hogy jobban megvilágíthassam kutatásaim célját. A von Willebrand betegség bemutatása után ismertetem egy ritka szerzett vérzékenység, az autoimmun inhibitoros hemofília hátterét, majd a tromboembóliás betegségek néhány vonatkozó aspektusát.

## **von Willebrand faktor és von Willebrand betegség**

A von Willebrand betegség (VWB) a leggyakoribb öröklött vérzékenység. A betegséget Eric von Willebrand finn orvos ismerte fel és írta le 1926-ban. A tüneteket a róla elnevezett egyik fontos véralvadási fehérje, a von Willebrand faktor (VWF) mennyiségének és működésének rendellenességei okozzák. A VWF normál és kóros működésének vizsgálata izgalmas kutatási terület, mely az orvostudomány több alapvető kérdésében is fontos ismeretekkel gazdagította tudásunkat. A VWF biológiájának és a VWB biológiai alapú osztályozásának bemutatása után a betegség egyes típusaiban végzett kutatás hátterét fogom tárgyalni, kiemelve azokat a területeket, amelyekben alkalmam nyílt saját kutatással gazdagítani ismereteinket.

### ***A von Willebrand betegség története***

Von Willebrand doktort 1924-ben egy Föglöről, a Finnország és Svédország közötti Botteni-öböl bejáratában fekvő Åland szigetek egyikéről származó, súlyosan vérzékeny kislányhoz hívták konzíliumba. A kislány, Hjördis, 5 éves volt, szülei harmadfokú unokatestvérek voltak, enyhén vérzékenyek. Mindkettejük családjának több vérzékeny tagja volt, férfiak és nők egyaránt. Hjördis 11 testvére közül tízen változó súlyosságú vérzékenységben szenvedtek: orrvérzéseik, fogínyvérzéseik, sérülést követő vérzéseik, véraláfutásaik voltak. Hjördis két nővére és egy húga hunyt el négyéves kora előtt gasztrointesztinális vérzés, illetve nyelvharapásból származó uralhatatlan vérzés következtében. Von Willebrand Hjördisnél megnyúlt vérzési időt, normális alvadási időt és alvadékretakciót talált. Ez a közleménye<sup>40,41</sup> 1926-ban jelent meg. Ekkorra Hjördis még egy hűgát elveszítette gasztrointesztinális vérzés miatt. Von Willebrand doktor a vérzések mukokután jellege és az öröklésment (férfiak és nők egyaránt érintettek) alapján elkülönítette az általa leírt betegséget az akkor már ismert hemofiliától, valamint az örökletesség és a klinikum, valamint a trombocitopénia hiánya alapján a „morbus maculosus Werlhofii”-től (ITP). A vérzékenységet a vérlemezkék működési zavarával és a kapillárisfal károsodásával magyarázta. Akkor még nem volt a gyógyításra lehetőség, Hjördis 13 évesen, negyedik menstruációs vérzésében hunyt el.

Az 1950-es években publikálták, hogy a Willebrand betegekben alacsonyabb a VIII-as faktor (FVIII, antihemofiliás faktor) szintje, valamint hogy FVIII-t tartalmazó plazmakészítménnyel a vérzésidő korrigálható. A plazmában egymáshoz kapcsolódva keringő VWF és FVIII immunológiai különválasztása az 1970-es évek elején sikerült.<sup>42</sup> A VWF aminosavsorrendjét 1986-ban írták le,<sup>43</sup> majd 1989-ben génjét is szekvenálták,<sup>44</sup> 1993-ban tisztázták a betegség genetikai hátterét a von Willebrand által először ismertetett családban: Hjördis családjának még



élő tagjait vizsgálva a von Willebrand faktor génjének 18-as exonjában egy citozin delécióját (c.2435delC) találták, mely az olvasókeret eltolódásához, korai stop kodon kialakulásához és megrövidült fehérje képződéséhez vezetett. Az enyhén vérzékeny családtagok heterozigóták, a súlyosan vérzékenyek feltehetőleg homozigóták voltak erre a mutációra,<sup>45</sup>

### *A von Willebrand faktor biológiája*

A von Willebrand faktor igen nagyméretű plazma glikoprotein, mely kizárólag az endotél sejtekben és a megakariocitákban termelődik. Az endotél sejtek ún. Weibel-Palade (W-P) testjeiben és a vérlemezkék  $\alpha$ -granulumaiban tárolódik, ahonnan megfelelő szignálok hatására kerülhet a keringésbe. Két fő funkciója van: nélkülözhetetlen szerepet játszik a vérlemezkék szubendoteliális kötőszövethez való adhéziójában, és stabilizálja a VIII-as faktort a plazmában. Ezért VWF hiányában súlyos vérzékenység lép fel, mely a primer és szekunder hemosztázist egyaránt érinti.

### *A VWF bioszintézise és szerkezeti felépítése*

#### *1. Doménstruktúra*

A VWF gén elsődleges transzlációs terméke, a prepro-VWF 2813 aminosavból áll. Ezek közül az első 22 a szignál peptid, mely a fehérjét a szekréciós útra irányítja. A következő 741 aminosav képezi az ún. propeptidet, végül az érett alegység 2050 aminosava fejezi be a sort (**1. ábra**). A fehérje legnagyobb részét ismétlődő domének teszik ki. Az érett alegység jelentős mértékben glikozilálva van. A VWF fehérje különlegessége, hogy eltérően a legtöbb plazmafehérjétől, az AB0 vércsoport oligoszacharidjait is hordozza. A jelenleg elfogadott nomenklatura szerint a VWF molekula aminosavait a szignál peptid első metioninjétől kezdjük számozni, és így az érett alegység a 764-estől a 2813-as aminosavig tart.

#### *2. Dimerizáció az endoplazmás retikulumban*

Miután a frissen szintetizált prepro-VWF az endoplazmás retikulumba (ER) került, dimerizálódik a karboxi-terminális ciszteinek között létrejött diszulfid hidak segítségével („tail-to-tail”). Ennek a dimerizációnak még ma sem ismerjük minden részletét egészen pontosan.<sup>46-48</sup> A VWF karboxi-terminális végét az ún. CK („cystine knot”, cisztin csomó) domén adja, mely homológ más cisztin csomót tartalmazó fehérjékkel. A homológ fehérjék szintén dimer formájában szintetizálódnak. Az ER-ből csak azok az alegységek folytathatják útjukat a Golgi felé, amelyek dimerizálódtak és glikozilálva vannak. A monomerek visszatartásának pontos mechanizmusa nem ismert, valószínűleg a karboxi-terminális régió felelős ezért a jelenségért.

### 3. Multimerizáció a Golgiban

A Golgiba átkerült dimerek N-terminális részei („*head-to-head*”) szintén diszulfid hidak révén kapcsolódnak egymáshoz, és így nagyméretű multimerek jönnek létre. A multimerek kialakulásában a propeptidnek fontos szerepe van. A propeptid deléciója nem akadályozza meg a Golgiba való transzportot, ám hiányában multimerek nem keletkeznek. A propeptid funkciójának valószínű magyarázata a diszulfid oxidoreduktáz enzimekkel való hasonlóságban rejlik. Ezek alapján jelenleg a propeptidet diszulfid izomeráz enzimnek tartjuk, melyet speciális pozícióban elhelyezkedő hisztidin molekulái tesznek alkalmassá a diszulfid kötések szempontjából szokatlan savas környezet ellenére a diszulfid izomerázként való működésre.<sup>49</sup> A propeptidet a furin nevű proteáz hasítja le az érett alegységről. Ezen kívül további poszttranszlációs változásokon is átmegy a VWF a Golgiban: folytatódik a glikozilálás, és bizonyos N-kötött oligoszacharidok szulfatálódnak is. Több kutatócsoport dolgozott annak megfejtésén, hogy pontosan mely ciszteinek alkotják az alegységeket összekötő diszulfid hidakat,<sup>46,50-52</sup> azonban a struktúra pontos megfejtése vizsgálataink megkezdéséig nem sikerült.

### 4. Intracelluláris tárolás és szekréció

A VWF termelése két párhuzamos úton folyik. Az egyik folyamatos – konstitutív – szekrécióhoz, a másik a VWF tárolásához és a tárolt multimerek szabályozott szekréciójához vezet. A tárolás az endotél sejtek Weibel-Palade (W-P) testjeiben történik. A W-P testek membrán által határolt, csak az endotél sejtekben megfigyelhető organellumok, melyek 0,1-0,2 µm keresztmetszetűek, és akár 4 µm hosszúságot is elérhetnek. Hasonló tubulus-klasztereket találunk a trombociták α-granulumainak perifériáján is. A propeptid is tárolódik a W-P testekben, 1:1 stoichiometriával. Kutatásunk óta a W-P testek fiziológiájának számos részlete vált ismertté.<sup>53,54</sup>

### 5. VWF szekréció és katabolizmus

Endoteliális sejt kultúrában többféle vegyület is stimulálja a VWF szekréciót (hisztamin, trombin, fibrin, β-agonisták, kalcium ionofor A23187, phorbol myristate acetate). A szekréciót követően a sejtekből eltűnnek a W-P testek. A szekretoros válasz nagysága arányos az intracelluláris cAMP szinttel.<sup>55</sup> *In vivo* a VWF plazmakoncentráció megemelkedik β-adrenerg stressz, trombingeneráció vagy DDAVP (1-dezamino-8-D-arginin vazopresszin) kezelés hatására. Ezek közül terápiásan a DDAVP-t használjuk ki. A DDAVP hatása indirektnek látszik, mivel kultúrában lévő endotél sejtek nem reagálnak rá.<sup>56,57</sup> A propeptid non-kovalens homodimerként kering, melynek fél-életideje rövid, ≈2 óra körüli, plazmaszintje ≈1 µg/ml;

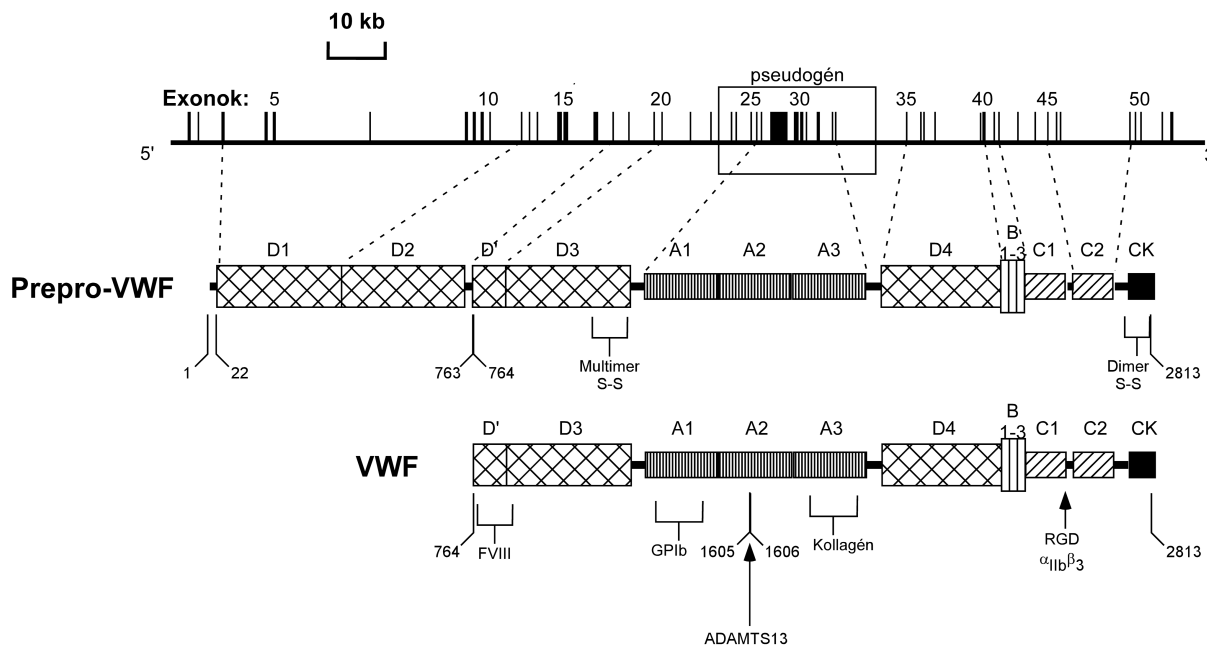
szemben a VWF  $\approx 10$ -12 órás felezési idejével és  $\approx 10\mu\text{g/ml}$  plazmakoncentrációjával. A szekretált propeptidnek nem ismerjük fiziológias funkcióját.

### 6. A VWF hasítása a plazmában

A plazma VWF multimer nagysága szoros szabályzás alatt áll. Ugyanis a szekréció igen nagyméretű multimerek formájában történik, amelyeket egy specifikus metalloproteáz, az ADAMTS-13 (a metalloproteáz család a körülményes „*a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin repeats 13*” kifejezésről kapta nevét) hasít az A2 domén Tyr<sup>1605</sup>-Met<sup>1606</sup> aminosavai között, ezzel csökkentve a túlzottan reaktív óriás multimerek méretét és aktivitását. E szabályzás fontosságát mutatja, hogy ha mutáció következtében a VWF fokozottan érzékennyé válik e hasításra, akkor súlyos veleszületett vérzékenység jön létre (2A vagy 2B típusú VWB), míg az enzim veleszületett vagy szerzett hiánya életveszélyes disszeminált mikrovaszkuláris trombózisokat eredményez (trombotikus trombocitopéniás purpura – TTP).

### A VWF biológiai hatásai, és szerkezeti alapjuk

A VWF-nak nincs enzimatis aktivitása. Biológiai hatásait a kötőszövet különböző elemeihez és a trombocita glikoproteinekhez (GPIb) való specifikus kapcsolódások, valamint a VIII-as faktorhoz való kötődés révén fejt ki.



**1. ÁBRA. A VWF gén, a prepro VWF és az érett VWF alegység.** Az ábra a VWF gént mutatja a jelzett léptékkal. Jelölve vannak az exonok és a pseudogénnek megfelelő génszakasz. A propeptid (22-763-as aminosavak) lehasítása után létrejött érett VWF alegység szerkezetét is ábrázoltuk az ismétlődő domének (A, B, C, D és CK) elhelyezkedésével. A VWF jelenlegi nomenklatúrája a szignál peptidtől kezdődő egyszerű számozást követi. Látható a dimerképződés helye, illetve a multimer képződés lokalizációja. Továbbá fel vannak tüntetve a VWF főbb funkcionális kötőhelyei és a plazmában jelen lévő ADAMTS13 hasítási helye is.

### 1. A VWF GPIb és kollagén kötőhelyei

A VWF molekulán belül a különböző kötőhelyek elhelyezkedését elég jól ismerjük (**1. ábra**). A trombocita glikoproteinekhez való kötődés szabályozott folyamat, a VWF molekulának van „aktív” és „inaktív” konformációja. Bár a molekuláris szabályzás egyelőre nem ismert minden részletében, *in vivo* az „aktív” konformáció kialakulásának feltételezett kiváltói az előzetes kollagénhez való kapcsolódás és az erekben lévő folyadéksúrlódás. Vagyis a VWF aktiválását fizikai erőbehatás váltja ki.

A VWF molekula a keringésben nincs interakcióban a trombocitákkal. Ez a helyzet akkor változik meg, ha az érfalon sérülés keletkezik. Ilyenkor a VWF a szubendoteliális kollagénhez kapcsolódik, és ez a kötés lehetővé teszi, hogy a VWF a trombociták GP Ib-IX-V komplexét olyan affinitással kösse meg, hogy a keringésből azokat kiragadja és a sérülés helyszínéhez lokalizálja. A VWF-kollagén, a VWF-GP Ib, valamint a VWF- $\alpha_{IIb}\beta_3$  interakciók számos molekuláris részlete ismert, melyekből összefoglalva azt emelem ki, hogy a VWF-GP Ib és a VWF-GP IIb-IIIa (VWF- $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) kötések kinetikája között lényeges különbség van. A VWF- $\alpha_{IIb}\beta_3$  kötés sokkal lassabban jön létre. Ez magyarázza, hogy ez a kötés nem alkalmas a vérlemezkék kiragadására az áramló keringésből. Viszont miután a vérlemezke a GP Ib receptor gyors kinetikájú kötésének segítségével a felülethez tapadt, a lassú görgés (*rolling*) elegendő időt nyújt a VWF- $\alpha_{IIb}\beta_3$  kötődés (valamint más trombocita integrinek és a kötőszövet közötti interakció) létrejöttéhez és irreverzibilis trombocita aktiváció kialakulásához.<sup>58-60</sup>

### 2. A VWF és a folyadéksúrlódás

A VWF molekula különlegessége, hogy működése függ a folyadékáramlástól. Az érpályában áramló vérben az áramlás sebessége az ér közepén a legmagasabb, és az érfalhoz közeledve fokozatosan nulláig csökken az érfal közvetlen szomszédságában. Ezzel szemben a sebesség grádiens, amit a cm/s-ban mért sebesség cm-enkénti változásában szoktak kifejezni (cm/s/cm, vagy  $s^{-1}$ ), az érfal mellett maximális és középen nulla. A sebesség grádienssel, vagy más kifejezéssel nyírási sebességgel (*shear rate*) egyenesen arányos a folyadéksúrlódási erő vagy röviden folyadéksúrlódás, melynek egyik hatása az, hogy a nagyobb vörösvértestek vándorolnak középen, a vérlemezkéket feladatuk színhelyéhez, az érfalhoz szorítva. Ennél talán még fontosabb hatás a VWF molekula reaktivitásának fokozása. Alacsony nyírási sebesség ( $\approx 100 s^{-1}$ ) mellett, mint amelyet a vénákban és a nagyobb artériákban találunk, a VWF nem indítja el a vérlemezke-adhéziót. Viszont az arteriolákban észlelhető nagy nyírási sebesség ( $> 1000 s^{-1}$ ) mellett a trombocita-adhézió igen erősen VWF-függővé válik.

Alacsony folyadéksúrlódás mellett a VWF nem játszik lényeges szerepet a trombocita-adhézióban. Több kutatócsoport foglalkozott annak megfejtésével, hogy mi a molekuláris oka a VWF különböző viselkedésének alacsony és magas folyadéksúrlódás körülményei között. Feltételezik, hogy a nagy molekulású multimerok megváltoztatják konformációjukat a súrlódás fizikai erejének hatására. Ezzel egybevágóak azok a megfigyelések, amelyek szerint a VWF magas folyadéksúrlódás körülményei között megváltoztatja globuláris konformációját,<sup>61</sup> illetve amelyek szerint a VWF-et hasító enzim, az ADAMTS13, a nagy molekulású multimerokat a nagy folyadéksúrlódás körülményei között hatékonyabban hasítja, mint csekély áramlásban. Bár ez a konformáció-változás nem minden kísérletes felállásban mutatható ki<sup>62</sup>, több laboratóriumnak<sup>63,64</sup> is sikerült kimérnie azt a fizikai erőt, aminek hatására az A2 domén „kinyílik”, ami jelentős mértékben alátámasztja a súrlódási erő hatására létrejövő konformációváltásról kialakított elméletet.

### *3. A VIII-as faktor stabilizálása*

A hemofiliás betegek VWF:Ag szintje normális, míg a FVIII szintje alacsony. Súlyos von Willebrand kóros betegek VWF:Ag szintje a detektálás határa alatt van, de FVIII szintjük is erősen csökkent (<10%). Ez jól mutatja, hogy a FVIII életideje milyen nagymértékben függ a VWF-fel kialakított non-kovalens kötéstől. A FVIII a VWF amino-terminusa közelében lévő helyhez kötődik. A kapcsolódás sebessége viszonylag gyors ( $5,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), ezért az exogén FVIII a szervezetben néhány másodperc alatt komplexet képez az endogén VWF-fel. A FVIII kötőhelyet a VWF amino-terminális 272 aminosava tartalmazza (**1. ábra**). A FVIII kapcsolódó kötőhelye a FVIII könnyűláncának amino-terminális részére esik. A trombinnal történő hasítás ( $\text{Arg}^{1689}$ ) szétrombolja ezt a kötőhelyet, s ezáltal a FVIIIa felszabadul.

### *A von Willebrand betegség osztályozása*

A VWB korábbi beosztása<sup>65</sup> az SDS-elektroforézis technikán s az annak segítségével vizsgálható multimer-struktúra analízisén alapult. Az évek során bonyolulttá vált felosztást 1994-ben felváltotta egy áttekinthetőbb, korszerűbb klasszifikáció,<sup>66</sup> melynek terápiás jelentősége is volt. Az 1994-es beosztás alapvető gondolatmenetét megtartva, de néhány új ismeretet is beépítve a Nemzetközi Trombózis és Hemosztázis Társaság (ISTH) VWF Munkacsoportja 2006-ban közölte a jelenleg is használatban lévő osztályozást.<sup>4</sup> Ezt a beosztást az **1. táblázat** foglalja össze. A kvantitatív defektuson belül megkülönböztetünk részleges hiányt (1-es típus) és teljes (vagy csaknem teljes) hiányt (súlyos 3-as típus). Noha e két típus patofiziológiája részben átfedésben van, a tünetek súlyossága közötti és a kezelésben fennálló

különbözések mégis megkívánják, hogy elkülönítsük őket. A kvalitatív (2-es) típuson belül négy altípust különböztetünk meg: 2A, a VWF-függő trombocitafunkciónak a nagy molekulásúlyú multimerek (HMWM) hiányából fakadó csökkenése; 2B, melyben a VWF fokozott GPIIb $\alpha$  affinitása okozza a funkciózavart; 2M (2-es multimer-normál), ahol a VWF-függő trombocitafunkció normál multimer eloszlás mellett csökkent; illetve 2N (normandiai típus), melyben csökkent a FVIII kötés. A molekuláris defektusok feltárása lehetőséget teremtett még finomabb beosztás létrehozására is (az alcsoporton belüli entitásokat variánsoknak nevezzük, és római számmal jelöljük pl. a 2A alcsoporton belül IIA, IID stb.).

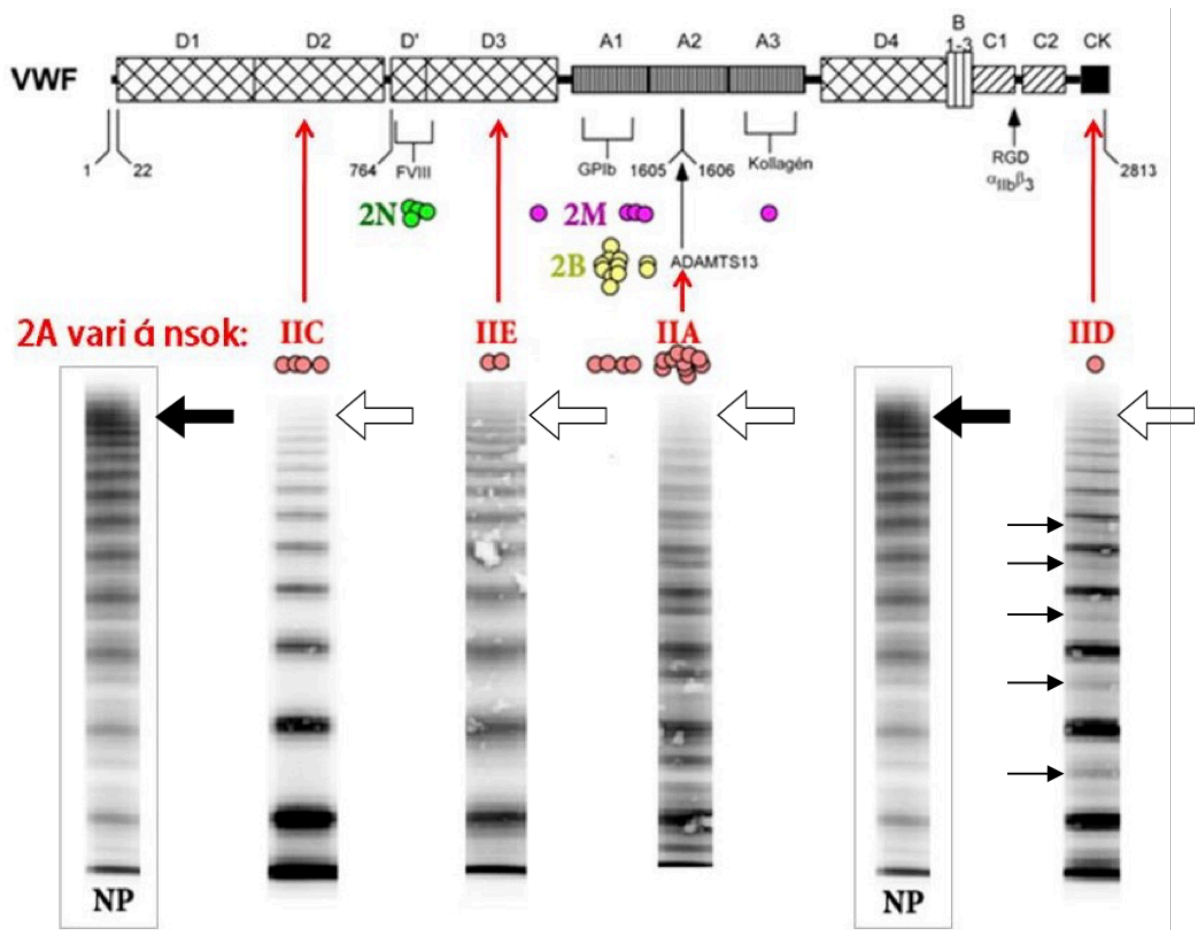
**1. TÁBLÁZAT. A von Willebrand betegség osztályozása<sup>4,5</sup>**

<b>Típus</b>	<b>Jellemző</b>
<b>1</b>	A VWF részleges hiánya, kvantitatív zavar
<b>2</b>	Kvalitatív VWF zavarok
<b>2A</b>	Csökkent VWF-függő trombocita-adhézió, mely a HMWM szelektív hiányával jár
<b>2B</b>	Fokozott VWF affinitás a trombociták GP Ib receptora iránt
<b>2M</b>	Csökkent VWF-függő trombocitafunkció, HMWM szelektív hiány nélkül
<b>2N</b>	Jelentősen csökkent FVIII-kötő képesség
<b>3</b>	A VWF teljes hiánya

HMWM: nagy molekulatömegű multimer

Az 1-es típusú VWB részleges kvantitatív hiány következménye. A kvantitatív hiányra abból az egyszerű klinikai megfigyelésből következtethetünk, hogy a VWF antigén szintje (VWF:Ag) és aktivitása arányosan csökken. Ez a leggyakoribb forma, melynek genetikai okait csak részlegesen ismerjük. Az öröklődés menet domináns ugyan, de a betegek jelentős részében a penetrancia nem teljes. Van azonban az 1-es típusú betegségnek olyan általában alacsony VWF szinttel és jelentős vérzékenységgel járó formája is, amelyben a penetrancia is magas (vagyis minden generáció érintett). Az 1-es típusú betegséggel foglalkozó tanulmányok csak a betegek egy részében találtak a *VWF* génen belül mutációt.<sup>67,68</sup> Általános megfigyelés, hogy minél alacsonyabb a VWF antigén szintje, annál valószínűbb, hogy megtaláljuk a felelős genetikai defektust. Mindebből látható, hogy az 1-es típusú VWB heterogén entitás. A betegség egy részéért pl. nem a VWF termelés hibája, hanem a fokozott clearance a felelős. Bár egyelőre hivatalos nomenklatúra még nem fogadta el, szokás ezt az altípust 1C (clearance miatti) névvel jelölni. Ma már tudjuk, hogy az 1C extrém formája az ún. Vicenza fenotípus. Mindez kutatásaink idejében még nem volt ismert. Ezért ezzel a variánssal részletesebben is foglalkoztam. Ráadásul a VWF szintje az egészséges populáción belül is igen széles határok közt változik, ezért az enyhén csökkent szint és az enyhe vagy bizonytalan vérzéses panaszok közötti ok-okozati összefüggés gyakran nem egyértelmű.

A 2-es típusú VWB a genetikailag legjobban feltérképezett típus, melyet az aktivitásnak az antigén szinthez képest aránytalanul nagy csökkenése jellemez. Kivételesen a VWF kódoló



**2. ÁBRA.** A leggyakoribb ismert 2A altípusú VWB-t okozó pontmutációk elhelyezkedése a prepro-VWF alegységen. Az SDS agaróz gélen a futás iránya föntről lefelé van, így a legkisebb méretű dimerek, melyek leggyorsabban futnak, alul helyezkednek el. A dimerek fölött tetramerek, fölöttük hexamerek láthatók, és így tovább egészen az igen nagy méretű multimerekig (balra mutató telt nyilak a normál plazma – NP – sávokban). A 2A típusú VWB jellemzője a nagyméretű multimerek hiánya (balra mutató üres nyilak). Az itt nem mutatott 2B altípus hasonló multimer mintázattal jár, mint a IIA. A szinkódolt pöttyök a mutációk elhelyezkedését mutatják a prepro-VWF alegységen belül. A 2A altípus variánsait római számok jelölik. A variánsok alatt a jellegzetes gélmintázatok láthatók. NP: normál plazma. A 2A altípuson belül valamennyi eddig azonosított IID variáns mutációja a cisztin csomó (cystine knot, CK) doménen belül helyezkedik el. Egyedül a IID variáns esetében fordul elő páratlan számú multimer (jobbra mutató nyilak).

régiójába eső pontmutációk okozzák. A pontmutációk a betegség altípusának megfelelően csoportosulnak a molekula különböző részein. A 2A altípus leggyakoribb pontmutációit a 2. ábra mutatja.

A pontmutációk elhelyezkedéséből a funkciókiesés logikusan következik. Az alábbiakban röviden áttekintem a főbb altípusokat, kiemelve a IID variánst.

A **2A** alcsoportba heterogén mutációk tartoznak. Közös jellemzőjük a nagy molekulatömegű multimerek hiánya. Minthogy *in vivo* éppen e nagy molekulatömegű multimerek rendelkeznek a szükséges biológiai aktivitással, a 2A betegek középsúlyos-súlyos vérzékenységekben szenvednek. A nagy molekulatömegű multimerek elvesztése különféle patomechanizmussal jöhet létre – ennek megfelelően különféle *variánsokat* különböztetünk meg, melyeket római számmal szokás jelölni. A leggyakoribb (IIA) variáns az A2 domén pontmutációjának következménye. A mutáció következtében az ADAMTS13 enzim hasítási helye exponálttá válik a normális, nehezen hozzáférhető konformációhoz képest. Így, bár a tárolt és szekretált multimerek normál eloszlásúak, a plazmában gyorsan hasadnak, és a keringő multimerek kisméretűek és következésképpen csökkent működésűek lesznek. A dimerizációért és multimerizációért felelős egyéb területek is áldozatul eshetnek mutációknak, ezáltal a 2A különféle variánsait hozva létre. A IIC a multimerizációban katalizátorként döntő szerepet játszó propeptid mutációinak következménye, míg a IIE a D3 domén multimer kötéseért felelős részének mutációi miatt jön létre. A 2A altípusba tartozó variánsok autoszomális domináns öröklődésmentet mutatnak, ami alól csak a recesszíven öröklődő IIC variáns kivétel.

A IID variáns különleges helyet foglal el a 2-es típusú betegségen belül. Ez az egyetlen olyan ismert VWB variáns, melyben páratlan számú alegységet tartalmazó multimerek is jelen vannak. A variáns patomechanizmusa egységes; valamennyi eddig ismert mutáció a dimerizációért felelős CK doménon belül található (**2. ábra**). Érdekes megfigyelni, hogy valamennyi eddig ismert IID fenotípushoz vezető mutáció ciszteint érint, mégpedig a CK domén három specifikus ciszteinjét: a p.C2771Y<sup>69</sup>, a p.C2773R<sup>70</sup> és a p.C2806R<sup>71</sup> okoz eddig bizonyított módon IID variáns VWB-t. További ismereteket *in vitro* kísérletekből lehetett meríteni: a rekombináns VWF fehérjében létrehozott két mutáció (p.C2754W<sup>72</sup> és p.C2773R<sup>70</sup>) is megakadályozta a dimerizációt. Ezekből az adatokból nyilvánvaló, hogy a IID variáns molekuláris patogenezise és a CK doménon belül lezajló dimerizáció szerves kapcsolatban állnak egymással. Mivel a CK domén pontos felépítése nem volt ismert, olyan kísérletsorozatot terveztünk, melynek segítségével diszulfid szerkezetét pontosan feltérképezhetjük. Klinikailag a IID VWB súlyos vérzékenységgel jár. A dimerizációs blokk miatt a DDAVP hatástalan; e betegeknek faktorpótlásra van szükségük.

A 2A alcsoportnál szűkebb területre lokalizálódnak a **2B** alcsoport mutációi. E típus megértéséhez tudnunk kell, hogy a VWF A1 domén GPIIb $\alpha$  kötése reguláció alatt áll. Erre természetesen szükség van, hiszen a keringésben káros lenne a kapcsolódás által létrejövő



trombocita-aggregáció. Ezért a kötőhely mindaddig gátlás alatt van, amíg a VWF sérült érfallal nem találkozik, ahová a kollagén-kötőhely segítségével kapcsolódhat. Ez a gátlás minden részletében nem ismert ugyan, de az bizonyos, hogy az A1 doménon belül egy jól körülhatárolható terület (a 803-as és 843-as aminosavak közötti szakasz) fontos szerepet játszik benne, és e terület ún. funkciónyerő mutációi ezt a gátlást felfüggesztik, fokozott, illetve spontán GPIIb $\alpha$  kötést idézve elő („*gain of function*”). A spontán kötés preferenciálisan a nagy molekulású multimereket érinti, amelyeket azután a hozzájuk kötődött trombocitákkal együtt a RES gyorsan eltávolítja a keringésből. Így e betegek gyakran enyhén trombocitopéniások (ami fontos körülmény a krónikus enyhe ITP differenciáldiagnózisában), ám vérzékenységük a trombocitopénia mértékét jóval meghaladja a nagy molekulású multimerek hiánya miatt. A trombocitopénia lehet intermittáló is, és a VWF-szintet emelő viszonyok között (pl. terhesség) gyakran fokozódik. A 2B alcsoport pontos diagnózisának fontos terápiás következménye, hogy ezeknek a betegeknek kontraindikált DDAVP-t adni, hiszen az a tüneteket súlyosbíthatja. A VWB 2B autoszomális domináns öröklődésmentet mutat.

A **2M** mutációk GPIIb $\alpha$  kötőhely közvetlen közelében vannak, olyan konformáció-változást okozva, amelynek következtében a VWF affinitása a trombocita VWF receptorához (GPIIb $\alpha$ ) lényegesen lecsökken a normál multimer eloszlás ellenére. Klinikailag a 2M altípus a 2A-val mindenben megegyező módon jelenik meg, egyedül a multimer mintázat segítségével lehet őket elkülöníteni. Az eddig ismertett „klasszikus” 2M altípuson kívül meg kell említenünk egy érdekes variánst is. Ez a variáns a kollagénkötő hely pontmutációjának következménye, és a többi 2M-hez hasonló módon vérzékenységet okoz.<sup>73</sup> A betegség ugyan ritka, de azért kell mégis külön említést tenni róla, mert ezekben a betegekben a VWF:RCo aktivitás normális, ezért ha csak ezt a tesztet használjuk szűrésre, nem ismerjük fel a betegséget.

Az eddig ismert valamennyi **2N** mutáció a VWF molekula N-terminális vége közelében található, ahol a FVIII kötőhelye van. Ez magyarázza, hogy ezeknek a betegeknek a VWF molekulája csak a FVIII kötési funkcióban károsodott. A 2N típusú betegség hasonlít az enyhe hemofiliára (és összetéveszthető vele, hiszen a rutin vizsgálatokkal alacsony FVIII:C, de normál VWF:Ag és aktivitási [VWF:RCo, illetve VWF:CB] szintet találunk). E családok öröklődésmentete hívhatja fel figyelmünket arra, hogy itt nem hemofiliáról van szó. A diagnózist a FVIII kötési teszt segítségével lehet felállítani. A pontos diagnózis igen lényeges, mert ezek a betegek más kezelést igényelnek, mint a hemofiliások, és a családok genetikai

tanácsadásakor is döntő a pontos öröklődésmenet ismerete. Tanulságos az a körülmény is, hogy a 2N betegség recesszív, míg a 2M domináns. Ez azért van, mert a FVIII kötés nem függ a multimer nagyságtól. Minden alegység képes egy FVIII molekula megkötésére, és ha az alegységek fele (heterozigóta 2N állapot) funkcionálisan érintetlen FVIII kötőhelyet tartalmaz, akkor a FVIII életideje még mindig normál határokon belül tartható. Ezzel szemben a trombocita-adhézió nagymértékben függ a multimer nagyságtól. Ezzel összhangban, ha az alegységek (a multimerben random módon elhelyezkedő) fele kóros GPIIb/IIIa kötőhellyel rendelkezik a 2M heterozigóta molekulában, akkor a multimer kötőképessége és ezen keresztül a VWF-függő trombocita-funkciók jól kimutatható és tünetekhez vezető módon károsodnak.

### *A 3-as típusú VWB-ről bővebben*

A von Willebrand betegség legsúlyosabb formája a 3-as típusú betegség. Ez az a típus, amelynek a betegség eredeti leírását köszönhetjük, hiszen Hjördisnek, von Willebrand doktor nevezetes betegének is 3-as típusú súlyos VWB-e volt.<sup>45</sup> Hjördis és testvérei története (lásd 7. old.) azt is jól példázza, hogy a 3-as típusú VWB kezelés nélkül gyakran halálos szövődményekhez vezet. Ezt a típust a VWF teljes hiánya okozza, ami az összes von Willebrand beteg kb. 1-5%-ában fordul elő. Az érintett betegek közepsúlyos vagy súlyos mukokután vérzékenységben szenvednek, FVIII szintjük is alacsony, ezért ízületi vagy mély izomvérzés is előfordul.<sup>74-76</sup> A 3-as típusú VWB autoszomális recesszív módon öröklődik.<sup>44,77</sup>

A 3-as típusú VWB prevalenciája igen széles határok között mozog a különböző populációkban. A legtöbb európai országban 0,11-0,55/millió, a skandináv országokban 2,4-3,12/millió, az USA-ban, Kanadában és Izraelben 1,38-1,6/millió, míg az arab országokban 5,3-6/millió lakos.<sup>74,78-80</sup> Magyarországon – amint az az itt részletezendő vizsgálatból kiderült – a prevalencia 2,5/millió lakos.<sup>81</sup>

A 3-as típusú VWB-ért felelős molekuláris defektusok szétszórva találhatók a gén egész területén, igen heterogének, és többségük ún. „null allélt” eredményez. A legtöbb 3-as típusú VWB mutáció kereteltolódást okozó kis deléciókból vagy inszerciókból, illetve korai stop kodont eredményező (nonszensz) mutációkból áll, melyek a fehérjeszintézist teljes egészében megakadályozzák homozigóta és kettős heterozigóta formában is. A *VWF* gén teljes vagy részleges nagyméretű (>10 bázispárt érintő) delécióit az eddig vizsgált 3-as típusú VWB populációkban csak a betegek egy csekély hányadában lehetett kimutatni a betegség hátterében.

Az eddig leírt számos mutáció közül csak nagyon keveset találtak meg több egymással nem rokon családban is (ún. ismétlődő mutációk). Az egyik ilyen nevezetes ismétlődő mutáció a Balti-tenger környéki populációkban észlelt, egyetlen citozin deléciója (c.2435delC) által létrehozott kereteltolódás a 18-as exonban.<sup>76,82</sup> Hjördis családja vérzékenységét is ez a mutáció okozta.<sup>45</sup> Ezen kívül ismételten előfordult még a 2535-ös pozíció mutációra érzékeny arginin CGA kodonjában korai stop kodont (TGA) eredményező (nonszensz) mutáció (p.R2535X)<sup>76,82-85</sup> és két részleges nagy deléció is.<sup>86,87</sup>

A mutációk létrejöttének mechanizmusáról nem sok ismerettel rendelkezünk. Érdekes – és jelenleg általánosan elfogadott – elmélet szerint bizonyos mutációk a VWF pszeudogénnel való rekombináció, ún. génkonverzió eredményeként jöttek létre.<sup>88</sup> Az elméletnek az az alapja, hogy ezen mutációk esetében nem csak a kórokozó mutációt figyelték meg, hanem az érintett régió környezetében több más néma báziscsere is előfordul, és ezek hajszállra megegyeznek a pszeudogén megfelelő szakaszának szekvenciájával. Ebből arra következtettek, hogy homológ rekombinációs esemény történt, melynek során az adott génszakasz kicserélődött. Korábban ez volt az egyetlen elmélet, mely a keletkezés mechanizmusával foglalkozott, viszont két nemrégiben publikált cikk éppen a részleges nagy deléciók létrejöttének háttérében vélt felfedezni Alu-mechanizmusú rekombinációs eseményt egy kínai és több nagy-britanniai családban.<sup>87,89</sup>

A 3-as típusú VWB ritka, ám súlyos szövődménye az alloantitest-képződés. VWF ellenes alloantitest az összes 3-as típusú betegek mindössze 7,5-9,5%-ában fordul elő<sup>90,91</sup>, viszont az irodalmi adatok szerint a *VWF* gén ritkán előforduló **homozigóta részleges vagy teljes deléciója néhány kivételtől eltekintve mindig alloantitest-képződéssel járt.**<sup>76,84,85,89,92-95</sup> A VWF ellenes alloantitest-képződés azért súlyos szövődmény, mert nemcsak a faktorpótlást teszi lehetetlenné, de gyakran életveszélyes anafilaxiás reakcióhoz is vezet.<sup>84-86,89,92-95</sup>

## A szerzett inhibitoros hemofília

A régen pszeudo-hemofiliának is nevezett szerzett hemofília A (AHA) az 1940-es évek óta ismert.<sup>96</sup> Az AHA ritka, súlyos vérzékenység, amelyet a VIII-as faktor (FVIII) ellenes autoantitestek okoznak. Az antitestek neutralizálják a FVIII-t és clearance-ét is fokozzák. A betegség ritka, prevalenciáját évi 1,48 esetre becsülik egymillió lakosra számítva.<sup>10</sup> A vérzéses manifesztációk sokfélék lehetnek, az enyhétől a súlyosig, sőt életveszélyesig, és a halálozás elérheti a 22%-ot.<sup>10,97-99</sup> A betegek 44–63%-ában az AHA nem jár más alapbetegséggel (idiopátiás AHA).<sup>2,10,98,100</sup> A fennmaradó betegeknél az AHA malignus kórképekhez (elsősorban limfoproliferatív neoplazmák) (6–18%), autoimmun betegségekhez (9–17%), terhességhez (2–15%), vagy bizonyos gyógyszerekhez (3–5%) társul.

A szerzett hemofília A kezelésének két alappillére az akut vérzéscsillapítás és az immunszuppresszív terápia (IST). A vérzéscsillapítás nagyon fontos a betegek azonnali túlélése és hosszabb távú egészsége szempontjából, de a gyógyulás az immunszuppresszív terápia hatásosságától és mellékhatásaitól függ. A retrospektív vizsgálatokon és szakértők véleményein alapuló szakmai irányelvek azonnali immunszuppresszív terápiát javasolnak, amint a diagnózis felállítása megtörtént,<sup>101,102</sup> ugyanakkor figyelmeztetnek az IST jelentős toxicitására, sőt mortalitására az esendő, általában idős betegek esetében.<sup>5,103,104</sup> Bár a hosszú távú betegségmentes túlélés szempontjából kritikus, ezek az irányelvek nem adnak világos útmutatást azzal kapcsolatban, hogy milyen IST-t is kell alkalmazni. A jelenlegi protokollok mindegyike lépcsőzetesen bevezetett kezelést alkalmaz, ami általában prednisolon (napi 1 mg/kg, per os) adásával kezdődik hat hétig. A protokollok egy része orális cyclofoszfamidot is ad az elsővonalas terápiához napi 1,5-2 mg/kg dózisban. Amennyiben ez a terápia nem vezet eredményre, másodvonalbeli szerek következnek (cyclosporin, rituximab és mások). A rendelkezésre álló (de AHA-ban off-label), szubkután adható emicizumab a vérzéskontrollt leegyszerűsítette, és elméletileg lehetővé tette a potenciálisan toxikus immunszuppresszió késleltetését, illetve elhagyását,<sup>105</sup> amely újszerű és kérdéses megközelítést egy klinikai vizsgálat (#NCT04188639) jelenleg igyekszik tesztelni. Azonban az emicizumab magas költségei és az oki kezelés késleltetésének bizonytalan hosszú távú kimenetele miatt ez a megközelítés kérdéses és semmiképpen nem tekinthető elfogadottnak. A jelenlegi európai gyakorlat nagyrészt összhangban van ezen ajánlásokkal, melyek az immunszuppresszió azonnali megkezdését javasolják, amint ezt az Európai Szerzett Hemofília Regiszter (EACH2)<sup>3</sup>, a Spanyol Szerzett Hemofília A Regiszter (AHASR)<sup>12</sup> és egy német prospektív tanulmány<sup>7</sup>

adatai egybevágóan tükrözik. Bár az Egyesült Államokból nem állnak rendelkezésre hasonló adatok, az amerikai gyakorlatról is feltételezhető, hogy nagyrészt hasonló/azonos az európaival.

A lépcsőzetesen alkalmazott immunszuppresszióval szerzett sok negatív tapasztalat vezetett egy újszerű megközelítéshez, a rögtön első vonalban adott három gyógyszert (**C**yclofoszfamid, **D**examethason és **R**ituximab) lökészerűen alkalmazó, de egyúttal limitált szteroid-expozícióval járó protokoll (CyDRi) bevezetéséhez. Bár a szteroidok, a cyclofoszfamid és a rituximab is az AHA-ban alkalmazott immunszuppresszív kezelések bevett összetevői, a CyDRi több szempontból is újszerű koncepciót képvisel: (1) szteroid komponensként dexamethasont alkalmaz; (2) azonnal hármas kombinációt ad első vonalban; (3) mindhárom gyógyszert lökészerűen adjuk; és (4) változatlan kombinációs kezelést adunk rezisztens vagy visszaesett betegség esetén. Ezek a jellegzetességek megkülönböztetik a CyDRi-t az összes korábban közölt immunszuppresszív kezeléstől. Vizsgálataim kezdetén nem volt még tapasztalat ezzel a kezelési sémával.

## Tromboembóliás betegségek

A vénás tromboembólia (VTE) nemcsak a halálozás egyik vezető oka a civilizált világban, de a kórházi halálozás legfontosabb megelőzhető okának is tartjuk. A VTE esemény kiváltó oka (pl. trauma, műtét, immobilizáció vagy daganatos betegség) nem mindig nyilvánvaló – ezeket a tromboembóliákat kiváltó ok nélkülinek (*untriggered, unprovoked*), idiopátiásnak vagy provokálatlannak hívjuk. Természetes a betegek és kezelőorvosaik részéről a kíváncsiság, hogy vajon mi okozhatta ezt a váratlan eseményt. Erre irányul a trombofilia kivizsgálás.

Az antitrombin (AT) hiány 1965-ben történt felfedezése<sup>106</sup> óta számos örökletes és szerzett trombofiliát írtak le a vénás tromboembólia (VTE) kockázati tényezőjeként.<sup>107</sup> Ami a VTE kezelését illeti, a trombofiliák szerepe az antikoaguláns kezelés időtartamának vagy a kezelésre használt gyógyszerek megválasztásának eldöntésében továbbra is bizonytalan.<sup>108,109</sup> A mindennapi gyakorlatban azonban az orvosok (és a betegek is) gyakran hajlamosak trombofilia vizsgálatot kérni abban a reményben, hogy (1) megtalálják a VTE hajlamosító okát, (2) segítséget kapnak a VTE kiújulási kockázatának megítéléséhez, vagy (3) a családtagok VTE kockázatának becsléséhez; illetve (4) olyan információkhoz jutnak, amelyek segítenek a kezelés optimalizálásában. Nincs egyetértés a szakemberek körében arról, hogy mikor hasznos a trombofilia vizsgálatokból szerezhető információ, és hogy pontosan mely trombofilia vizsgálati panelt is kellene végezni, ha indokolt ez a vizsgálat.<sup>110</sup> Az irányelvek általánosságokat tartalmaznak, melyek lényege, hogy az antikoaguláció időtartamát az egyes betegek esetében a beteg kezelés nélküli VTE recidívája és a kezeléssel járó vérzéses kockázat mérlegelése alapján határozzuk meg.<sup>111</sup> A brit National Institute for Health and Care Excellence (Nemzeti Egészségügyi Kiválósági Intézet) iránymutatásai az általános józan orvosi gondolkodást követve azt javasolják, hogy trombofilia vizsgálatokat csak akkor végezzünk, ha az eredmények befolyásolni fogják a beteg kezelésének menetét.<sup>112</sup>

A trombofilia kivizsgálás szűrővizsgálatként (tehát olyan személynél, akinek tromboembóliás [TE] eseménye soha nem volt), minden irányelv szerint indokolatlan, sőt káros. A már bekövetkezett TE esemény kivizsgálása során szóba jövő trombofiliákhoz kapcsolódó recidíva relatív rizikója tekintetében jelentős heterogenitás tapasztalható a szakirodalomban.<sup>113,114</sup> A VTE előfordulása vagy kiújulása tekintetében az adott trombofilia szerepének meghatározását egy adott betegnél tovább nehezíti az a tény, hogy számos belső és külső szituációs tényező (pl. az életkor, a nem, a testtömegindex, a terhesség vagy műtét utáni állapot) változó és bizonytalan kölcsönhatásban áll a kérdéses trombofiliával, és tág határok közt változó mértékben okozhat

trombotikus eseményt egy adott pillanatban. Korlátozott adatok állnak rendelkezésre a különböző antikoaguláns osztályok hatékonyságának összehasonlításáról a trombofiliás betegek esetében. Egy nemrégiben készült szisztematikus áttekintés és metaanalízis szerint nagy kockázatú antifoszfolipid szindrómában (APS) szenvedő betegek kezelésére a K-vitamin-antagonisták (KVA) előnyösebbek a közvetlenül ható orális antikoagulánsoknál (DOAC), míg a többi trombofiliás beteg esetében e kezelési lehetőségek hatékonysága egyenértékű, de a DOAC szerek biztonságosabbak.<sup>115,116</sup>

A trombózisok egy részénél tehát ki lehet mutatni valamely veleszületett vagy esetleg szerzett tényezőt, amely a VTE kockázatot ismerten növeli. Amióta ezen tényezők vizsgálata széles körben elérhetővé vált, e vizsgálatok igen népszerűvé váltak a klinikusok körében. Ennek ellenére igen ellentmondásos, illetve kérdéses, hogy a trombofilia vizsgálati eredmények valóban segítik-e a betegek kezelésében fontos klinikai döntések meghozatalát.

A betegek egy kisebb részében nyilvánvalóan valamilyen agresszív trombozishajlam – trombofilia – áll az esemény háttérében. Ez szinte mindig szerzett betegség, illetve szerzett betegséghez társul. Az agresszív trombofilia nem széles körben használt fogalom, az ezzel kapcsolatos megfigyelések, illetve vizsgálatok a kutatás homlokterébe tartoznak (APS, paroxizmális nokturnális hemoglobinuria [PNH], mieloproliferatív neoplazmák [MPN]), mivel e betegségek különleges odafigyelést és esetenként külön kezelést is igényelnek.

A trombozishajlam az orvosi kezelés jatrogén következménye is lehet. Az akut limfoid leukémia (ALL) standard kezeléséhez tartozó aszparagináz nemritkán szövődik VTE eseménnyel. Ez nehéz helyzetet teremt, mert a megelőzés szokásos gyógyszere a kis molekulású heparin (LMWH) csak antitrombin jelenlétében hatásos, amely fehérje szintjét az aszparagináz lényegesen csökkenti. Az aszparagináz VTE szövődményeinek megelőzésére és kezelésére irányuló stratégiák a DOAC típusú szerek megjelenésével lényeges átalakulás előtt állnak.

### ***Trombotikus mikroangiopátiák***

A von Willebrand faktor szintézisekor nagy arányban tartalmaz igen nagy (*ultra-large, UL*) méretű multimereket, melyek „méretre igazítását” az ADAMTS13 (*a desintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs 13*<sup>117</sup>) nevű metalloproteáz végzi. E rendszer pontosan szabályzott működése kritikus a hemosztázis integritása szempontjából: az UL multimerek mikrotrombózisokat okoznak a VWF hiperreaktivitása miatt, míg a túl kicsi

multimerek (amint azt a 2A és 2B típusú von Willebrand kórbán látjuk) vérzékenységgel járnak. Amennyiben ez a „méretre igazítási” funkció kiesik, a túlméretezett és spontán is aktív UL multimerek a mikrocirkulációban trombotikus folyamatot indítanak el, aminek következménye egy életveszélyesen súlyos kórkép, a TTP (trombotikus trombocitopéniás purpura). E betegség leggyakrabban az ADAMTS13 elleni autoimmun folyamat eredménye.

Az autoimmun (immun-mediált) trombotikus trombocitopéniás purpura (iTTP) életveszélyes trombotikus mikroangiopátia, a kezeletlen esetek mortalitása a 80%-ot is elérheti. Az iTTP az ADAMTS13 enzim súlyos hiányával jár.<sup>118,119</sup> Klasszikusan az iTTP az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek B-sejt eredetű plazmasejtek által történő termeléséből ered, ami kritikusan alacsony aktivitási szintekhez (<10%) és ezáltal VWF-ben és a hiperaktív VWF-hez kötött trombocitákban gazdag trombusok kialakulásához vezet. Ez elsősorban a mikrovaszkulátúrában következik be, ahol a súrlódási erők a legmagasabbak, ezért a VWF aktiválódása is hamarabb következik be. Az iTTP következményes trombocitopéniával, mechanikus hemolitikus anémiával (ún. mikroangiopátiás hemolitikus anémia, MAHA) jár, aminek a perifériás kenetben látható jele a fragmentociták jelenléte.<sup>120</sup> Az iTTP hatékony kezeléséhez az auto-reaktív IgG termelésért felelős B-sejt vonal megfékezésére van szükség, amit immunmoduláló szerekkel igyekszünk elérni (szteroidok és rituximab) a terápiás plazmacserét (TPEx) tartalmazó fő kezelési gerinc mellett, amely az ADAMTS13-t pótolja és egyúttal eltávolítja az autoantitestek egy részét is.<sup>121</sup>

A rituximab humanizált egér anti-CD20 monoklonális IgG1k antitest, amelyet gyakran alkalmaznak az iTTP kezelési sémáiban, és amely irodalmi adatok szerint megelőzi a relapszust és csökkenti a mortalitást.<sup>122-125</sup> Felezési ideje körülbelül 2-3 hét, de végső soron függ a kezelt alapteregségtől, az egyidejűleg alkalmazott TPEx jelenlététől és a CD20<sup>+</sup> limfocita tömegtől. A rituximab a CD20<sup>+</sup> limfocitákat több mechanizmuson keresztül eliminálja, beleértve az antitest-függő celluláris citotoxicitást, a komplement-függő citotoxicitást és az apoptózist<sup>126</sup>. A rituximab egyidejűleg alkalmazott TPEx mellett a rituximab farmakokinetikájára vonatkozó adatok igen korlátozottak, és ilyen akut helyzetben nem ismert optimális adagolása, időzítése, és a tartós, hatásos klinikai válasz eléréséhez szükséges rituximab adagok száma sem. Korai, elsővonalbeli alkalmazását maga a plazmaferezis teszi kétségessé, hiszen a beadott gyógyszert rögtön kiferetizálhatjuk. Klinikailag igen lényeges kérdés tehát, hogy a plazmaferezissel együtt alkalmazott rituximab vajon milyen mértékben hatásos.



## CÉLKITŰZÉSEK

Törvényszerűen hamisnak érezzük, amikor hosszú évek kutatómunkáját felmutató írás előtt az egész munka tervszerűségét igazolni igyekvő célokról olvasunk. Azért érezzük ezt hamisnak, mert egy „Célkitűzések” fejezet óhatatlanul azt a látszatot kelti, mintha a munka kezdetekor az egész több éves, évtizedes kutatás valamennyi célja világos és kitűzhető lett volna. Pedig a kutató hasonlatos a vadászhoz, aki reggel elindul az erdőbe, azzal a céllal, hogy az eléje kerülő vadakra vadásszon. Reggel még nem tudhatja, hogy aznap nyulat, vagy őzet, vagy valami egészen mást hoz-e puskája elé a vadászszerencse. A kutató nemkülönben, azzal az elhatározással mélyed el egy terület vizsgálatában, hogy fontos kérdéseket ismerjen föl, és azokra megpróbálja megbízható válaszokat találni. Egy kutatás elején a munka során felmerülő valamennyi kérdés általában még nem ismert részleteiben, gyakran egy-egy válasz derít csak fényt a következő, akár még fontosabb kérdésre.

1997-ben csatlakoztam Evan Sadler laboratóriumához. Ebben a laborban az volt a rendszer, hogy a fiatal kutatók saját témát – projektet – kapnak, amelybe belátásuk szerint áshatják bele magukat, de igényük szerint kapnak elméleti és technikai segítséget. A magas penetranciájú súlyos 1-es típusú von Willebrand betegség molekuláris patomechanizmusával kezdtem foglalkozni, amely kérdésnek már volt előzménye a laborban, ugyanis egy előttem ott járt holland kutató éppen egy súlyos 1-es típusú VWB-t okozó mutációt azonosított (c.C1149R). Párhuzamosan dolgoztam tehát e mutáció expressziós vizsgálatán és azon a kérdésen, hogy Kelet-Magyarországon vajon milyen mutációk vezetnek ehhez a fenotípushoz. Ez vezetett el a Vicenza variáns kérdéseihez. Közben – mivel nyilvánvalóvá vált, hogy a negatív domináns hatás kialakulásában fontos a szintetizálódó fehérje dimer szerkezete – elkezdtek körüljárni, hogy a dimerizáció hogyan is történik. Ez a „mellékvonal”, mint gyakran lenni szokott, különálló életre kelt, többen is dolgoztunk rajta, hogy a munkát befejezhessük. Magyarországra hazatérve logikus volt a kérdésfeltevések „*in silico*” megközelítése, ami egy egészen újszerű modell kidolgozásához vezetett. Ennek nagy hasznát vettük a Vicenza fenotípus megértésében. Végül a rendelkezésre álló itthoni erőforrások logikusan vezettek a viszonylag kis létszámú, 3-as típusú VWB populáció vizsgálatához, mely azután számos új kérdést vetett fel.

Ha tehát – utólag – e célokat logikus füzérbe akarjuk fűzni, akkor a célkitűzéseket a következő rendszerbe foglalhatjuk: A vizsgálatokat vérzékenységet és trombólízishajlamot vizsgáló

kutatásokra osztottam. A vérzékenységen belül két betegséggel foglalkoztam részletesebben, a von Willebrand betegséggel és a szerzett inhibitoros hemofiliával. Vizsgálataim fő fókusza a VWB patomechanizmusának tisztázása volt, ezért ezzel a disszertációban is részletesebben foglalkozom. E vizsgálatokat úgy lehetne logikus rendszerbe foglalni, hogy ha az egyes patológiás folyamatokat a VWF szintézisének útját követve állítjuk sorrendbe, vagyis a szintézis kezdeti fázisait is érintő genetikai defektusok (3-as típusú VWB) vizsgálatát a dimerizáció folyamatának tisztázására irányuló kísérletek követik, és végül az 1-es típusú betegséggel foglalkozom, mely intakt fehérje szintézise mellett (gyakran kóros clearance következtében) inkomplett kvantitatív hiányt eredményez. A patomechanizmus részleteire irányuló vizsgálatokat követi a klinikai jellegű, a laboratóriumi diagnosztika és a kezelés fejlesztésére, standardizálására irányuló kutatások bemutatása.

### ***A von Willebrand betegséggel foglalkozó vizsgálatok céljai***

#### ***A VWB jellemzése, molekuláris patogenezise***

- 1) A 3-as típusú VWB pontosabb klinikai jellemzése érdekében részt vettünk egy nagy nemzetközi vizsgálatban (3WINTERS-IPS). Különösen a vérzéses tünetek jellemzését tartottuk fontosnak.
- 2) További fontos célkitűzés volt a **súlyos 3-as típusú VWB genetikájának hazai feltérképezése**.
  - *Részkérdések:* – Klinikai és molekuláris adatok gyűjtése. – Az adatokból felmerülő kérdések megfogalmazása. – A nagy deléciók és a VWF elleni alloantitest-képződés összefüggésének vizsgálata. – A delExon 1-3 elterjedtségének vizsgálata deléció-specifikus PCR alkalmazásával. – A delExon1-3 mutációt hordozó betegek haplotípusainak összehasonlítása. – A deléció létrejöttéhez vezető alapító hatás időpontjának megközelítése genealógiai eszközökkel.
- 3) A magyarországi 3-as típusú VWB betegpopulációban talált, és erre a betegcsoportra jellemző **nagy deléció molekuláris mechanizmusának** tisztázása is célunk volt.
  - *Részkérdések:* – A delExon1-3 létrejöttének mechanizmusa *in silico* elemzés segítségével. – A p.R924Q mutáció/polimorfizmus hatásmechanizmusának megközelítése.
- 4) Célul tűztük ki a **VWF dimerizáció részleteinek pontosabb feltérképezését** annak tisztázásával, hogy a ciszteinekben igen gazdag VWF CK doménen belül mely ciszteinek

alkotják az intermolekuláris diszulfid kötést és melyek az intra-molekuláris diszulfid hidakat. Ehhez meg kellett oldanunk a VWF molekula C-terminális fragmensének biokémiai módosítását úgy, hogy a módosított termékek tömegspektrometriás elemzése és szekvenálása révén meg tudjuk fejteni a CK domén diszulfid szerkezetét.

- *Részkérdések:* – Milyen előzetes hipotéziseket állíthatunk fel a VWF CK doménnel analóg fehérjék tanulmányozása révén? – Melyek lennének a legalkalmasabb C-terminális fragmensek a kitűzött cél elérésére? – Hogyan lehet a mérésekkel felhalmozott információt a molekuláris modellezés segítségével integrálni? – Végül hogyan segít megérteni a megfejtett diszulfid szerkezet a IID variáns patomechanizmusát?
- 5) További fontos célkitűzésünk volt a kvantitatív VWF defektusokon belül a **magas penetranciájú súlyos 1-es típusú VWB** előfordulási gyakoriságának és molekuláris hátterének megismerése.
- *Részkérdés:* mely mutációk okoznak leggyakrabban nagy penetranciájú súlyos 1-es típusú VWB-t egy reprezentatív kelet-magyarországi régióban?
- 6) A súlyos 1-es típusú VWB vizsgálata során talált mutációk közül célul tűztük ki a **p.C1130Y és p.C1149R molekuláris patomechanizmusának megfejtését**, illetve ennek érdekében kísérletes molekuláris modell létrehozását. Ennek érdekében rekombináns fehérje technika segítségével olyan molekuláris modellt szeretünk volna kidolgozni, melynek segítségével igazolni lehet azt a hipotézist, hogy a mutáns és vad típusú alegységek egymással heterodimert képeznek, és a mutáns és normál alegységek is degradálódnak a sejten belül.
- *Részkérdések:* – Jellemezzük a deléciós konstrukciókat – Próbáljuk matematikailag megközelíteni, hogy a heterodimer képződés random folyamat-e? – Szerepe van-e a szabadon maradt Cys<sup>1169</sup>-nek a retencióban? – A proteaszóma-e a retenció organelluma?
- 7) További célul tűztük ki a két családban is azonosított p.R1205H aminosavcsere (az ún. **Vicenza fenotípus**) molekuláris mechanizmusának mélyebb megértését kísérletesen és egy matematikai modell kidolgozása révén. Hogyan lehetne klinikai mérésekkel és egy matematikai modell segítségével tesztelni azt a hipotézist, hogy a Vicenza fenotípus minden összetevője a gyorsult clearance egyenes következménye?
- *Részkérdések:* – Hogyan lehetne a korábbi adatoknál meggyőzőbben igazolni, hogy a Vicenza betegekben valóban lényegesen gyorsult a clearance? – Igazolható vagy kizárható-

e az a hipotézis rekombináns technikát felhasználva, hogy a Vicenza fenotípus ektópiás multimerizáció következménye? – Reprodukálható-e matematikai modellünkben a Vicenza fenotípus valamennyi jellegzetessége pusztán a clearance fokozásával?

#### ***A VWF diagnosztikájának fejlesztése***

- 8) A VWF aktivitás mérésére szolgáló assay-k áttekintését és egységes, a mérési elvet tükröző nomenklatúra kialakítását is feladatul tűztük ki.
- 9) Fontos cél volt a különféle mérési elveket alkalmazó VWF aktivitás meghatározások összehasonlítása egy objektív, a mintákat vakon elemző multicentrikus vizsgálatban.
- 10) Külön célként fogalmaztuk meg, hogy a különféle módszerekkel eltérő eredményt mutató minták esetében utánajárjunk a különbség okainak.

#### ***A VWB helyes kezelése***

- 11) Végül célul tűztük ki a VWB kezelésével kapcsolatos elvek összefoglalását, gyakorlati irányelv összeállítását a klinikusok számára.

#### ***A szerzett inhibitoros hemofiliával kapcsolatos célkitűzések***

- 12) Célunk volt újszerű és egységes kezelési eljárás kidolgozása a szerzett inhibitoros hemofília (AHA) immunszuppressziójának biztosítására.
- 13) Célunk volt az általunk kidolgozott CyDRi immunszuppresszió hatékonyságának összehasonlítása az irodalmi adatokkal.

#### ***Tromboembóliás betegségekkel kapcsolatos célkitűzések***

##### ***Vénás tromboembóliák***

- 14) Mennyiben segítik a trombofília vizsgálatok e betegek kezelésének vezetését?
- 15) Cél volt a trombózishajlam okainak vizsgálata SLE-ben.
- 16) Mi a legmegfelelőbb stratégia az aszparagináz kezeléssel járó trombózis kezelésére és megelőzésére?
- 17) Kitűzött cél volt a PNH, az egyik legagresszívabb trombofília, kezelési irányelveinek kidolgozása Közép-Európában.

##### ***A trombotikus microangiopátiákkal kapcsolatos célok***

- 18) iTTP-ben szenvedő betegek kezelésére szimultán alkalmazható-e a plazmaferezis és a rituximab?

## BETEGEK, MÓDSZEREK

### *Betegek, adatgyűjtés és statisztikai módszerek*

Az **1-es típusú VWB** populáció vizsgálatához a Debreceni Egyetem regiszterét használtuk. Itt 257 ilyen beteget tartottak számon. A vizsgálat a kórlapok retrospektív áttekintésével kezdődött. **221** beteg családjából egyetlenként szerepelt a regiszterben – velük ebben a vizsgálatban nem foglalkoztunk. A fennmaradó 36 beteg (14%) közül öt családot tudtunk kiválasztani, akikre illett a nagy penetranciájú súlyos VWB definíciója, amit a következőképpen definiáltunk: (a) domináns öröklődésmenet, amely minden generációban tünetes az érintett családtagokban, (b) 20 IU/dl alatti VWF:Ag szintek, melyek szintén minden generációban kimutathatóak, (c) normál multimer mintázat és (d) az Ag szinttel arányos VWF funkciócsökkenés (vagyis  $VWF:RCo/VWF:Ag > 0,7$ ). Az így azonosított betegektől a következő vizitkor amúgy is esedékes vérvétel során vettünk vért a genetikai vizsgálatához is. Két Vicenza típusú VWB családot találtunk a fentebb leírt módon azonosított öt család között.<sup>127</sup> Mindkét családban szekvenáltuk a teljes *VWF* gén kódoló szakaszát. A betegek mind beleegyező nyilatkozatot írtak alá, és a vizsgálatot az ETT és a helyi etikai bizottság is engedélyezte. Az egyik család három tagjánál DDAVP és Haemate P adás után többszörös vérmintát is vettünk a VWF kinetika meghatározásához. A DDAVP-t 0,3 µg/kg adagban alkalmaztuk, 15 perces infúzióban. Valamennyi beteg, aki a jelen vizsgálat keretében Haemate P-t kapott, korábbi vérzéses epizódok kapcsán már részesült Haemate P faktorpótlásban. A Haemate P adagja 60 NE/kg volt (VWF:RCo egységben megadva).

A **3-as típusú VWD** magyarországi vizsgálataihoz a betegeket az országos regiszterben azonosítottuk. ETT engedély alapján minden beteg beleegyező nyilatkozatot töltött ki. A vérvételek az egyébként is esedékes laborvizsgálatok alkalmával történtek. Klinikai adataikat a dokumentációból és személyes anamnézis során gyűjtöttük és de-identifikáltuk. A vizsgálatba 24 beteget vontunk be, 23 egymással rokonságban nem álló családból. A bevonási kritériumok a következők voltak: (1) VWF:Ag <5% és (2) recesszív öröklődésmenetet tükröző családi anamnézis. Az anamnézist felvevő orvos standardizált kérdőívet<sup>128</sup> töltött ki a vérzéses eseményekről, kezelésekről és a családi adatokról. A vérzésmutatót (*bleeding score*, vagy *bleeding assessment tool – BAT*) az irodalomnak<sup>19</sup> megfelelően számoltuk, a kérdőívet az **2. táblázat** mutatja. A részletes genealógiai adatokat a betegekkal és a családtörténetet jól ismerő családtagjaikkal történő személyes és telefoninterjúk révén rögzítettük. Ezen interjúk előtt a betegek és családtagjaik átnézték a család rendelkezésére álló anyakönyvi kivonatokat és

keresztleveleket. A hivatalos állami levéltárra nem volt módunk kiterjeszteni a kutatást. Valamennyi beteg részletes beleegyező nyilatkozatot írt alá.

**2. TÁBLÁZAT. A magyarországi 3-as típusú betegek felmérésénél használt vérzékenységmutató (bleeding assessment tool – BAT, Tosetto és mtsai<sup>19</sup>)**

Vérzés típusa	-1	0	1	2	3	4	Pontszám min: -3; max: 45
<b>Orrvérzés</b>	-	Nincs, vagy triviális vérzés (<5 epizód)	>5 epizód, vagy >10 perc/epizód	Hemosztázis konzultáció	Tamponád, kauterezés v. antifibrinolitikum	Transzfúzió, DDAVP, vagy faktorpótlás	
<b>Bőrvérzés</b>	-	Nincs, vagy triviális vérzés (<5 epizód)	Spontán, >1 cm	Hemosztázis konzultáció	-	-	
<b>Vérzés minor sebből</b>	-	Nincs, vagy triviális vérzés (<5 epizód)	>5 epizód, vagy >5 perc/epizód	Hemosztázis konzultáció	Sebészi vérzéscsillapítás	Transzfúzió, DDAVP, vagy faktorpótlás	
<b>Szájüregi vérzés</b>	-	Nincs	Legalább egyszer szakorvosi beutalás	Hemosztázis konzultáció	Sebészi vérzéscsillapítás, antifibrinolitikum	Transzfúzió, DDAVP vagy faktorpótlás	
<b>Gastro-intesztinális vérzés</b>	-	Nincs	Fekélyhez, portális hipertenzióhoz, angiodiszpláziához vagy aranyérhez társuló	Spontán	Sebészi vérzéscsillapítás, transzfúzió, DDAVP vagy faktorpótlás; antifibrinolitikum	-	
<b>Izom hematóma</b>	-	Soha nem volt	Trauma után; kezelés nem szükséges	Spontán; kezelés nem szükséges	Spontán vagy trauma után; DDAVP vagy faktorpótlás	Transzfúzió vagy sebészi ellátás	
<b>Ízületi vérzés</b>	-	Soha nem volt	Trauma után; kezelés nem szükséges	Spontán; kezelés nem szükséges	Spontán vagy trauma után; DDAVP vagy faktorpótlás	Transzfúzió vagy sebészi ellátás	
<b>Menorrhagia</b>	-	Nincs	Hemosztázis konzultáció	Anti-fibrinolitikum, fogamzásgátló	Vaspótlás, abrázió	Transzfúzió, DDAVP, vagy faktorpótlás, vagy hisztterektómia	
<b>Központi idegrendszeri vérzés</b>	-	Soha nem volt	-	-	Szubdurális hematóma	Intracerebrális vérzés	
<b>Fogházás utáni vérzés</b>	Legalább két extrakció után nem volt vérzés	≤1 extrakció után nem volt vérzés	Szakorvosi beutalás a beavatkozások ≤25%-ában; intervenció nélkül	Szakorvosi beutalás a beavatkozások ≥25%-ában; intervenció nélkül	Fogászati öltés vagy helyi vérzéscsillapítás	Transzfúzió, DDAVP vagy faktorpótlás	
<b>Műtét utáni vérzés</b>	Legalább két műtét után nem volt vérzés	≤1 műtét után nem volt vérzés	Szakorvosi beutalás a beavatkozások ≤25%-ában; intervenció nélkül	Szakorvosi beutalás a beavatkozások ≥25%-ában; intervenció nélkül	Sebészi vérzéscsillapítás, antifibrinolitikum	Transzfúzió, DDAVP vagy faktorpótlás	
<b>Post-partum vérzés</b>	Legalább két szülés után nem volt vérzés	≤1 szülés után nem volt vérzés	Hemosztázis konzultáció	Vaspótlás, abrázió, anti-fibrinolitikum	Transzfúzió, DDAVP vagy faktorpótlás	Hisztterektómia	

A 3WINTERS-IPS study a magyarországi betegeken kívül számos európai országból és Iránból való betegeket vizsgált. Az egyes országok mind saját etikai bizottságaik és

szabályrendszerük szerint a Helsinkii egyezmény szellemében gyűjtötték össze az adatokat és a mintákat, melyeket központilag elemzett a study.

A **VWF aktivitás összehasonlító** vizsgálathoz (COMPASS-VWF) az **53** normál kontroll magyar egészséges véradóktól származott, akik a véradás alkalmával adtak egy-egy cső vért, melyhez az OVSZ által előírt beleegyező nyilatkozatot írták alá. A **42** VWB beteg mind molekulárisan is karakterizált beteg volt. Részben magyarországi, részben olaszországi (Vicenza tartomány) betegek közül válogattuk őket. Ezt a független nemzetközi multicentrikus vizsgálatot az ISTH SSC VWF albizottsága nevében munkacsoportunk szervezte (Comparison of Assays to Measure VWF Activity, COMPASS-VWF elnevezéssel). Nyolc laboratórium vett részt a vizsgálatban (Németország: három laboratórium; Olaszország: két laboratórium; Magyarország, az Egyesült Királyság és az USA: egy-egy laboratórium). A részt vevő központok a mintákat vakon kapták, mindegyikhez laboratóriumi azonosítót rendeltünk (1-től 8-ig), és 95 kétszer centrifugált, trombocita-szegény plazmamintát küldtünk ki a laboroknak kódolva, fagyasztva, szárazjégen. A fentiek szerint 53 minta normál, egészséges egyénekből származott, míg 42 mintát VWD betegektől vettünk. Az utóbbi csoportba tizenegy 1-es típusú, huszonegy 2-es típusú és hat 3-as típusú beteg, valamint négy rekombináns VWF fehérje (3-es típusú VWD-s beteg plazmájában felvéve) tartozott. A 2-es típusú csoportban minden altípus képviseltette magát. Valamennyi beteg részletes molekuláris jellemzéssel rendelkezett. A 7. és a 8. laboratóriumba küldött fagyasztott minták sajnos felolvadtak a szállítás során, ezért azokat ki kellett zárni a vizsgálatok jelentős részéből; így az elemzések legtöbb részében csak hat központ adatai szerepelnek. A részt vevő laboratóriumok mérték a VWF:RCo aktivitást, valamint a következő, kereskedelmi forgalomban kapható új VWF aktivitási metodikák közül egyet vagy többet: VWF:GPIbR (IL HemosIL Von Willebrand Factor Ristocetin Cofactor Activity [Instrumentation Laboratory, Bedford, USA], 1., 2., 3. és 5. laborok; IL HemosIL AcuStar Von Willebrand Factor Ristocetin Cofactor Activity, 1., 2., 3. és 5. laborok); VWF: GPIbM (INNOVANCE VWF Ac [Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Németország], 1.-4. laboratóriumok); és VWF:Ab (IL, HemosIL von Willebrand-faktor aktivitás, 1., 2. és 5. laboratóriumok). Ezen kívül a 6. laboratórium in-house ELISA-méréseket végzett (VWF:GPIbM). A kalibrátorok és a műszerek az egyes vizsgálatokhoz a következők voltak: VWF:RCo, BC Von Willebrand Reagent (Siemens) (1.-5. laboratórium), Siemens BCS XP vagy Sysmex CS-5100 platformon (Sysmex, Kobe, Japán; 1.-4. laboratórium); VWF:GPIbM, INNOVANCE VWF Acassay (Siemens) (1.-4. laboratórium) Siemens BCS XP vagy Sysmex CS-2000i (Sysmex, Kobe, Japán) platformokon, Siemens Standard Human

Plasma felhasználásával mindkét vizsgálat kalibrálásához. Az 5. laboratórium az ACL 9000 Instrumentation Laboratory platformot használta a FVIII/VWF:RCo meghatározására<sup>129</sup>, összevont normál plazmát használva, amelyet előzőleg az Egészségügyi Világszervezet FVIII/VWF mérésekre rendszeresített ötödik standardjával kalibráltak. A VWF:GPIbR-t a HemosIL latex agglutinációs teszttel az ACL TOP 500 platformon (Instrumentation Laboratory; 1., 2., 3. és 5. laboratórium); a VWF: Ab-t a HemosIL VWF-aktivitási teszttel az ACL TOP 500 platformon (Instrumentation Laboratory) (1., 2. és 5. laboratórium) mértük, az IL kalibrációs plazmát használva a fent felsorolt összes IL-teszt kalibrálásához; és a VWF:GPIbR-t a HemosIL AcuStar teszttel (1., 2., 3. és 5. laboratórium) az ACL AcuStar platformon határoztuk meg az egyes kitekben található kalibrátorok felhasználásával. Az egyes laboratóriumi mérési eljárások összefoglalását a **3. táblázat** tartalmazza. A táblázat feltünteti azt is, hogy melyik laboratóriumban melyik mérések történtek.

### 3. TÁBLÁZAT. Az egyes laboratóriumok által végzett aktivitási tesztek összefoglalása

VWF aktivitás	A teszt elve	Kereskedelmi név	Detektálás	Tesztet végző laborok
<b>VWF:RCo</b>	Risztocetin kofaktor aktivitás: a teszt vérelemzékéket és ristocetint használ	Siemens: BC von Willebrand reagens különböző platformokon (lásd Módszerek)	Liofilizált trombocita aggregáció	1, 2, 3, 4, 5
<b>VWF:GPIbR</b>	A tesztek elve a VWF és egy rekombináns vad típusú GPIb fragmentum ristocetin által indukált kötődésén alapszik	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IL: HemosIL VWF Ristocetin kofaktor aktivitás:</li> <li>• IL: HemosIL AcuStar VWF Ristocetin kofaktor aktivitás:</li> <li>• „In-house” ELISA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Latex gyöngy agglutináció</li> <li>• Mágneses gyöngyökhöz kötött VWF kimutatása kemilumineszcenciával</li> <li>• Szendvics ELISA</li> </ul>	1, 2, 3, 5 1, 2, 3, 5 5 <sup>a</sup> , 8 <sup>b</sup>
<b>VWF:GPIbM</b>	A tesztek a VWF és egy funkcióyerő-mutáns GPIb fragmentum spontán kötődésén alapulnak	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Siemens: INNOVANCE VWF Ac</li> <li>• „In-house” ELISA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Latex gyöngy agglutináció</li> <li>• Szendvics ELISA</li> </ul>	1, 2, 3, 4 5 <sup>a</sup> , 6, 8 <sup>b</sup>
<b>VWF:Ab</b>	Minden olyan teszt, amely egy monoklonális antitestnek (mAb) a VWF A1 domén epitópjához való kötődésén alapul	IL: HemosIL VWF aktivitás	Latex gyöngy agglutináció	1, 2, 5

<sup>a</sup>Az 5. labor végezte az "in-house" ELISA-vizsgálatot az eredeti minták közt nem szereplő további 15 2B típusú betegen

<sup>b</sup>A szállítás során véletlenül felolvadt mintákon végezték

Ezen kívül az 1. és 4. laboratórium a VWF:RCo és a VWF:GPIbM vizsgálatokat kétszeresen végezte, egy további kalibrátort használva annak megállapítására, hogy az eredmények függenek-e a használt kalibrátortól. A második kalibrátor az SSC Plasma Standard Lot #4 volt, amelyet Anthony Hubbard (NIBSC, Egyesült Királyság) bocsátott rendelkezésünkre.



***Adatkezelés és statisztikai elemzés a VWF aktivitások összehasonlításánál***

Az eredményeket munkacsoportunk gyűjtötte össze, a minták kódolását feloldottuk, és az eredményeket bevittük az adatbázisba.

1. Az „outlier” értékeket minden elemzésnél eltávolítottuk a következőképpen: minden egyes plazmaminta esetében az összes laboratórium összes aktivitásvizsgálatából származó méréseket összevontuk, és az „outlier” értékeket Grubbs-teszttel azonosítottuk ( $p < 0,01$ -et véve határnak) minden egyes plazmaminta esetében. Ily módon összesen 14 mérést (az adatpontok 0,7%-a) távolítottunk el. A kiugró értékeket hibák (pipettázási hibák, átírási hibák stb.) következményének tekintettük. A várakozásnak megfelelően a legtöbb kiugró mérés a VWF:RCo tesztből származott; egyébként az eltávolított kiugró értékek eloszlásában nem volt azonosítható mintázat (azaz a hibák nem halmozódtak semmilyen vizsgálatban vagy VWD típusban).
2. Minden regressziós elemzésnél a mérési intervallum alsó határa (LLMI) alatti mérési értékeket önkényesen a határérték felével (LLMI/2) helyettesítettük.
3. A szenzitivitási elemzés során az egyes laboratóriumokban alkalmazott legalacsonyabb határértékeket feljegyeztük, és összehasonlítottuk a forgalmazó cég által a hivatalos címkén feltüntetett LLMI-vel.
4. A variációs együttható (CV) elemzésénél eltávolítottuk azokat a mintákat, amelyeknél egynél több labor mért  $< LLMI$  értéket, de megtartottuk azokat, amelyeknél egy adott tesztben csak egy laboratórium mért  $< LLMI$  értéket; a  $< LLMI$  értéket LLMI/2 értékkel helyettesítettük. Minden egyes VWF-aktivitási csoport és antigénmérés esetében az eredményeket minden egyes plazmamintára vonatkozóan átlagoltuk a laboratóriumok között.
5. A vizsgálatok közötti ***szisztematikus különbségek szűrését*** a következő stratégiával végeztük el: minden egyes betegmintára vonatkozó vizsgálati eredmény esetében a vizsgálatok közötti súlyozott százalékos távolságot a következő képlet segítségével számoltuk:  $[100 \times (assay\ \hat{a}tlag - \hat{t}obb\ \hat{a}tlag) / \hat{t}obb\ \hat{a}tlag]$ , ahol az *assay átlag* a különböző laboratóriumokban a kérdéses VWF aktivitás mérésével végzett eredmények átlaga, a *többi átlag* pedig az illető minta azon VWF aktivitásainak átlaga, amelyet a kérdéses teszten kívüli más metodikákkal végeztek (a 8. laboratóriumból származó felolvasztott mintákat nem vontuk be ebbe az elemzésbe, lásd **38. ábra**, az Eredményeknél, 136. old.). Ily módon a súlyozott százalékos távolság képletét úgy alakítottuk ki, hogy megmutassa a súlyozott (százalékos) különbséget bármely adott minta egy adott teszttel mért VWF aktivitásának

átlaga és ugyanannak a mintának az összes többi teszttel mért VWF aktivitásának átlaga között. Amint a képletből látható, a százalékos távolság 0% a többi vizsgálat átlagával megegyező értékek esetén és -100% a 0 NE/dl értékek esetén, függetlenül a többi vizsgálat tényleges értékétől. A felolvasztott mintákat azért nem vontuk be ebbe az elemzésbe, hogy elkerüljük a különbségekkel kapcsolatos bizonytalanságot. A határértékeket önkényesen 120%-ra helyeztük a többi vizsgálat átlagánál magasabb értékek esetében és -70%-ra az alacsonyabb értékek esetében. Ezek a határértékek 11 VWF aktivitást azonosítottak, amelyek közül három álpozitívnak bizonyult (vagy nem szisztematikusan eltérőnek, vagy klinikailag értelmetlenül eltérőnek). A határértékek nullához való közelítése csak a fals pozitív minták számát növelte anélkül, hogy több valódi pozitív mintát azonosítottunk volna (nem közölt adatok).

Regressziós elemzést végeztünk a véletlenül felolvasztott minták VWF antigén és aktivitási eredményeinek összehasonlítására az összes többi mintával. Ezt az összehasonlítást csak egészséges donor mintákon végeztük el, hogy csökkentsük az összehasonlítás változóinak számát. A felolvasztás nem okozott szisztematikus eltérést (nem közölt adatok).

Az elemzést az „mcr”<sup>130</sup> R csomagban végeztük, és a Passing & Bablok regressziós és Bland-Altman módszereket használtuk a tesztek összehasonlítására. Az adatokat grafikusán ábráztuk a metszéspont (I) és a meredekség (S) becsléseivel, valamint a hozzájuk tartozó 95%-os konfidencia intervallumokkal (CI) és korrelációs együtthatóval (r). A laboratóriumok közötti százalékos CV-t minden egyes mintára és minden egyes vizsgálatra (három-öt mérési pontra számítottuk ki, amint az a **25. táblázat**ban látható – lásd az Eredményeknél, 133. old.). A mintánk mérete (n=95) 90%-os statisztikai erővel rendelkezik az egyezés bizonyítására 0,05-ös szignifikancia szinten, különbség nélkül ( $l/r = 0$ ), ami 2,6-os standardizált egyezés határt (d/r) tesz lehetővé, vagy 80%-os statisztikai erővel bizonyítja az egyezést 0,1-es standardizált különbséggel ( $l/r = 0,1$ ), ahol r a mérések szórása (SD), l a módszerek közötti átlagos különbség és d az egyezés határa.<sup>131</sup>

A **szerezett hemofiliás** betegek vizsgálata két intézetből a study periódusban valamennyi (összesen **32**) AHA diagnózissal felvett beteg kórlapadatainak retrospektív analízise alapján készült. A betegek mind azonos protokoll alapján kapták a CyDRi kezelést. Az intézeti etikai bizottságok jóváhagyták a retrospektív vizsgálatot. Az AHA meghatározása a következő volt: alacsony FVIII (<50 IU/dl) és kimutatható FVIII ellenes inhibitor (>0,1 Bethesda egység [BU])

olyan betegnél, akinél bármilyen vérzéses tünet is fennállt. A retrospektív vizsgálathoz az etikai bizottság jóváhagyásának megszerzését követően a két részt vevő intézmény (Dél-pesti Centrumkórház 2009 októbere és 2021 szeptembere között 23 beteg, Semmelweis Egyetem 2018 márciusa és 2021 szeptembere között 9 beteg) adatbázisából nyert adatokat elemeztük. Az első betegnél 2009 októberében, az utolsó betegnél pedig 2020 júliusában diagnosztizáltuk a betegséget. 2021 szeptemberéig folyt a követés. Megjegyzendő, hogy ezen betegek egyike sem szerepelt az európai regiszterben (EACH2); így eddig nem voltak publikálva. A betegek kórtörténetében az esetleges autoimmun vagy malignus kórképeket potenciálisan összefüggőnek tekintettük, és alapbetegségnek neveztük, míg minden más betegséget független társbetegségként regisztráltunk.

**Vizsgálati végpontok a szerzett hemofiliában.** Az elemzett végpontok a következők voltak: (1) teljes remisszió (CR), amelyet több kritérium (vérzés megszűnése, nem kimutatható FVIII-inhibitor a Bethesda-tesztben, FVIII-aktivitás visszaállítása  $>50$  NE/dl-re és IST beszüntetése) együttes teljesülése alapján határoztunk meg; (2) teljes túlélés; (3) relapszus; (4) remisszió időtartama; és (5) vérzés megszűnése (vérzéskontroll). A vérzéskontrollt a következőképpen határoztuk meg: az az időpont, amikor a bypass szerek elhagyása után nem jelentkezett új klinikai vérzés, és a beteg hemoglobinszintje sem csökkent. Ha a beteg még mindig kapott bypass szereket, a vérzéskontroll első napjaként a bypass szer abbahagyását tekintettük. Két további vizsgálati végpontot is elemeztünk, a relapszus rátát, és a halálozási arányt. A relapszus definíciója a CR-ben lévő betegben a FVIII-gátló antitestek újbóli megjelenése volt. A betegeket az utolsó nyomonkövetés időpontjában cenzoráltuk.

**Adatgyűjtés és statisztikai elemzés szerzett hemofiliában.** A klinikai és laboratóriumi adatokat retrospektív módon, standardizáltan gyűjtöttük össze egy erre a célra kifejlesztett esetjelentő űrlap (CRF) segítségével. A statisztikai elemzést és a Kaplan–Meier-görbéket az R szoftver segítségével végeztük, illetve rajzoltuk meg. A log-rank teszt esetében a  $<0,05$  p értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A komorbiditási indexet Charlson és munkatársai munkája<sup>21</sup> alapján számoltuk.

A **trombofilia vizsgálat** egy egyetlen központban végzett retrospektív vizsgálat volt, amelyet az Emory Egyetemi Kórházakban végeztünk a következő célokkal: (1) a trombofilia vizsgálatok rendelésének mindennapi gyakorlatát terveztük rögzíteni VTE-ben szenvedő betegeknél, (2) a trombofilia vizsgálat eredményeinek a klinikai döntéshozatalra gyakorolt hatását akartuk vizsgálni, és (3) a trombofilia vizsgálat közvetlen költségeit szeretnénk volna minél pontosabban megbecsülni VTE-ben szenvedő betegeknél. A vizsgálatot az Emory Egyetem Etikai Bizottsága (IRB) hagyta jóvá. Az Emory Egyetemi Kórházak Hematológiai

Munkacsoportja egy, az Etikai Bizottság által jóváhagyott adatbázist vezet a Hematológiai Munkacsoport (Hematology Service) által a fekvő- és járóbeteg-ellátásban látott valamennyi betegről. Ebből az adatbázisból azonosítottuk azokat a felnőtt betegeket, akiket a Munkacsoport 2015. január és december között akár fekvő- akár járóbeteg-ellátás keretében látott VTE kivizsgálása és kezelése céljából. Kizárási kritériumnak számított: (1) az Emory Hematológia nem dokumentált hivatalos értékelést (pl. a beteg nem jelent meg egyik viziten sem), (2) a VTE eseményre vonatkozó elégtelen információ a betegdokumentációban, (3) nem volt valós a VTE diagnózis, vagy (4) csak felületes vénás tromboziszban szenvedett a beteg.

**Adatkezelés.** A kritériumoknak megfelelő 266 beteg esetében áttekintettük az elektronikus orvosi dokumentációt (EMR) a szociodemográfiai adatok, a kórtörténet, a tromboembóliás események részletei, a trombofília vizsgálat és a beteg kezelése tekintetében (4. táblázat).

A betegadatokat kézzel gyűjtöttük ki előre megtervezett esetjelentő (case report form, CRF) űrlapokra, majd az elemzés előtt deidentifikáltuk és anonimizáltuk őket. Az első hematológiai konzultáció időpontjában történt legutóbbi VTE eseményt tekintettük az index epizódnak. A következő VTE epizódokat minősítettük „provokálnak” az International Society of Thrombosis and Haemostasis definíciója szerint: (1) bármely általános anesztéziával végzett műtét, császármetszés, hosszabb kórházi tartózkodás, ösztrogénterápia vagy hosszan tartó immobilitás után 3 hónapon belül bekövetkező VTE, valamint (2) a tartós vénás katéterrel vagy rákos megbetegedéssel összefüggő VTE<sup>132</sup>.

#### 4. TÁBLÁZAT. A CRF-ben összegyűjtött adatok felsorolása.

Demográfiai adatok	Életkor, nem, rassz, Testsúly, testmagasság, BMI
Klinikai adatok	A VTE lokalizációja Kiváltó tényezők Az anamnézisben: vetélés vagy korábbi VTE A családi anamnézisben: VTE, vagy fiatalkori (<50 év) MI vagy stroke egyenesági rokonok közt; Ismert trombofília a családban Komorbid állapotok
Trombofília tesztek	A következő tesztek eredménye és a tesztelés száma: - APLA - AT, PC, PS - FVL, FIIM - JAK2 mutáció, PNH flow citometria - egyéb Ismétlések, eredményeik; Az inkomplett tesztelés oka
Kezelési adatok	VTE diagnosztikai tesztek Kezelési terv, illetve változtatás
Intézeti adatok	A laborok árai

BMI: testtömegindex, MI: miocardialis infarktusz, VTE vénás tromboembólia. APLA: antifoszfolipid antitest panel: lupus antikoaguláns, antikardiolipin és anti-béta-2-glikoprotein-1 IgG, valamint IgM. AT: antitrombin. PC, PS: protein C és S, FVL: Leiden mutáció, FIIM: protrombin gén mutáció.

**Trombofília tesztek.** A kezelőorvosok által a trombofília vizsgálat részeként elrendelt összes vizsgálatot bevontuk a trombofília vizsgálat gyakorlati mintázatának leírásához. A trombofília

kivizsgálását akkor tekintettük teljes körűnek, ha az tartalmazta azon gyakori örökletes vagy szerzett trombofiliák tesztjeit, amelyekről ismert, hogy jól meghatározott szerepet játszanak a VTE patogenezisében. Ezek közé tartoznak: (1) Leiden mutáció (FVL) és (2) protrombin (PT) G20210A génmutáció (FIIIM) genetikai meghatározása, (3) AT aktivitás, (4) protein C (PC) aktivitás, (5) protein S (PS) aktivitás és (6) az antifosfolipid antitest (APLA) panel. Az APLA panel (a) lupus antikoagulánst, az (b) antikardiolipin antitestet (IgG & IgM), valamint (c) anti- $\beta 2$  glikoprotein I (IgG & IgM) antitestet tartalmazta. „Hiányos kivizsgálás”-nak tekintettük, ha (1) a fent felsorolt tényezők bármelyikének rendelését elmulasztották. (2) „Rossz időzítés”-sel történt a mérés: AT, PC, PS aktivitási szintek vizsgálata olyan körülmények között, amelyek az eredmények értelmezését aláássák: a vizsgálat az akut trombózis után egy héten belül történt, vagy zavaró antikoaguláció alatt. Warfarinnal a PC és PS aktivitási szintek, heparinnal az AT aktivitási szint; valamint DOAC-okkal mind a PC, PS és AT aktivitás interferál.<sup>110,133,134</sup> (3) A pozitív APLA panel megismétlésének elmulasztása 12 hét után.<sup>133,134</sup> A funkcionális PC, PS és AT vizsgálatokat kórosnak neveztük, ha azok a normál tartomány alatt voltak. Tekintettel arra, hogy a természetes antikoaguláns hiányának megállapítása megerősítő ismételt vizsgálatot, valamint a beteg és a család anamnézisével való összevetést is igényli, a végleges AT, PC, PS hiány diagnózisát a konzultáló hematológus véleményére bíztuk.

A megismételt funkcionális/antigén vizsgálatok a következő kategóriákba sorolhatók: (1) megfelelő/megalapozott ismétlés, ha a vizsgálatokat a kezdeti kóros eredmények megerősítése vagy a „rossz időzítés” és az értelmezhetetlen kezdeti vizsgálati eredmények miatt ismételték meg; (2) nem megfelelő/megalapozatlan ismétlés, ha a kezdeti tesztek normál tartományban voltak, vagy ha a teszteket a fentiek szerint „rossz időzítéssel” ismételték meg. Bármely genetikai vizsgálat megismétlése indokolatlannak minősült. A tesztek megismétlésének megfelelőségére vonatkozó kritériumok irodalmi ajánlásokon alapultak.<sup>133,135,136</sup> Tekintettel az APLA titerek monitorozásának szerepével kapcsolatos bizonytalanságra a megállapított APS-ben szenvedő betegeknél, az APLA panelt nem vontuk be az ismételt tesztek megfelelőségének elemzésébe. A trombofilia vizsgálati eredményeknek a beteg kezelésre gyakorolt hatását a következőképpen mértük: (1) az antikoaguláns szer kiválasztására gyakorolt hatás, és (2) az antikoaguláció időtartamának megállapítására gyakorolt hatás. A trombofilia vizsgálatot követő orvosi dokumentációból szereztünk információt a beteg kezelésének módosításáról. A trombofilia értékelésének részeként elrendelt összes vizsgálatot bevontuk a vizsgálat közvetlen költségeinek kiszámításába. Az egyes trombofilia vizsgálatokhoz kapcsolódó laboratóriumi díjakat az Emory Egyetem patológiai laboratóriumától kaptuk, és azok a 2015. évi díjszabáson

alapultak (**5. táblázat**). Minden egyes trombofilia vizsgálat esetében a vizsgált betegekhez olyan költségértéket rendeltünk, amely a trombofilia vizsgálat laboratóriumi díjainak és a vizsgálat megrendelési gyakoriságának szorzatát tükrözte. Azon betegek esetében, akiket az Emory Egyetemen kívül vizsgáltak, és akik esetében nem tudtuk ellenőrizni a vizsgálat megrendelésének gyakoriságát, azt feltételeztük, hogy egyszer végezték őket. Kivételt képeztek azok a betegek, akiknél APS diagnózist állapítottak meg. Az ilyen betegek esetében, ha adattal

**5. TÁBLÁZAT. A laborvizsgálatok árai az Emory Egyetemen.**

Teszt	n (tesztelt betegszám)	Átlagos <sup>a</sup> ár (USD)	Minimum <sup>a</sup> ár (USD)	Maximum <sup>a</sup> ár (USD)
APLA panel	160	2,846.03	553.00	15,398.00
FVL	159	119.44	75.00	648.00
FIIM	153	86.59	44.00	522.00
AT	151	134.98	54.13	408.00
PC	127	160.78	65.35	480.00
PS	133	182.41	37.00	1,062.00
JAK2	25	174.41	80.00	324.00
PNH	22	1,168.45	138.00	2,005.00
Fibrinogén	77	89.79	30.00	104.00
HC	72	139.41	60.00	167.00
FVIII	55	207.45	63.00	204.00
FIX	48	214.28	67.00	216.00
FXI	47	202.35	63.00	204.00
LPa	33	32.76	33.00	46.00
MTHFR	2	119.00	119.00	119.00

<sup>a</sup>Átlagos ár = A trombofilia vizsgálat összköltsége/az adott trombofiliára vizsgált betegek teljes száma.

<sup>a</sup>Maximum ár = Azt az árat tükrözi, amely betegnek a legmagasabb volt a költsége az illető vizsgálatban. A magas költségérték tükrözheti a drágább teszt kit használatát (pl. az ambulancián vizsgált FVL [216,00 \$] vs. kórházi [75,00 \$]), és/vagy a többszörösen ismételt vizsgálatot, amely megsokszorozta az adott trombofilia teljes költségét. APLA: antifoszfolipid antitest; FVL: Leiden mutáció; FIIM: protrombin gén mutáció; AT: antitrombin; PC, PS: protein C és S; JAK2: Janus kináz 2 mutáció; HC: homocisztein; FVIII, FIX, FXI: 8-as, 9-es és 11-es alvadási faktor; LPa: lipoprotein a; MTHFR: metilén-tetrahidrofolát redukáz polimorfizmusai.

nem rendelkezünk, az APLA panel megrendelésének gyakoriságát kétfőnek tekintettük.

**Statisztikai elemzés.** A változók eloszlásának összehasonlítására a vizsgált és a nem vizsgált betegcsoportok között a kategorikus változók esetében a khi-négyzet tesztet, a folytonos változók esetében pedig a Kruskal–Wallis-tesztet alkalmaztuk. A trombofilia kivizsgálásának költségeit leíró statisztikák segítségével összegeztük. Minden elemzést a SAS 9.4 verziójával (SAS Institute, Inc., Cary, Észak-Karolina, Egyesült Államok) és az SPSS 25.0 verziójával (IBM SPSS statistics) végeztünk. A 0,05 p értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az Emory Egyetem adatbázisából **266** beteget azonosítottunk a fenti kritériumok szerint.

Az **SLE trombofilia** vizsgálatához 12 hónapos időszak alatt összesen **105**, egymást követő SLE-s beteget vontunk be a vizsgálatba, miután beleegyező nyilatkozatot adtak. Az átlagéletkor 41,0±11,7 (18–68) év, a betegség átlagos időtartama 14,6±9,1 év volt. Valamennyi beteget a budapesti Semmelweis Orvostudományi Egyetem Immunológiai Ambulanciáján gondoztuk, és megfeleltek az American College of Rheumatology (ACR) SLE-re vonatkozó módosított

kritériumainak.<sup>137</sup> A TE eseményeket is tartalmazó klinikai adatokat retrospektív módon a kezelőorvos által vezetett nyilvántartásból szereztük be. Információt kértünk a korábbi TE időpontjáról és lokalizációjáról, a családban előfordult TE eseményekről, a gyógyszeres kezeléssel (pl. az antikoaguláns terápia, az orális fogamzásgátlók korábbi és jelenlegi használatáról) stb. A betegség aktivitásának jellemzésére a mintavétel időpontjára vonatkozóan kiszámítottuk az SLE betegség aktivitás (SLEDAI) indexet.<sup>138</sup> Valamennyi betegől szérumszám-, plazma- és DNS-mintát vettünk, melyeket a következő tesztekkel elemeztünk: Az APLA jelenlétét kétféle teszttel vizsgáltuk. Először a lupus antikoaguláns (LA) kimutatása történt alvadási módszerekkel egy háromlépcsős szűrő- és megerősítő rendszerben. A három független teszttel végzett szűrést (dPT 1:200, Innovin, Dade Behring, Németország; PTT-LA, Diagnostica Stago, Franciaország; dRVVT Screen, Gradipore, USA) foszfolipid neutrilizáció követte (StacLOT LA, Diagnostica Stago és dRVVT Confirm, Gradipore). Másodszor az APLA-t enzimhez kötött immunoszorbens tesztekkel (ELISA) mértük, beleértve az antikardiolipin (aCL, IgG és IgM) szűrő és megerősítő ELISA-t, valamint az anti- $\beta$ 2-glikoprotein I ( $\alpha$ - $\beta$ 2-GPI, IgG, IgA, IgM), anti-protrombin ( $\alpha$ -FII, IgG, IgA, IgM), anti-foszfatidil-szerin ( $\alpha$ -Ph-Ser) IgG, IgA, IgM) ELISA-t is (Orgentec, Németország). A normál tartományokat a gyártó ajánlását követve definiáltuk. A Protein C (PC) (Chromogenix, Olaszország), a protein S (PS) (Dade Behring, USA) és az antitrombin (AT) (Sigma, USA) aktivitását kvantitatív módon határoztuk meg Sysmex CA-1500 koagulométerrel. A normális tartományok a PC esetében 70–149%, a PS esetében 59–118% (nők) és 75–130% (férfiak), az AT esetében pedig 50–150% voltak. Az aktivált protein C rezisztenciát (APCR) egy kereskedelmi forgalomban kapható véralvadási teszttel (Chromogenix, Olaszország) vizsgáltuk. Ez a vizsgálat FV-hiányos plazmát használ a minta hígításához. A Leiden mutáció és a faktor II (protrombin) G20210A mutációk kimutatására polimeráz láncreakció (PCR) görbéjének (Roche, Svájc) olvadási pont elemzését végeztük. A FVIII-t mikrolemezes végpontos kromogén módszerrel (Chromogenix, Olaszország) mértük. A von Willebrand-faktor antigén (vWF:Ag) és a kollagénkötő aktivitás (CBA) szintjét házon belüli ELISA-val mértük. Az FVIII, a vWF:Ag és a CBA normál tartománya 50–150% volt. A plazma HC-t fluoreszcens polarizációs immunoassay-vel (FPIA; Abbott, Norvégia) határoztuk meg. A plazma HC-szintjét 15 mM felett emelkedettnek tekintettük. A vizsgálati idő alatt valamennyi (**105**) megjelent SLE diagnózissal gondozott betegől beleegyező nyilatkozat után vettünk vérmintát.

Az **aszparagináz okozta trombózis** kezelése egyetlen eset bemutatása, és az újszerű kezelés felvázolása. Végül a TTP rituximab study három eset bemutatása. Az adat- és mintagyűjtés az

Emory Egyetem intézeti IRB engedélye alapján készült beleegyező nyilatkozat aláírása után történt. Valamennyi beteg esetében a Helsinki Nyilatkozat szellemében jártunk el.

### ***Klinikai laboratóriumi módszerek valamennyi vizsgálatban***

**Ivy vérzési idő:** Standard módszerrel mértük a vérzési időt. Vénás pangást hoztunk létre az alkarban a vérnyomásmérő mandzsettájának 40 Hgmm-re való felfújásával. 1 mm-es metszést ejtettünk az alkar voláris felszínén. A vért 30 másodpercenként finoman felitattuk. A stoppert akkor állítottuk le, amikor először nem lehetett friss vért látni a szűrőpapíron.

**FVIII** és egyéb alvadási faktor assay-k: Az alvadási faktor méréseket egylépcsős automatizált faktor aktivitás méréssel végeztük ACL-10000; Instrumentation Laboratories, Bedford, MA, USA platformokon, a cég reagenseit használva és a gyártó utasításait követve, megfelelő hiányplazmák felhasználásával. A **Bethesda** anti-FVIII titer meghatározásokat a Nijmegeni módosítás alkalmazásával végeztük<sup>139</sup>. Az AHA laboratóriumi diagnózist a >0,1 BU és az alacsony FVIII szint (<50 IU/dl), valamint a normális FIX, FXI és FXII, továbbá a normális VWF antigén és riztocetin kofaktor aktivitás (VWF:Ag és VWF:RCo) szintek kombinációja alapján állítottuk fel. A **VWF antigén** szintjét ELISA módszerrel vagy automatizált immunoturbidimetriával mértük nyúl poliklonális anti-humán VWF antitest és szintén nyúl poliklonális torma-peroxidázzal jelzett anti-humán VWF antitest felhasználásával (Dako, Glostrup, Dánia). Az összehasonlító vizsgálat laboratóriumi a riztocetin kofaktor aktivitást (**VWF:RCo**, liofilizált trombociták riztocetin-aggregációjának meredekségéből számolva) standard módszerrel mérték. A liofilizált vérlemezkéket, a riztocetint, valamint kalibrációs standardokat mind a Helenától (Gateshead, UK) vásárolták. A kollagénkötő aktivitást (**VWF:CB**) házi ELISA rendszerben mértük. Dióhéjban: Az ELISA mikrotálcákat 48 órán keresztül, 4°C-on fedtük PBS-ben oldott humán placenta eredetű kollagénnel 5 µg/ml koncentrációban (Sigma, St. Louis, MO, USA). 1% marhaszérum albuminnal (BSA) történő blokkolási és megfelelő mosási lépések után a plazmamintákat két-két paralelben 1:100 és 1:200 hígításban teszteltük citráttal antikoagulált megfelelő standard görbéhez viszonyítva. A mintákat 2 órát inkubáltuk szobahőmérsékleten. Mosást követően a megkötött VWF kimutatása torna-peroxidázzal jelölt nyúl anti-humán VWF antitestek (Dako) segítségével történt. A DDAVP válaszhoz a mintákat 0, 30'; 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 és 24 óra időpontokban vettük le. A VWF **multimer analízishez** az elektroforézist 1,6% nátrium dodecyl szulfát (SDS) agaróz gélen végeztük. Ezt követően Western blot módszerrel nitrocellulóz membránra vittük át a fehérjéket, amelyeket nyúl poliklonális torna-peroxidázzal jelzett anti-VWF antitestek és egy kemilumineszcenciát érzékelő rendszer segítségével jelenítettünk meg (Amersham Pharmacia



Biotech). Az **ADAMTS13** aktivitás és inhibitor titer meghatározás fluoreszcens energiatranszfer módszerével történt, ahol szubsztrátként a VWF73 megnevezésű peptidet használtuk (kereskedelmi forgalomban lévő kit). A **trombofília panel** a piacon elérhető automatizált kitek segítségével történt. Az antitrombin (AT) protein C (PC) és protein S (PS) meghatározások az aktivitást meghatározó kromogén tesztek segítségével történt. Antigén-meghatározásra csak kóros aktivitás esetén került sor. Az antifoszfolipid panel részben ELISA alapú kardiolipin és béta-2-glikoprotein-I ellenes antitest meghatározásból részben három szűrő eljárást alkalmazó lupus antikoaguláns meghatározására irányuló koagulációs szűrő és neutralizációs eljárásból állt. A Leiden és protrombin gén mutációk meghatározása standard molekuláris módszerrel történt.

A **VWF aktivitási tesztek összehasonlító vizsgálatban** egyes laborok a következő VWF aktivitási méréseket is végezték: *(i)* **VWF:GPIbR** kétféleképpen (IL HemosIL\_Von Willebrand Factor Ristocetin Cofactor Activity [Instrumentation Laboratory, Bedford, USA]; és IL HemosIL® AcuStar Von Willebrand Factor Ristocetin Cofactor Activity). *(ii)* **VWF:CB** (kollagén kötés), melyet ELISA rendszerben mértük; ennek az aktivitási mutatónak sokkal alacsonyabb a küszöbértéke. Itt megjegyezzük, hogy a VWF detektálására használt négy módszer közül a multimer gél analízis a legérzékenyebb, mely 1% alatti VWF szintet is képes érzékelni. Az érzékelési küszöb 1% körüli a VWF:Ag teszt és a VWF:CB esetében, míg jóval magasabb (10%) a VWF:RCo vizsgálatnál. *(iii)* **VWF:GPIbM** (INNOVANCE® VWF Ac [Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Németország]); és *(iv)* **VWF:Ab** (IL, HemosIL® von Willebrand Factor Activity). Továbbá két labor házi ELISA assay-t is használt (VWF:GPIbR és VWF:GPIbM).

A VWF aktivitási módszerek összehasonlítása nemzetközi kollaborációban történt (a COMPASS-VWF study), specializált (expert) VWF aktivítással foglalkozó laboratóriumok bevonásával. Nyolc laboratórium vett részt a vizsgálatban (Németország: 3; Olaszország: 2; valamint Magyarország [saját laboratóriumunk], az Egyesült Királyság és az Egyesült Államok: 1-1 laboratórium). A részt vevő központok mindegyike kapott egy laboratóriumi azonosítót (1-től 8-ig), és 95 személytől származó 95 fagyasztott, random azonosítóval ellátott, kétszeresen centrifugált, trombocita-szegény plazmamintát (szárzjégen postázva). A részt vevő laboratóriumok a számukra rutinszerűen rendelkezésre álló (a **6. táblázatban** összefoglalt) VWF aktivitási méréseket végezték. A fentiek szerint vakon végzett méréseket 53 normál kontroll, valamint 42 VWB-ben szenvedő betegtől származó mintán végeztük el. Ez utóbbi csoportba 11 1-es, 21 2-es és hat 3-as típusú beteg tartozott, továbbá négy rekombináns VWF fehérje (amelyet 3-as típusú VWB plazmában vettünk fel: vad típusú [WT]; P1467S; D1472H; és egy „heterozigóta” D1472H; vagyis a WT és a mutáns VWF 1:1 arányú keveréke). Az ELISA és gyöngy alapú tesztek különbségeinél tett megfigyeléseket ellenőrizendő további 15, eredetileg nem bevont VWB 2B típusú betegnél vizsgáltuk meg egyetlen kísérletben az 5. laboratóriumban a VWF aktivitást három kereskedelmi teszt és két házi ELISA végzésével (VWF:GPIbR és VWF:GPIbM).

**6. TÁBLÁZAT. A különböző laborokban mért VWF aktivitások összefoglalása.**

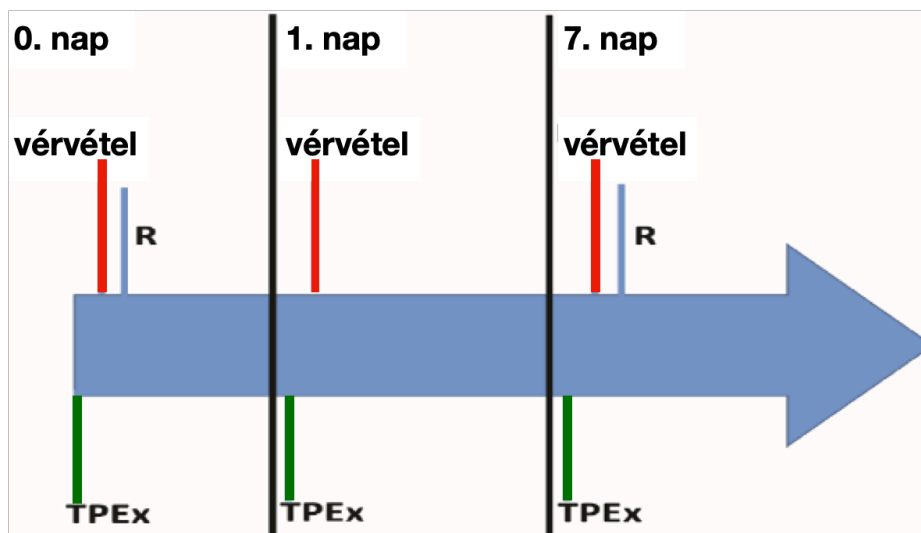
VWF aktivitás	Mérési elv	Teszt leírás	Detektálási módszer	Mérő laborok
VWF:RCo	Ristocetin kofaktor aktivitás. Trombocitákon ristocetinnel mérve.	Siemens: von Willebrand reagenssel különböző platformokon	Liofilizált trombociták agglutinációja	1, 2, 3, 4, 5
VWF:GPIbR	Ristocetin indukálta VWF kapcsolódás WT rekombináns GPIb fragmenshez	IL: HemosIL VWF ristocetin kofaktor aktivitás	Latex gyöngy agglutináció	1, 2, 3, 5
		IL: AcuStar VWF ristocetin kofaktor aktivitás	Mágneses gyöngyökhöz kötött VWF kemilumineszcens detektálása	1, 2, 3, 5
		Házi ELISA	Szendvics ELISA	5 <sup>a</sup> , 8 <sup>b</sup>
VWF:GPIbM	Spontán VWF kapcsolódás funkciónyerő mutáns rekombináns GPIb fragmenshez	Siemens: INNOVANCE VWF Ac	Latex gyöngy agglutináció	1, 2, 3, 4
		Házi ELISA	Szendvics ELISA	5 <sup>a</sup> , 6, 8 <sup>b</sup>
VWF:Ab	Monoklonális antitest kötődés a VWF A1 domén megfelelő epitópiához	IL: HemosIL VWF activity	Latex gyöngy agglutináció	1, 2, 5

<sup>a</sup>Az 5-ös labor 15 különálló betegen mért házi ELISA mérést (lásd szöveg és **4. táblázat**), a kezdeti 95 mintán nem.

<sup>b</sup>A szállítás során véletlenül felolvadt mintákon történtek a mérések.

**Flow citometriás eljárások (iTTP-s betegek vizsgálata)**

Ebbe a vizsgálatba három beteget vontunk be prospektív módon. A teljes vért EDTA-csövekbe vettük az Emory Egyetem Etikai Bizottsága által jóváhagyott protokollok szerint, a Helsinkii Nyilatkozatnak megfelelően. A vérmintákat a klinikai diagnózis felállításakor, a plazmacsere (TPE<sub>x</sub>) után és közvetlenül a rituximab előtt (0. nap); 24 órával a rituximab 1. dózisát követően és közvetlenül a TPE<sub>x</sub> után (1. nap); valamint közvetlenül a rituximab 2. dózisa előtt (7. nap) vettük (3. ábra). A vérlemezkeszámot és az egyéb hematológiai paramétereket minden beteg esetében szisztematikusan követtük. A perifériás vér mononukleáris sejtjeit 3-5 ml EDTA-val antikoagulált vérből vörösvérsejt-lízissel dúsítottuk. A B-sejt, T-sejt és NK-sejt kompartmenteket négyszeres jelöléssel festett ellenanyag-kombinációkkal elemeztük korábban közölt protokoll szerint.<sup>140</sup> Az ellenanyagokat a gyártó utasításai szerint használtuk, és a Becton Dickinson



**3. ÁBRA.** Az iTTP-s betegek vérvételeinek, plazmacseréjének (TPE<sub>x</sub>) és rituximab (R) adásának időzítése.

(BD, San Jose, CA) cégtől vásároltuk, hacsak másként nincs feltüntetve. Az antitest-kombinációk a következők voltak: CD3-fluorescein-izotiocianát (FITC) / CD4-phycoerythrin (PE) / CD8-allophycocyanin (APC) / CD45-peridinin-klorofill-fehérje (PerCP), CD3-FITC/CD20-PE/CD19-APC/CD45-PerCP és CD16-FITC (Beckman Coulter, Indianapolis, IN)/CD56-PE/CD3-APC/CD45-PerCP. Az adatokat FACSCanto citométerrel gyűjtöttük, és a BD FACSDiva 8.0.1 verziójával (BD Biosciences, San Jose, CA) elemeztük. Az ADAMTS13 aktivitást és az inhibitor titereket egy referencia laboratóriumban (Versiti, Milwaukee, WI) határoztuk meg módosított fluoreszcencia rezonancia energia transzfer szubsztrát-VWF73 teszt és keveréses vizsgálatok segítségével, a korábban közöltek szerint.<sup>141,142</sup>

**Molekuláris módszerek**

A C1149R mutáció heterodimer képződés és lebontás vizsgálata során használt kísérletes eljárások:

**Plazmid szerkesztés:** Valamennyi plazmid szekvenciáját dideoxy Sanger szekvenálás segítségével erősítettük meg (Sequenase kit, USB, Cleveland, OH, USA). A pSVHVWF1, pSVHVWF1.1 és pSVHCys1149Arg plazmidok korábbi publikációkból is ismertek.<sup>143,144</sup> A pSVHCys1169Ser plazmidot polimeráz láncreakcióra (PCR-) épülő "site-directed mutagenesis" segítségével konstruáltuk<sup>143</sup>, oly módon, hogy a Cys1169 TGT kodonját TCT-re változtattuk, hogy a 1169-es pozícióba a szerin kódja kerüljön. A pSVHCys1149ArgCys1169Ser plazmidot ugyanezzel a módszerrel szerkesztettük, oly módon, hogy templátként a pSVHCys1149Arg plazmidot használtuk. A VWF A1 domén diszulfid hurkot a következőképpen távolítottuk el: a pGEM-4ZNK<sup>51</sup> plazmidot használtuk templátnak két PCR reakcióhoz. Az első reakcióban a T7 (TCT AAT ACG ACT CAG TAT AAG GAG AC) és a C1353a (CTG AGG CGC CGT AGA AAT CGT GCA ACG GCG GTT C, az aláhúzás a *NarI* hasítási helyet jelöli) primereket használtuk, és a terméket *HindIII* és *NarI* endonukleázzal emésztettük. A második reakcióhoz a C1458 (ATG CGG CGC CGA CCT TGC CCC TGA AGC CCC TCC T, *NarI* hasítási hely aláhúzva) és a 227a (CCG ATC CTT CCA GGA CGA ACG CCA) primereket használtuk és a terméket *NarI* és *NcoI* enzimekkel emésztettük. A tisztított fragmenseket a pGEM-4ZNK plazmid 2,7 kb nagyságú *HindIII-NcoI* szakaszával kötöttük össze. Az így létrejött pGEM-4ZNKdA1 termékben a GGCGCC hexanukleotid (*NarI* hasítási hely) került annak az 561 bázispárnak a helyére, mely a Cys1353-Cys1458 szakaszt kódolja az érett VWF alegységben. A pSVHVWF1.1 plazmid *NgoMI-KpnI* szakaszát a mutáns pGEM-4ZNKdA1 plazmid *NgoMI-KpnI* szakaszával helyettesítettük, és a létrejött terméket pSVHVWFdA1-nek neveztük. A VWF A3 diszulfid hurkot hasonlóképpen vágtuk ki. A pSVHVWF1 plazmid 1924 bázispár hosszúságú *KpnI-SacI* szakaszát a pGEM-4Z (Promega Madison, WI) plazmidba klónoztuk, és az új plazmidot pGEM-4ZKS-nak neveztük. Két PCR reakciót terveztünk oly módon, hogy a Cys1686-Cys1872 szakaszt a GCCGGC hexanukleotid (*NgoMI* hasítási hely) helyettesítse. Az így létrejött termék megfelelő fragmensét a pGEM-4ZKSG plazmidba klónoztuk, és a létrejött plazmidot pGEM-4ZKSdA3-nak neveztük. A pGEM-4ZKSdA3 plazmid *KpnI-SacI* fragmensét a pSVHVWF1,1 plazmid 7,9 kb *EcoRV-KpnI*, és 1.6kb *SacI-EcoRV* szakaszaival kötöttük össze, mely így a pSVHVWFdA3dA3 plazmid létrejöttéhez vezetett. Az A1 és A3 diszulfid hurkok kettős delécióját a következő három fragmens összekötésével értük el: a pGEM4ZKSdA3 *KpnI-SacI*

szakaszát, és a pSVHVWFdA1 7,4 kb *EcoRV-KpnI* valamint 1,6 kb *SacI-EcoRV* szakaszait kötöttük össze. A létrejövő termék: pSVHVWFdA13.

**A rekombináns VWF expressziója:** A 293T humán vesesejteket,<sup>145</sup> illetve COS-7 majom vesesejteket használtuk a pSVHVWF1, pSVHCys1149Arg, pSVHCys1149ArgCys1169Ser, pSVHVWFdA1, illetve pSVHVWFdA13 plazmidok rövid távú transzfekciójához, melyet hatlyukú tálcán a kalcium-foszfát módszer<sup>146</sup> alkalmazásával standard tenyésztési körülmények<sup>147</sup> között végeztünk. A sejteket PBS pufferrel mostuk 24 órával a transzfekció után, majd további 48 órát inkubáltuk őket 1 ml szérumentes médiumban (Opti-MEM I, Life Technologies, Gaithersburg, MD). A felülúszót és a sejt lizátumokat (0,5 ml) eltettük a későbbi kísérletekhez.<sup>148</sup> A lízis puffer 0,6% Triton X-100, 10 µg/ml aprotinin (Sigma, St.Louis, MO) és 100 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF, Sigma) adalékokat tartalmazott 0,1M Tris-HCl pufferben, pH 8,0. A vad típusú VWF és a p.C1149R-VWF mutáns hosszú távú expresszióját úgy értük el, hogy a Fur4BHK sejteket (ez a BHK sejt vonal rekombináns humán furint expresszáló) két plazmiddal ko-transzfectáltuk: az egyik a pSV2neo, a másik a pSVHVWF1 és pSVHCys1149Arg plazmidok valamelyike volt. A sejteket geneticin (500 µg/ml) tartalmú Opti-MEM I médiumban tenyésztettük, és szelektáltuk a normál VWF-et vagy mutáns C1149R-VWF-et expresszáló klónokat.

**A rekombináns R1205H-VWF expressziója során alkalmazott kísérletes eljárások:** A 293T humán vesesejteket<sup>145</sup>, illetve COS-7 majom vesesejteket használtunk a pSVHVWF1, illetve pSVHR1205H plazmidok rövid távú transzfekciójához, melyet hatlyukú tálcán a kalcium-foszfát módszer<sup>146</sup> alkalmazásával standard tenyésztési körülmények<sup>147</sup> között végeztük. A sejteket PBS pufferrel mostuk 24 órával a transzfekció után, majd további 48 órát inkubáltuk őket 1 ml szérumentes médiumban (Opti-MEM I, Life Technologies, Gaithersburg, MD). A kísérletek egy részét monensin (Sigma, St. Louis, MO, USA) jelenlétében végeztük, mely a Golgi működését bénító kationos ionofor. A felülúszót és a sejt lizátumokat (0,5ml) eltettük a későbbi kísérletekhez.<sup>148</sup> A lízis puffer 0,6% Triton X-100, 10 µg/ml aprotinin (Sigma) és 100 µg/ml PMSF (Sigma) adalékokat tartalmazott 0,1M Tris-HCl pufferben, pH 8,0.

**A VWF CK domén diszulfid szerkezetének feltérképezése során alkalmazott kísérletes eljárások:** Az N-ethylmaleimide (NEM), 4-vinylpyridine (4VP), és a dithiothreitol (DTT) beszerzése a Sigmától történt. A Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) a Pierce-től származott. A cianogén bromidot (CNBr) az Aldrichtől vettük. A lizil endopeptidáz (Achromobactor proteáz I) forrása a Wako Chemicals (Osaka, Japán) volt. A termolizint a

Roche Molecular Biochemicals szolgáltatta. A *Pfu* DNS polimerázt a Stratagene-től (La Jolla, CA, USA), a BigDye™ Terminator Cycle Sequencing kitet és GeneAmp® dNTP elegyet a Perkin Elmer Biosystemstől (Foster City, CA, USA) vásároltuk.

A humán VWF CK doménjét kódoló expressziós vektorok létrehozása. A pSVHvWF1.0 plazmidot<sup>149</sup> használtuk templátként az expressziós vektor sorozatos PCR reakciókkal<sup>150</sup> történő létrehozásához. Az 5' szakaszt a CT90*Kpn*IS (5'-ggc ggt acc att gtc cag-3') és CT906HAS (5'-atg atg gtg atg atg agt ttc ttct gca caa agg gtc cct g-3') primerek segítségével hoztuk létre. A 3' szakasz készítéséhez a CT906HS (5'-cat cat cac cac cat cat gac tac aag gac gac gat gac aag gag gag cct gag tgc aa-3') és VWF*Xba*IAS (5'-aag ggc tct aga gca gaa cat-3') primereket használtuk. E szakaszokat összekeverés után a CT90*Kpn*IS és VWF*Xba*IAS primerek segítségével amplifikáltuk. A teljes hosszúságú terméket *Kpn*I és *Xho*I enzimekkel emésztettük, és szubklónoztuk a pGEM-7Zf(+) plazmidba (Promega, Madison, WI, USA). Az így létrejött plazmid a pGEM-7Zf(+)VWFCK nevet kapta. DNS szekvenálással ellenőriztük a létrejött lánc összetételének helyességét. A pGEM-7Zf(+)VWFCK plazmid VWFCK-t kódoló *Bam*HI-*Xba*I szakaszát pVL1393-ba szubklónoztuk. Hasonlóképpen sorozatos PCR segítségével képeztük a pGEM-7Zf(+)VWFCKM plazmidot, melyben az Ile<sup>2747</sup> kodonját Met kodonra változtattuk. A VWFCKM-et kódoló *Bam*HI-*Xba*I szakaszt szintén pVL1393-ba szubklónoztuk.

**VWF CK célzott mutagenézis:** Három ciszteint (2771-es, 2773-as és 2811-es pozícióban) cseréltünk alaninra sorozatos PCR<sup>150</sup> segítségével, melyhez a pGEM-7Zf(+)VWFCK plazmidot használtuk templátnak. Az így létrejött konstrukciókat és a megfelelő fehérjéket C2771A, C2773A, C2811A, C2771A/C2811A, és C2771A/C2773A/C2811A nevekkel láttuk el. Valamennyi konstrukció aminosav sorrendjét DNS szekvenálás segítségével ellenőriztük. A pGEM-7Zf(+)VWFCK plazmid betétjét *Sal*I és *Xba*I emésztéssel izoláltuk és szubklónoztuk pED vektorba<sup>151</sup>.

A genomiális DNS-t fagyasztott buffy coatokból preparáltuk a HighPure nevű PCR templát készítő kit segítségével (Roche, Mannheim, Németország).

### **A magyarországi 3-as típusú VWB betegek genetikájának feltérképezése során használt kísérletes eljárások**

**Töréspont elemzés:** A klinikai minták molekuláris vizsgálatához a genomiális DNS-t fagyasztott buffy coatokból preparáltuk a HighPure nevű PCR templát készítő kit segítségével (Roche, Mannheim, Németország). Az 51 exont és az exon-intron határon lévő intron részt

olyan primerek segítségével amplifikáltuk és szekvenáltuk, melyek az analóg pszeudo-VWF génnel nem keresztreagáltak. A kapott szekvenciákat a <http://www.vwf.group.shef.ac.uk> VWF adatbázisához viszonyítottuk.

**Töréspont analízis:** A delExon1-3 töréspontjait standard géntérképezéssel állapítottuk meg. Először az irodalomból ismert bázissorrend alapján a VWF-al szomszédos CD9 gén 5' nem transzlált szakaszára és a VWF 3-as intronjára specifikus primereket választottunk, ezzel egy olyan PCR-sorozatot hozva létre, amely fokozatosan szűkítette a primerek segítségével a töréspont régiót. Az így nyert PCR terméket amplifikálva és direkt módon szekvenálva sikerült megállapítani a pontos töréspontot.

**Töréspont-specifikus PCR:** A töréspont-specifikus PCR a VWF populációk szűrését is lehetővé teszi. A reakciót úgy terveztük meg, hogy a két primer pár egy közös reverz primerből és két különböző forward primerből álljon. A deléció-specifikus (fwd-del) primer az 5' törésponttól fölfelé található szakasznak felel meg, míg a vad-típus-specifikus (fwd-wild) primer *VWF* 3-as exonjában kezdődik. A közös reverz primer szintén a 3-as exon egy szakaszának felel meg. Az így megtervezett PCR reakció lehetővé tette két különböző termék szimultán amplifikációját. A delExon1-3 jelenléte esetén egy 265 bp szakaszt, a vad típusú *VWF* gén jelenlétekor egy 317 bp szakaszt, illetve mindkét darabot, amennyiben a deléció heterozigóta formában van jelen (**11. ábra**, 65. old). A PCR reakció paraméterei a következők voltak: 63°C kapcsolódási hőmérséklet, 35 ciklus. A primer szekvenciák a következők voltak: VWF-fwd-del: 5'-ctc ggc tca ctg caa gct ctg cct cct ggg-3'; VWF-fwd-wild: 5'-gga atc tcg ctc gtc ttg tcc agg ctg gaa g-3'; és a közös reverz primer, VWF rev: 5'-gct aag cag tca cat ttt cag ata acc tgt c-3'.

**Szekvenálás:** A molekuláris vizsgálatokat a hamburgi Hamburg-Eppendorf Egyetem Gyermekgyógyászati Hematológiai és Onkológiai Tanszékének laboratóriumában végeztük, Németországban. Primer párokat terveztünk a *VWF* gén 51 kódoló exonjára és a szomszédos intron szakaszokra. A 23-34-es exonok primerjeit úgy terveztük, hogy elkerüljük a *VWF* pszeudogén megfelelő szakaszainak amplifikációját. A PCR-t Taq polimeráz (Invitrogen, Karlsruhe, Németország) segítségével végeztük, T-gradient Cycler nevű készülékben (Biometra, Göttingen, Németország). A PCR termékeket 1,2% agaróz gélben történt elektroforézissel elemeztük (SeaKem; FMC, Rockland ME, USA); módosított TAE felvivő pufferben (Millipore, Bedford, MA, USA), és a specifikus csíkokat a gélből kivágtuk, majd kit segítségével tisztítottuk (DNA Gel Extraction kit, Millipore). A direkt szekvenálást a BigDye rendszerrel végeztük (ABI, Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit) az *ABI Prism 310* vagy

377 szekvenáló egységén (ABI, Foster City, CA, USA). A szekvenáláshoz a PCR-rel megegyező primereket használtuk.

**Géndózis elemzés:** Multiplex PCR-t terveztünk 50 µl reakciótérfogóban, 100 ng DNS templát és a cél- (*VWF* exon 3) és referencia- (*Rab27a* 3-as és 9-es exon, 15-ös kromoszóma) gének szekvenciáira tervezett primerpárok felhasználásával. A PCR termékeket denaturáló HPLC (nagy teljesítményű folyadékkromatográf, *high performance liquid chromatography*, Transgenomic, Omaha, IA, USA) segítségével elemeztük és számoltuk a két görbe (*VWF*/referencia) alatti terület arányát. Az arányok normál tartományát 14 olyan személyen végzett 50 független méréssel állapítottuk meg, akikről ismert volt, hogy mindkét *VWF* alléllal rendelkeznek. A normál átlag 1,28 volt, a tartomány ( $\pm 2$  SD) 0,94-1,62. Ezzel a módszerrel a 3-as exon homozigóta hiánya könnyen észlelhető (nincs csúcs). Pozitív kontrollként olyan személy DNS-ét használtuk, akiről ismert volt, hogy az egyik *VWF* gén heterozigóta módon teljesen hiányzik. A heterozigóta pozitív kontroll valamennyi mérése a fenti tartomány alatt volt.

#### ***Protein expressziós és biokémiai módszerek***

A p.C1149R mutáció heterodimer képződés és lebontás vizsgálata során használt kísérletes eljárások: ***Protein gél elektroforézis és immun assay-k:*** A rekombináns VWF multimer analízisét nátrium dodecyl szulfát (SDS) agaróz elektroforézis és *Western blotting* technikával végeztük.<sup>152</sup> A VWF multimerek vizualizálására a P0226 (Dako, Dánia) torma-peroxidázzal jelölt nyúl poliklonális anti-humán VWF antitestet és az ECL kemilumineszcens rendszert (Amersham Pharmacia Biotech) használtuk. A rekombináns VWF gél elektroforézise szintén ismert metodikával történt<sup>153,154</sup> SDS 5% poliakrilamid gélen (Bio-Rad, Hercules, CA). A fehérjéket elektroblotting módszerrel vittük át a polivinilidén-difluorid (PVDF) membránra (Bio-Rad), és a VWF vizualizálása a multimerekhez hasonlóan történt. A rekombináns VWF antigén szintjének meghatározása szendvics rendszerű ELISA módszerrel történt.<sup>153</sup> A módszer ELISA tálcához kikötött 082 nyúl poliklonális anti-humán VWF antitestet (Dako) használ, és a P0226 torma-peroxidázzal jelölt nyúl poliklonális anti-humán VWF antitest (Dako) szolgálja a detektálást. ***Immunprecipitáció és a rekombináns VWF analízise:*** A 293T sejteket p.C1149R-VWF mutánszal és a dA1 vagy a dA13 plazmid valamelyikével ko-transzfectáltuk a fent leírtak szerint. A rekombináns VWF-et 4°C-on másnap reggelig tartó inkubáció során 5,8 µg 082 poliklonális, vagy 4µg B710<sup>155</sup> monoklonális antitesttel immunprecipitáltuk,<sup>156</sup> 7,5µl protein A-Sepharose vagy protein G-Sepharose koncentráttal 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,02% Na azid, 1% Nonidet P-40, és 0,1% SDS reagensek segítségével.



A gélek futtatása a fentiek szerint történt. Az exponált filmeket (Kodak XAR-5) beszkeneltük és a sávokat a NIH Image program 1.61-es verziójának segítségével kvantifikáltuk.

**Az alegységek arányának számolása – a random dimerizációs reakció kérdése.** A számolás alapja a következő gondolatmenet volt (példaként a p.C1149R és dA13 ko-transzfekecióját használjuk): Elképzelhető, hogy a transzfekektált sejtek a p.C1149R-ot és dA13-at különböző szinten expresszálják. Az összes VWF alegység p.C1149R és dA13-ra eső frakcióját **a**-val illetve **b**-vel jelölve,

$$a+b=1. \quad 1. \text{ egyenlet}$$

A poliklonális 082 antitest valamennyi pro-VWF dimert immunprecipitálja, míg a B710 csak az A1 domaint. Redukáló körülmények között végzett elektroforézis és a p.C1149R, illetve dA13 alegységeknek megfelelő sávok kvantifikálása után a

$$p.C1149R/dA13_{082} = a/b \quad 2. \text{ egyenlet}$$

Amennyiben a pro-VWF alegységek random valószínűséggel dimerizálódnak az ER-ban, akkor a létrejövő lehetséges dimerek arányát a következőképpen kapjuk meg

$$(a+b)^2=a^2+2ab+b^2 \quad 3. \text{ egyenlet}$$

ahol  $a^2$  a CYs1149Arg homodimer frakció,  $2ab$  a dA13-p.C1149R heterodimer, és  $b^2$  a dA13 homodimer frakció. A B710 monoklonális antitest specifikus az A1 doménre,<sup>155</sup> és immunprecipitálja az összes olyan dimert, amely tartalmazza a p.C1149R alegységet (**a**-t). Az így nyert dimerek  $a^2+2ab$ -nak felelnek meg (lásd fenti egyenlet). Mindegyik  $a^2$  2 p.C1149R alegységet tartalmaz, míg a  $2ab$  1 p.C1149R és 1 dA13 alegység tartalmú heterodimer. Következésképpen a p.C1149R alegységek száma arányos a  $2a^2+2ab$ -vel, míg a dA13 alegységek aránya a  $2ab$ -vel arányos. Amennyiben a dimerizáció véletlenszerű, akkor a p.C1149R/dA13<sub>B710</sub> nem más, mint

$$p.C1149R/dA13_{B710}=(2a^2+2ab)/2ab=a/b+1. \quad 4. \text{ egyenlet}$$

Ha a folyamat nem véletlenszerű, hanem a homodimerek létrejöttének kedvez, akkor a p.C1149R/dA13<sub>B710</sub> arány növekedne, míg ha a heterodimerizáció létrejöttének kedvezne, akkor a p.C1149R/dA13<sub>B710</sub> arány csökkenne a két érték egyenlőségének határértékéig. **Az izotóppal jelzett VWF intracelluláris sorsának követése („pulse-chase” jelzés):** A rekombináns normál VWF-et vagy p.C1149R mutánst expresszáló Fur4BHK sejteket 6 lyukú tálcán tenyésztettük 70-90%-os fedettségig, PBS pufferrel mostuk, és 1 órán keresztül inkubáltuk cisztein-, valamint metionin-mentes táptalajban. A táptalajhoz ezután 100  $\mu$ Ci (3,7

$\times 10^6$ becquerel)  $^{35}\text{S}$ - jelzett ciszteint és metionint (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA) adtunk hozzá 30 percre, majd ezt követően a sejteket PBS-sel mostuk és tovább inkubáltuk olyan Opti-MEM I médiumban, mely jelöletlen cisztein és metionin tízszeres koncentrációját tartalmazta. A felülúszókat és sejt lizátumokat a jelzett időpontokban gyűjtöttük be, és a VWF-et a 082 antitesttel immunprecipitáltuk<sup>156</sup> azzal a különbséggel, hogy a protokollhoz hozzáadtunk egy antitest előtti előtisztító lépést. A mintákat SDS-poliakrilamid gél elektroforézis (PAGE) segítségével analizáltuk a fent részletezettek szerint. A géleket fixáltuk, Amplify-al kezeltük (Amersham, Cleveland, OH, USA), megszáritottuk, és  $-80^\circ$ -on Kodak XAR-5 filmre exponáltuk. Ha a kísérlethez lactacystint (10 mM) használtunk, akkor az jelen volt az 1 órás cisztein- és metionin-mentes táptalajjal történő preinkubáció, az izotópos jelzés („pulse”), valamint a követés („chase”) fázisok időszakai alatt is.

**A VWF CK domén diszulfid szerkezetének feltérképezése során alkalmazott kísérletes eljárások:** *A rekombináns fehérjék expresszállása és tisztítása:* Valamennyi baculovírus expressziós vektort Sf9 sejtekbe (PharMingen, Torrey Pines, CA, USA) ko-transzfektáltuk linearizált BaculoGold® DNS (PharMingen) segítségével. Magas titerű rekombináns baculovírust ismételt fertőzéssel készítettünk. High Five™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) sejteket fertőztünk, és Express Five szérumentes táptalajon 96 órán át tenyésztettük őket 18 mM glutamin hozzáadásával. A *VWFCK* és *VWFCKM* tartalmú felülúszókat Tris pufferral (20mM Tris HCl, pH 7,9, 20 mM NaCl, 0,02% Na azid)<sup>157</sup> szemben dializáltuk, majd NiNTA agaróz (Quiagen, Santa Clarita, CA, USA) oszlopokra vittük fel a mintákat a Pharmacia FPLC (Amersham Pharmacia Biotech) rendszerének felhasználásával. 10 mM imidazollal (Tris pufferben) való mosás után a fehérjét lineáris imidazol grádiensen (10-200 mM) eluáltuk 20 percig, 4 ml/perc sebességgel. A *VWFCK* és *VWFCKM* tartalmú frakciókat egyesítettük, és közvetlenül a C8 HPLC oszlopra (10x250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; Vydac/The Separations Group, Inc., Hesperia, CA, USA) vittük fel a Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA) 1100 HPLC rendszerében. Az „A” puffer 0,1% (v/v) trifluorecetsav (Pierce) volt vizes fázisban, míg a „B” puffer 0,1% (v/v) trifluorecetsav volt HPLC minőségű acetonitrilben (Aldrich). A fehérjét a „B” puffer 15-30% lineáris grádiensével eluáltuk 15 perc alatt, 4 ml/perc sebesség mellett. *A VWFCK deglikozilálása:* A glykoFree deglikoziláló kittet az Oxford GlycoSystems-től vásároltuk (Abington UK). A *VWFCK*-t trifluorometán-szulfonsav (TFMS) segítségével deglikoziláltuk a gyártó leírását követve. *TCEP segítségével történő részleges redukció és NEM-mel történő alkilálás:* A *VWFCK*-t és a *VWFCKM*-t egy már korábban közölt módszer szerint részlegesen redukáltuk és alkiláltuk.<sup>158</sup> Dióhéjban: a *VWFCK*-t (200  $\mu\text{g}$ ) inkubáltunk 40

$\mu\text{l}$  0,75M nátrium acetáttal, pH:4,6, 6M guanidin HCL, és 8  $\mu\text{l}$  0,1M TCEP jelenlétében 45°C-on 20 percig N<sub>2</sub> atmoszférában. *VWFCKM*-t (200  $\mu\text{g}$ ) szintén 20 percig inkubáltuk 30  $\mu\text{l}$  0,75M nátrium-acetát pH:4,6, 6M guanidin HCl és 4  $\mu\text{l}$  0,1M TCEP jelenlétében N<sub>2</sub> atmoszférában. Ezt követően 3  $\mu\text{l}$  (*VWFCK*) vagy 4  $\mu\text{l}$  (*VWFCKM*) 1M-os NEM-t adtunk az elegyhez dimetilszulfóxiddal (ICN Biomedicas Inc., Costa Mesa, CA), és 37°C-on 60 percig inkubáltuk N<sub>2</sub> atmoszférában. Az alkilálást követően a mintákat RP-HPLC C4 oszlopára vittük fel (4,6x250mm, 5 $\mu\text{m}$ , Vydac) melyről 1ml/perc sebességgel eluáltuk vizes fázisú trifluorecetsav és acetonitril grádiens segítségével. ***DTT-vel történő teljes redukció és 4VP-vel történő alkilálás:*** A *VWFCK* doménjeinek, illetve azok tisztított fragmenseinek fennmaradó részlegesen redukált és alkilált diszulfid hídjait 50 mM DTT segítségével redukáltuk 0,2 M Tris-HCl pH 8,5, 6 M guanidin HCl-t tartalmazó közegben és alkiláltuk fölös mennyiségű 4VP segítségével.<sup>159</sup> Az így módosított termékeket RPHPLC-n tisztítottuk C18-as oszlopon (2,1x150 mm; VYDAC, the Separation Group Inc.) acetonitril grádiensen. ***CNBr és Lizil endopeptidáz emésztés:*** A *VWFCK* és *VWFCKM* (200  $\mu\text{g}$ ) mintákat 1,8 mg CNBr-dal reagáltattuk 70% hangyasavban 25°C-on 15 órán keresztül. A reakcióterméket szárítás után 0,2 M TRIS HCl pH 7,9 és 4 M urea tartalmú oldatban oldottuk fel, majd 20 órán át 37°C-on 4  $\mu\text{g}$  Lizil endopeptidázzal emésztettük. A mintákat a fentiek szerint C18-as oszlopon RP-HPLC-vel tisztítottuk. ***A részlegesen redukált és alkilált VWFCKM emésztése CNBr-dal és Termolizinnel:*** A mintákat 16 órán keresztül emésztettük CNBr-al 70% hangyasavban úgy, hogy a CNBr:Met moláris arány 300:1 legyen. A keletkezett terméket C18 (2,1x150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; VYDAC) oszlopon RP-HCLP rendszerben tisztítottuk 0,25 ml/perc sebességgel, majd 15-45% „B” oldat gradiensen eluáltuk 30 percen keresztül. A Termolizin emésztéshez a szárított termékeket (170  $\mu\text{g}$ ) 1 órán keresztül 4 M guanidin HCl tartalmú 0,5 M TRIS HCl, pH 7,0, oldatban 55°C-on denaturáltuk, majd Termolizinnel (1,2  $\mu\text{g}$ ) 20 órán keresztül emésztettük 37°C-on 0,1 M TRIS HCl, pH7,0, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1M guanidin HCl oldatban. A termékeket C18-as oszlopon választottuk szét RP-HPLC segítségével. ***Biokémiai aminosav szekvenálás:*** A szekvenálást a galvestoni Texas Egyetem Orvosi Fakultásának Fehérjekémiai Laboratóriumában, vagy a Howard Hughes Orvosi Intézetében a Texas Egyetem Southwestern Medical Centerben (Dallas, TX) végeztük. A mintákat az Applied Biosystems 494/HT *PROCISE* szekvenáló rendszerén, valamint szintén az Applied Biosystems 477A *pulsed-liquid* szekvenálóján analizáltuk, mely a 610 *Data Analízis System* által vezérelt 120A PTH jelű aminosav elemzőhöz volt csatlakoztatva. Az S-etylsuccinimidocisztein (ES-Cys) tartalmú PTH termékeket dupletként detektáltuk a PTH-prolin és PTH-metionin pozíciók között. Az S-piridiletlicisztein (PE-Cys) PTH derivátumokat éles csúcsként érzékeltük a PTH-tirozin és

PTH-prolin pozíciók között. **Tömeg spektrometria:** A tömegeket mátrix-asszisztált lézer deszorpció/ionizációs repülési idő tömegspektrometria segítségével határoztuk meg *PerSeptive Voyager* (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) és *Bruker Proflex* vagy *Bruker BiFlex III* (Bruker Daltonics, Inc. Manning Park, Billerica, MA) spektrométerek és  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinnaminsav (Hewlett Packard) vagy 2,5-dihidroxibenzoesav (Aldrich) mátrixok segítségével. A peptidek tömegét *Shepra3.1.1* (Washington Egyetem Biokémiai Tanszék, Seattle, WA) szoftver segítségével számoltuk ki. **A fehérjék expressziója és lökészerű (pulse-chase) jelzése COS7 sejtekben:** A *VWFCK*-t és variánsait kódoló plazmidokat átmeneti transzfekcióval vittük be a COS7 sejtekbe.<sup>160</sup> A lökészerű (*pulse*) jelölést és immunprecipitációt kisebb módosításokkal egy korábbi leírást<sup>161</sup> követve végeztük. A sejteket egy órán át inkubáltuk 37°C-on metionin-mentes Dulbecco-féle módosított Eagle táptalajban (Life Technologies Inc.), mely 10% dializált magzati borjúsavót (FCS, Life Technologies Inc.) tartalmazott, majd 30 percig jelöltük őket 3 ml metionin-mentes Dulbecco-féle módosított Eagle táptalajban, melyet 100 mCi TranS-label<sup>TM</sup> (ICN Biomedicals) jelöléssel egészítettünk ki. A követés (*chase*) fázisát a jelzőtáptalaj eltávolításával és 10 mM jelöletlen metionint tartalmazó teljes táptalaj hozzáadásával indítottuk el. Különböző időpontokban 1 ml mintát vettünk a felülúszóból és sejt lizátumból, melyet úgy előtisztítottunk, hogy 4°C-on 4 órán keresztül ráztuk 20  $\mu$ l Protein A-Sepharose-zal, (CL-4B *fast flow*, Amersham Pharmacia Biotech) és 10  $\mu$ l normál nyúlserummal (Dako, Glostrup, Dánia). Az előtisztítás után 1  $\mu$ l nyúl anti-humán VWF poliklonális antitestet (A082, Dako) adtunk a mintákhoz 4°C-on 16 órán át. Az immunkomplexeiket 30 percig 20  $\mu$ l Protein A-Sepharose-zal való rázással precipitáltuk. Az immunprecipitátumot mostuk, SDS-PAGE segítségével szeparáltuk 15% poliakrilamid gélen, majd az elemzést a *STORM 840* rendszerrel végeztük (Molecular Dynamics Sunnyvale, CA).

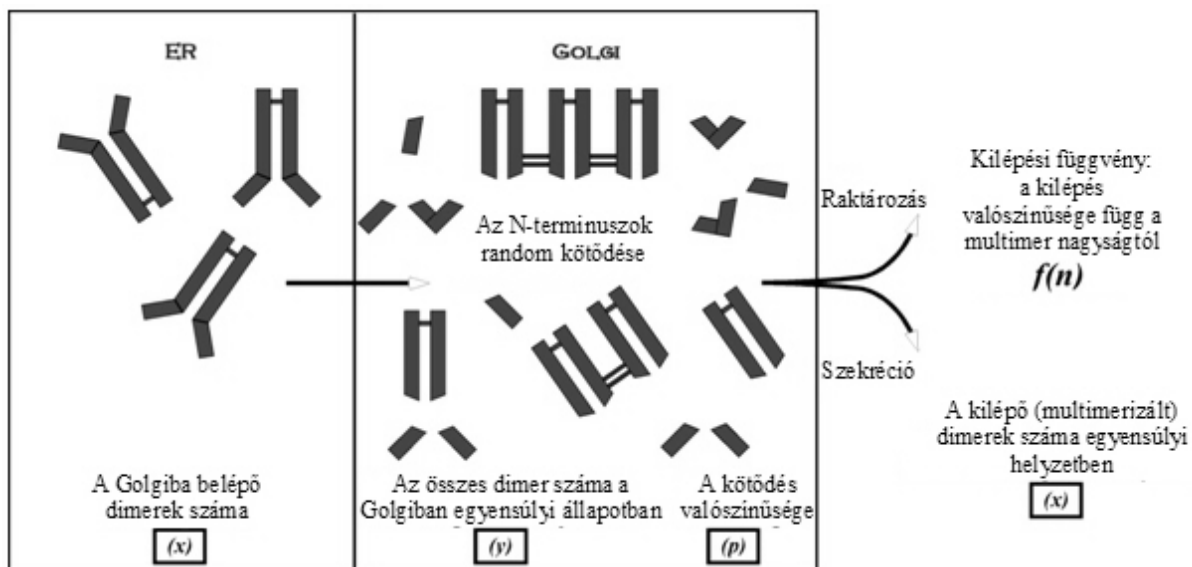
**Immunprecipitáció:** A rekombináns teljes vagy egyes szakaszokat tartalmazó részleges VWF immunoprecipitációja 4°C-on 082 vagy B710 monoclonalis antitestekkel éjszakán át tartó inkubációval történt protein A-Sepharose vagy protein G-Sepharose, Nonidet P-40, és SDS jelenlétében. Az immunoprecipitátumokat SDS polyacrylamide gel elektroforézis segítségével analizáltuk.

### Matematikai modellezés

**A CK domén felépítésének molekuláris modellezése:** A TGF- $\beta$ 2 és VWF CK domén aminosav sorrendjeinek illesztését (*alignment*) a Clustal módszerrel *PAM250* aminosav molekulatömeg táblázat (*residue weight table*) segítségével a *MEGALIGN* (DNASTAR, Madison, WI, USA) szoftverben végeztük. A TGF- $\beta$ 2 dimer szerkezetét (Protein Data Bank,

belépési kód 2tgi)<sup>162</sup> használtuk referenciaként a cisztin csomó fő belső részeinek és a csatlakozó  $\beta$  szálak gerincét képező atomok koordinátáinak megadásához a *MODELER* (Molecular Simulation, San Diego CA) szoftverben. A fennmaradó hurokrégiók szerkezetéhez egy referenciastruktúra könyvtárból választottunk szerkezeteket. Az oldalláncokat mindenhol a VWF megfelelő oldalláncaival helyettesítettük, megszerkesztettük a hiányzó diszulfid hidakat, és az Asp<sup>2763</sup>-Asp<sup>2769</sup> szakaszt szuperimponáltuk a TGF- $\beta$ 2  $\alpha$ 5 hélixére. A szterikus átfedéseket molekuláris dinamikai szimulációk révén energia-minimalizálással tüntettük el a *DISCOVER* (Molecular Simulations) programban. Az alternatív alegységek közti diszulfid hidak kialakítását hasonlóképpen építettük fel a C-terminus áthelyezésével és az egyik alegység oly módon való elforgatásával, hogy a Cys<sup>2771</sup>-Cys<sup>2773</sup> és Cys<sup>2811</sup>-Cys<sup>2811</sup> diszulfidkötések a megfelelő geometriához jussanak. A szalag modell rajzokat a *MOLSRICPT* programban hoztuk létre.<sup>163</sup> Komplex matematikai modellt dolgoztunk ki a VWF szintézisének, multimerizációjának, szekréciónak, a plazma VWF hasításának és clearance-ének modellezésére. A modell paramétereit sikerült úgy optimalizálni, hogy a létrejövő (és a modellen belülről megjeleníthető) multimer eloszlás megszólalásig hasonlított a normál és bizonyos jellegzetes patológiás klinikai minták multimer mintázatára.

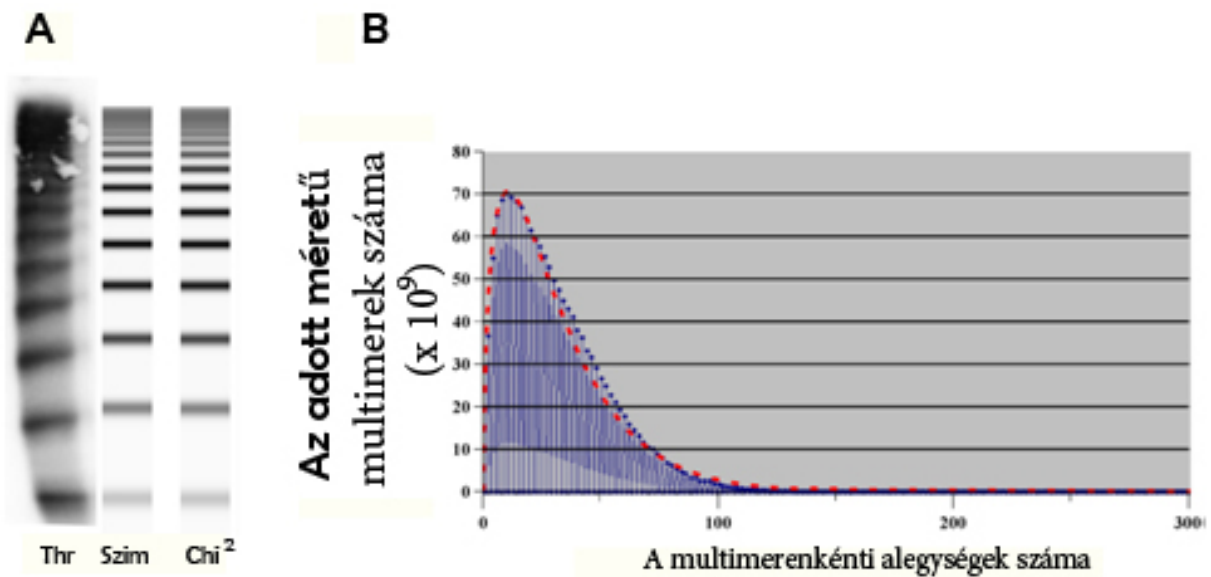
**A VWF szintézis és clearance, valamint az ezekből fakadó plazma multimer szerkezetek matematikai modellezése:** A modell részleteit az 4.-6. ábrák, és a hozzájuk tartozó szövegrész



**4. ÁBRA. A VWF multimerok összeállításának és szekréciónak sematikus ábrázolása.** Bekereteztük azokat a paramétereiket, melyeket a matematikai modell szintézist szimuláló részében használtunk: a Golgiba időegység alatt belépő (és egyensúlyi helyzet esetén kilépő) dimerek száma ( $x$ ), a Golgiban bármely időpillanatban található és a multimer képzés folyamata számára elérhető dimerek száma ( $y$ ), és a Golgin belül a multimer kötés kialakulásának valószínűsége ( $p$ ). Végül, a Golgiból való kilépés valószínűsége függ a létrejött multimer nagyságától – az összefüggést a kilépési függvény  $f(n)$  írja le, ahol  $n$  a multimerben foglalt dimerek számát jelöli.

mutatja be. Az alábbiakban röviden összegzem a modell lényegét: A modell matematikailag szimulálja a VWF szekréción, hasítást és *clearance*-t. A szekréción mértékét állandónak tekintjük, illetve DDAVP adása után rövid időre fokozódik. A multimer szintézis során a szekretált multimerek eloszlását meghatározó paramétereket a **4. ábra** szemlélteti.

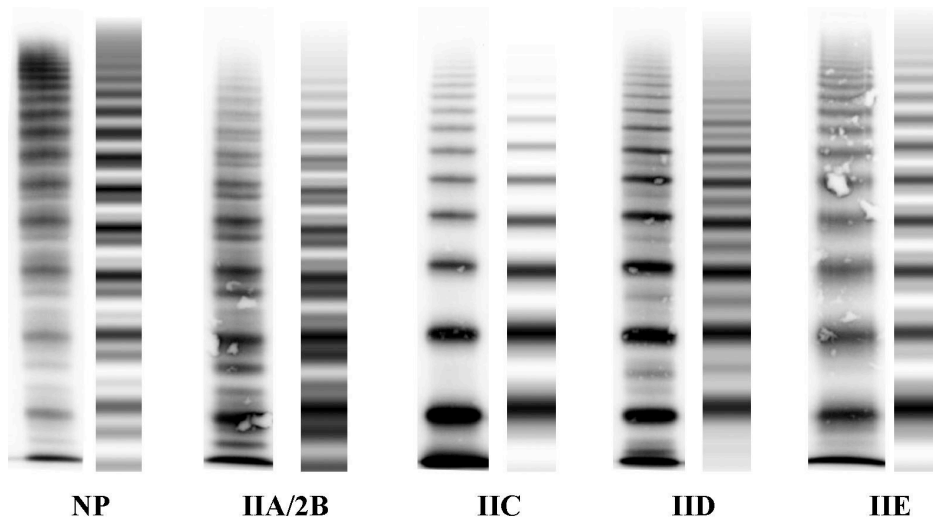
A bemutatott eloszlásban szekretált multimerek két konformációban léteznek: vagy „nyitott”, vagy „zárt” alakzatban vannak jelen a keringésben. Csak a „nyitott” molekulák kerülhetnek hasításra, melynek valószínűsége  $p_{clv}$  (lásd alább). A nyitott konformáció valószínűsége ( $p_{op}$ )



**5. ÁBRA. A szekretált VWF multimerek kiindulási eloszlása.** Az ábra típusos szimulációs kísérlet mutat az **A** panelen gélmintázat, a **B** panelen eloszlási hisztogram formájában. Ebben a kísérletben a paraméterek a következőképpen voltak beállítva:  $x=60$ ;  $y=110$ ;  $p=0,8$ . Összehasonlítás végett normál kísérletesen nyert trombocita multimer mintázatot (Thr) és a  $\text{Chi}^2$  függvénnyel nyert szimuláció eredményét ( $\text{Chi}^2$ ) is bemutatunk. A **B** panelen a  $\text{Chi}^2$  eloszlást a piros pontok mutatják, mely igen jó egyezést mutat a szimulációs eloszlással (kék színben). A  $\text{Chi}^2$  eloszlás paraméterei a következők voltak: szabadságfok: 3, várható érték: 30,8.

növekszik a multimer méretének növekedésével; a multimer méret és  $p_{op}$  közötti összefüggést a *nyitási függvény* írja le. Bizonyos multimer méret felett (ultra-nagy multimerek, vagyis amelyek  $\geq N_{op}$  alegységet tartalmaznak) valamennyi multimer állandóan a nyitott alakzatot veszi fel ( $p_{op} = 1$ ). Ebben a munkában két *nyitási függvényt* alkalmaztunk:  $f(n) = k_{op} * n^3$  és  $f(n) = k_{op} * 1.05^n$ , ahol a  $k_{op}$  faktort úgy optimalizáltuk, hogy a normál, illetve beteg plazmák multimer mintázatát kapjuk (**5. és 6. ábra**). Lényegében hasonló eredményekre vezetett mindkét *nyitási függvény*. Így az egyszerűség kedvéért – és mivel az exponenciális függvény csekély mértékben jobban hasonlított az experimentálisan nyert multimer mintázatokhoz – a továbbiakban csak az  $f(n) = k_{op} * 1.05^n$  függvénnyel nyert adatokkal foglalkozunk. A matematikai modell validálását úgy végeztük el, hogy az egyensúlyi helyzetű normál plazma

multimer eloszláson túl a paraméterek megfelelő „kóros” értékre állításával patológiás körülményeket is szimuláltunk, és az így nyert multimer mintázatot betegek multimer képeihez hasonlítottuk. A VWB 2A típus különböző kísérletes és szimulált variánsait a **6. ábra** mutatja. A *clearance* mértékét függetlennek tekintjük a multimer mérettől,<sup>164</sup> és az  $R_{clr}$  időkonstans



**6. ÁBRA.** *A matematikai modell reprodukálni képes a normál és patológiás multimer mintázatokat.* Az ábra normál plazma (NP) és különböző 2A típusú VWD variánsok gélmintázatát mutatja, a megfelelő szimulációs kísérletek eredményével párba állítva. A második oszlop egy IIA variáns VWB-ben szenvedő beteg mintáját mutatja. Minthogy ezt a mintázatot a gyakorlatban nem lehet a 2B betegek géljétől elkülöníteni, az oszlop a IIA/2B jelölést kapta. A IIC beteg mutációja homozigóta p.G550R; a IID betegé heterozigóta p.C2771Y volt.

határozza meg. A  $T_{1/2}$  felezési időt szimulált DDAVP kísérlet segítségével határozzuk meg, melyben a klinikai gyakorlathoz hasonlóan a VWF termelést 35 percre hozzávetőlegesen 30-szorosára növeljük. A *clearance* kinetikája (a hasításhoz hasonlóan) a Michaelis-Menten kinetikai egyenlethez igazodik.  $EC_{50}$  az a plazma VWF koncentráció, melynél a *clearance* mechanizmus 50%-ban van szaturálva. Az  $EC_{50}$ -et önkényesen a normál VWF koncentráció 400%-ára tettük, mivel számos adat (itt nem közölt adatok) arra utal, hogy a VWF *clearance* másodrendű (vagyis szaturálható) kinetikát mutat.<sup>165</sup> A szimulációk vizualizálását a szoftver program GelWizard elnevezésű moduljával oldottuk meg, amely a numerikus adatokból gélmintázatot generál. A paraméterek megfelelő beállítása után nyert kezdeti eloszlást az **5. ábra** mutatja gél mintázat és hisztogram formájában is.

## EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A hemosztázis betegségeinek körében végzett vizsgálataim eredményeit a célkitűzések bevezetőjében részletezett rendszer sorrendjében mutatom be. A leghosszabb részt az érdeklődésem középpontjában álló von Willebrand betegség területén végzett kutatások teszik ki. Ezt követi egy igen ritka súlyos vérzékenység, a szerzett inhibitoros hemofília A kezelése során szerzett tapasztalatok bemutatása, majd áttérek a trombotikus folyamatok (véna tromboembóliák és trombotikus mikroangiopátiák) területén végzett kutatások ismertetésére. Az egyes területek eredményeinek bemutatását rövid bevezető előzi meg, amely összefoglalja a bevezető részben részletesen kifejtett háttérrel, és az olvasó figyelmét a vizsgált konkrét kérdésekre irányítja.

A klinikai vérzékenységgel járó von Willebrand betegség becsült előfordulási gyakorisága egymillió lakosra számolva 100 fölötti, amely meghaladja a hemofília előfordulási gyakoriságát.<sup>166</sup> A VWB betegek legnagyobb része 1-es típusú betegségben szenved, amelyet a funkcionálisan és strukturálisan ép VWF csökkent szintje jellemez. Ritkább a 2-es típus (funkcionálisan kóros VWF fehérje), és legritkább a 3-as típus (a VWF teljes hiánya). A következőkben vizsgálataink eredményeit a VWF *bioszintézis különböző lépéseinek* (transzláció, az elsődleges VWF fehérje dimerizációja az ER-ban, multimerizáció a Golgiban, szekréció, plazma clearance) *sorrendjében* mutatom be. A 3-as típusú VWB genetikájával kapcsolatos vizsgálatokat követően a dimerizációban elsőrangú szerepet játszó CK domén struktúrájával kapcsolatos vizsgálataim eredményei következnek. Ezt követően tárgyalom az ER minőségellenőrző rendszerének szerepét a súlyos 1-es típusú VWB kialakulásában, majd a fokozott clearance fontosságának bemutatását a Vicenza altípus létrejöttében.

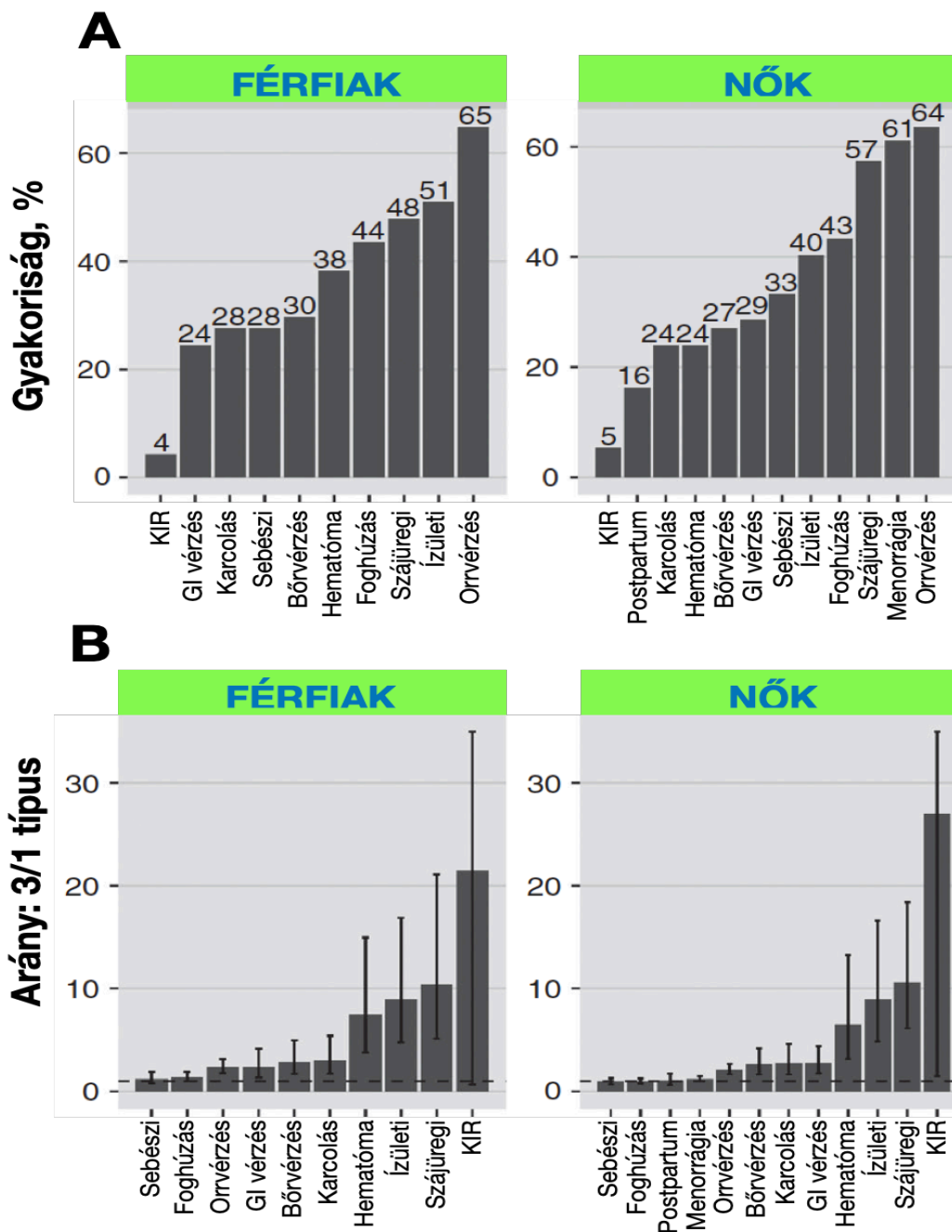
Hogyan hasznosíthatóak molekuláris ismereteink a gyakorlatban? Az elmúlt évtized számos újítást eredményezett a VWB laboratóriumi diagnosztikájában. A sokféle elven történő mérés összehasonlítása lényeges ismereteket hordoz a klinikusok és laboratóriumi szakemberek számára egyaránt. E terület kutatását az ismeretek szintézise, VWB *guideline*-ok bemutatása követi.



## Vérzéses tünetek és propeptid szintek a 3-as típusú von Willebrand betegségben<sup>167,168</sup>

A 3-as típusú VWB ritka betegség, bizonyos becslések szerint egy eset per 1 millió lakos<sup>74</sup>. Bár Magyarországon – talán a gondos nyilvántartásnak köszönhetően – ezt kissé magasabbnak, 2.4 eset per millió lakosnak találtuk<sup>38</sup>, ez mindenképpen az igen ritka betegségek közé tartozik. Nem csoda hát, hogy nagyon kevés pontos információnk van erről a betegségről. Ez különösen szembeötlő, ha az 1-es típusú VWB-vel hasonlítjuk össze, mely a leggyakoribb vérzékenység emberben, és számos tanulmány áll rendelkezésre tünettanával és genetikájával kapcsolatban. Így valódi hiánypótló tanulmány a 3WINTERS-IPS<sup>167-170</sup> (*Type 3 Von Willebrand International Registries Inhibitor Prospective Study*) nagy nemzetközi tanulmány, melyben Magyarország képviselőjében nemcsak részt vett munkacsoportunk, de a Szervező Bizottság (*Steering Committee*) tagjaként a szervezésből is kivettem a részemet. A vizsgálatba 265 európai és iráni beteget (146 európai és 119 iráni) választottunk be, ezáltal két különálló populációról is részletes adatokat nyertünk. A 265 beteg közül nem volt mindenkitől minden adat elérhető, így 223 beteg (117 európai, 106 iráni) vérzéses tüneteit tudtuk részletesen elemezni. Közülük 45 betegről derült ki, hogy nem sorolhatók igazán a 3-as típusba, mert VWF:Ag szintjük meghaladja a határként meghatározott 3 NE/dL-t. Ez az adat jól mutatja, hogy világszerte nem ritka a 3-as típus “túldiagnosztizálása” – ezek a betegek többnyire 2A altípusba (általában a szintén recesszíven öröklődő IIC variáns csoportba) tartoznak. A vérzéses tünetek szempontjából ők is súlyosan vérzékenyek, ezért a tüneti analízishez nem választottuk külön ezt a csoportot. A laboratóriumi adatok és tünetek összevetéséhez viszont a valóban 3-as típusú 178 beteg adatait elemeztük, ami messze az eddig elérhető legnagyobb 3-as típusú VWB esetszám.

A vérzéses tüneteket a széles körben ismert 1-es típusú VWB tüneteivel vetettük össze, amit többek között ugyanezen munkacsoport (Magyarország csatlakozása előtt végzett) munkájából<sup>19</sup> jól ismerünk. A várakozásnak és a szórványos klinikai tapasztalatnak megfelelően a 3-as típusú betegek sokkal súlyosabb vérzékenységben szenvedtek. Bár észlelhető heterogenitás a 3-as típusú betegek között, általánosságban vérzésmutatójuk sokkal magasabb, mint az 1-es típusú betegekben (15, illetve 6;  $p < 0,001$ ). A 15 fölötti vérzésmutatóval jellemezhető betegek aránya is sokkal magasabb a 3-as típusú kohorszban (45,7% vs. 7%;  $p < 0,001$ ).



**7. ÁBRA. Vérzéses tünetek 3-as típusú VWB-ben.** A panel: a vérzéses tünetek megoszlása a 3WINTERS-IPS kohorsz (n=223) betegek között (az oszlopokra írt számok a százalékos megoszlás számértékét mutatják). B panel: A vérzéses lokalizációk megoszlása az MCMDM-1VWD kohorsz<sup>19</sup> tüneteire viszonyítva. Az egyes oszlopok a két kohorszban való előfordulás egymáshoz viszonyított arányát mutatják. Egyezés esetén ez 1 (szaggatott vonal). KIR: központi idegrendszeri vérzés.

A leggyakoribb vérzés lokalizáció az orrvérzés (7. ábra, A). Különbség van a férfiak és nők vérzéses tünete között, amennyiben a férfiaknál az orrvérzést az ízületi és szájüregi vérzések követik gyakoriság tekintetében, míg nőknél ezeket megelőzi a menorrhagia. Az életveszélyes központi idegrendszeri vérzés szerencsére nem gyakori (4-5%), de ha mindezt összevetjük az 1-es típusú VWB-ben észlelhető vérzékenységgel, nagyon érdekes megfigyeléseket tehetünk.

Pl. 3-as típusú VWB-ben a központi idegrendszeri vérzés esélye még így is több, mint 20-szorosan meghaladja az 1-es típusú betegekben talált kockázatot (**7. ábra, B**). A szintén súlyos tünetnek számító nagy izom bevérzések (hematomák), szájüregi és ízületi vérzések esélye is csaknem tízszerese az 1-es típusú betegségben tapasztaltnak. Viszont érdekes módon a műtéti vérzések, orrvérzés, gasztrointesztinális vérzések, kután hematomák, sőt a menorrhagia esélye is közel azonos az 1-es típusú betegségben észleltekkkel (**7. ábra, B**). Ennek magyarázata egyrészt azzal függhet össze, hogy mindkét kohorszban diagnosztizált és kezelt betegek voltak, és az utóbbi típusú vérzések megelőzésére valószínűleg hatékonyabb a megelőzőként használt faktor pótlás (illetve DDAVP profilaxis) ezáltal kiegyenlítve a két betegség természetes lefolyása közti különbséget. De ez a kockázatok közti hasonlóság azt is aláhúzza, hogy az 1-es típusú VWD is jelentős műtéti vagy angiodiszpláziával, menstruációval összefüggő vérzéses kockázatot hordoz, ami e két kezelt kohorsz összehasonlításának tanúsága szerint összemérhető a 3-as típusú betegek vérzésveszélyével.

További érdekes megfigyelésre is lehetőséget nyújtott a 3WINTERS-IPS vizsgálat. Kiderült, hogy az egyes vérzés típusok megoszlása nem véletlenszerű. Pl. az orrvérzéstől szenvedő betegek sokkal gyakrabban kapnak gasztrointesztinális, vagy ízületi vérzést, mint azok akiknél nem jelentkezik orrvérzés. Tehát a különböző vérzésformák csoportosulnak, klaszterekben jelentkeznek. E klaszterek azonosítását csak ilyen nagy számú betegadat elemzése tette lehetővé. A két legfontosabbnak bizonyult klaszter az *(i)* ízületi vérzés, gasztrointesztinális vérzés és orrvérzés, valamint a *(ii)* szájüregi vérzés, műtét vagy foghúzás utáni vérzés és menorrhagia társulása. E társulások magyarázata és fiziológiai háttere egyelőre megfejtésre vár.

Külön kitérek a VWF propeptid (VWFpp) mérése kapcsán szerzett érdekes tapasztalatokra. A VWFpp még a szintézis során, a Golgiban hasad le a VWF molekuláról (a furin nevű intracelluláris enzim hasítja). A szekréció során így a VWF alegységekhez viszonyítva 1:1 moláris arányban, de önálló molekulaként kerül a keringésbe<sup>171</sup>. Egyelőre fiziológiás szerepéről nem tudunk. A keringésben fél életideje (2 óra) jóval rövidebb, mint a VWF multimeré (8-12 óra)<sup>172,173</sup>. Tekintettel arra, hogy a VWF és a VWFpp szintézise kapcsolt, de clearance-ük egymástól függetlenül történik, a VWFpp/VWF:Ag arány igen hasznos információt nyújt a VWF clearance-ről. Erről eddig elsősorban 1-es típusú VWB-ben voltak adataink, ahol a fokozott clearance miatt kialakult alacsony szintet gyakran külön alcsoportba sorolják (1C altípus), melyet éppen a VWFpp/VWF:Ag arány segítségével lehet legegyszerűbben megállapítani.<sup>174,175</sup> Fordított a helyzet a VWF és a FVIII esetében, hiszen e két fehérje

szintézise egymástól független gének vezérlése alatt áll, de, minthogy egymással komplexben keringenek, clearance-ük viszont közös. Éppen ezért, a fokozott VWF clearance esetén a FVIII/VWF:Ag szint nem változik, viszont csökkent VWF szintézis esetén ez az arány megnövekszik – éppen fordítva, mint amit a VWFpp/VWF:Ag szintnél láttunk, ami csökkent VWF szintézis esetén változatlan.<sup>176</sup> Ezen háttérrel érthető, hogy nagy várakozással tekintettünk a VWFpp szintek mérése elé 3-as típusú VWB-ben, hiszen erről szórványos adatoktól eltekintve nem rendelkezünk információval. Hipotézisünk az volt, hogy az ún. null mutációk (kereteltolódás, nonszensz mutáció, nagy deléciók, splice site mutációk), melyek a VWF fehérje szintézisét lényegében lehetetlenné teszik, emelkedett FVIII/VWF:Ag szinttel, míg a misszensz mutációk, melyeknél feltételezhető, hogy a kóros fehérje fokozott clearance-e hozzájárul az extrém alacsony (< 3 NE/dl) szinthez, emelkedett VWFpp/VWF:Ag szintet fognak mutatni. E hipotézisek csak részben igazolódtak (7. táblázat).

**7. TÁBLÁZAT. FVIII és propeptid szintek 3-as típusú VWB-ben**

	Misszensz n=20	Null n=116	Misszensz/Null n=6	Részen azon. n=5
VWF:Ag N: 50-150	<b>0,5</b> 0,5-0,5	<b>0,5</b> 0,5-0,5	<b>0,5</b> 0,5-1,0	<b>0,5</b> 0,5-1,4
FVIII N: 50-150	<b>2,6</b> 1,9-3,3	<b>2,3</b> 1,8-2,8	<b>3,3</b> 2,1-6,1	<b>1,9</b> 1,6-2,6
VWFpp N: 82-173	<b>3,6</b> 1,4-6,6	<b>1,2</b> 0,6-3,4	<b>2,6</b> 1,2-7,8	<b>3,1</b> 1,6-9,8
VWFpp/Ag N: 0,8-2,2	<b>4,9</b> 2,2-9,3	<b>2,4</b> 1,2-5,8	<b>2,8</b> 2,3-11,2	<b>6,2</b> 3,1-8,6
FVIII/VWF:Ag N: 0,6-1,9	<b>4,4</b> 3,1-5,7	<b>4,4</b> 3,4-5,2	<b>5,1</b> 4,2-7,8	<b>3,8</b> 1,8-5,1
VM	<b>11,5</b> 6,3-18,3	<b>14,0</b> 8,0-19,0	<b>18,5</b> 12,0-22,8	<b>18,5</b> 8,8-20,8

A 20 misszensz mutációval rendelkező beteg vagy homozigóta volt, vagy kettős heterozigóta két misszensz mutációra. A 116 beteg is vagy homozigóta vagy kettős heterozigóta volt null mutációkra (részletezést lásd a szövegben). A hat betegnél egy null és egy misszensz mutációt találtunk (ők köztes értékeket mutattak az első két oszlopban szereplő betegek közt). Végül 5 betegnél csak az egyik mutációt sikerült azonosítani, ezért őket külön kategóriába soroltuk.

Az értékek a mediánt (vastagon szedve) és az interkvartilis tartományt (IQR) mutatják. A mérés határ (0,8) alatti értékeket önkényesen 0,5-nek vettük. Az összehasonlítás a Mann-Whitney teszt segítségével történt. Egyedül a kék keretben látható értékek közt találtunk statisztikailag szignifikáns (illetve közel-szignifikáns) különbséget (p értékek kék mezőben kiemelve). A többi érték tekintetében nem volt különbség a csoportok közt.

N: normál tartomány. VM: vérzésmutató (*bleeding score*).

A **FVIII/VWF:Ag** arányok tekintetében semmi különbség nem volt a misszensz és null mutációs csoportok közt. Erre ugyan nem számítottunk, de valójában logikusan következik abból, hogy az ilyen alacsony (közel nulla szintű) keringő VWF esetén a FVIII túlnyomó többsége szabad FVIII, amely esetre a fenti logika nem érvényes, és ha van is nyomokban VWF a misszensz mutáns betegekben, az nem változtat lényegesen ezen a helyzeten. Adataink (7.

**táblázat)** mindenesetre rámutatnak, hogy milyen fontos a VWF FVIII-at stabilizáló szerepe, hiszen a 3-as típusú betegek túlnyomó többségénél a FVIII a középsúlyos hemofiliának megfelelő FVIII tartományba esett.

A **VWFpp/VWF:Ag** arány valóban statisztikailag is kimutatható módon magasabb volt a misszensz mutáció miatti 3-as típusú VWB csoportban. Ez alátámasztja kiindulási hipotézisünket, mely szerint a misszensz mutációk legalábbis egy része nem csak intracelluláris VWF degradációhoz, hanem a szekretált VWF fehérje gyorsabb clearance-éhez is vezet. Azonban a statisztikailag is szignifikáns különbség ellenére az átfedés elég jelentős, ezért az egyes betegek esetében a VWFpp/VWF:Ag arány csak ritkán lesz alkalmas a genotípus megjóslására.

Arra is számítottunk, hogy a misszensz mutációval rendelkező csoport **vérzésmutatója** alacsonyabb lesz a null mutáció mellett észlelhetőnél. Ez a hipotézisünk hamisnak bizonyult (**7. táblázat**), a csoportok közt semmi különbséget nem találtunk. A 3-as típusú betegek vérzékenysége (és ennek megfelelően a vérzésmutató is) jelentős heterogenitást mutat, amelynek oka egyáltalán nincs tisztázva. Akár ugyanaz a genetikai eltérés is okozhat súlyos vérzékenységet az egyik betegben, és kevésbé súlyosat egy másikban. Úgy látszik, hogy ebben a helyzetben a misszensz mutációs csoportban nyomokban feltételezhető (és kóros) VWF fehérje nincs lényeges hatással a tünetekre.

**Összegezve:** a 3WINTERS-IPS vizsgálat sok jelentős adattal gazdagította ismereteinket a 3-as típusú VWB tüneteit illetően. Megismertük a vérzékes szövődmények típusainak eloszlását (**7. ábra**), kiderült, hogy bizonyos típusú vérzések csoportosulnak (pl. orrvérzés, GI vérzés és ízületi vérzés). Végül kiderült, hogy a 3-as típusú VWB-ben a FVIII/VWF:Ag és a VWFpp/VWF:Ag arányok (**7. táblázat**) nem használhatóak sem a klinikum sem a genotípus jóslására.

## **A VWF bioszintézissel inkompatibilis génhibák: a 3-as típusú von Willebrand kór molekuláris patogenezise. A „magyar mutáció” keletkezése és az inhibitor képződés kérdései<sup>38,81,169,170</sup>**

Kutatásunk kezdetekor a 3-as típusú VWB genetikájának számos kérdése tisztázatlan volt. Kihhasználva a vérezékeny betegek országos kataszterét, olyan vizsgálatot indítottunk, melynek célja az volt, hogy a teljes magyarországi 3-as típusú VWB betegcsoport genotípusát meghatározzuk. A vizsgálatban az akkor ismert huszonnégy 3-as típusú VWB családból huszonhárom család (24 beteg) vett részt. Nem várt eredményként egy új, Magyarországon gyakori, az összes hazai 3-as típusú allél 25%-át képező nagy részleges deléció-találtunk. Ezért a vizsgálat során elvégeztük e deléció molekuláris jellemzését is. Szintén váratlan felfedezés volt, hogy szemben a korábbi irodalmi adatokkal,<sup>74</sup> Magyarországon a homozigóta nagy deléciók egyike sem szövődött alloantitest-képződéssel a gyakori faktorpótlás ellenére sem.

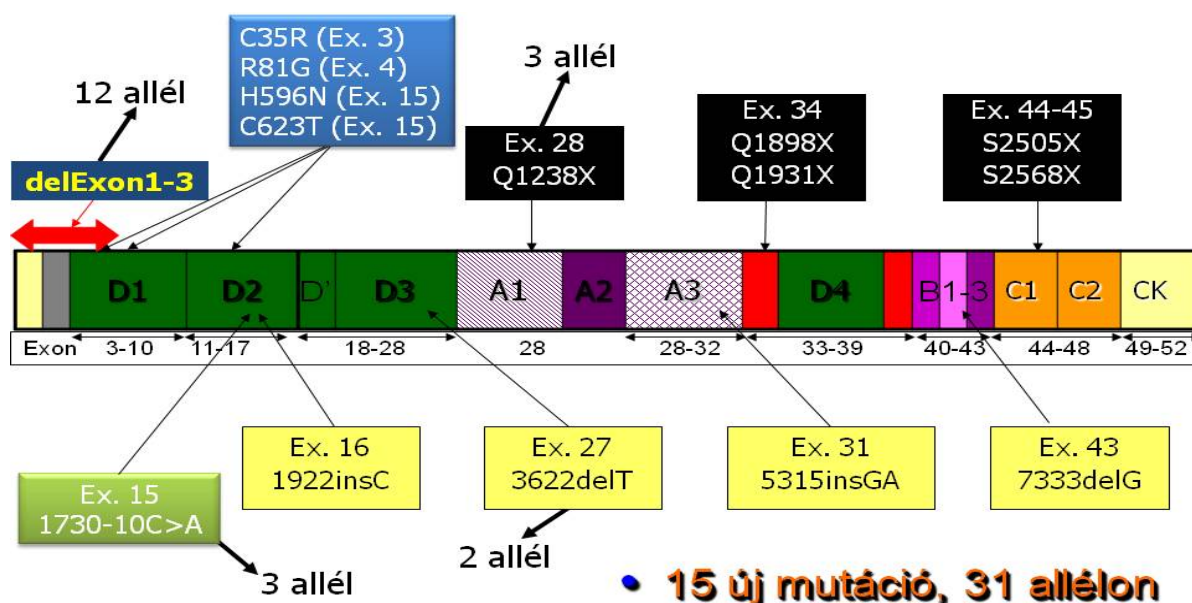
### ***A magyarországi 3-as típusú VWB általános klinikai és molekuláris jellemzése***

Magyarországon a 3-as típusú VWB prevalenciája 2,4/egymilliónak bizonyult (24 beteg a tízmillió országban). A magyar 3-as típusú VWB betegpopuláció genetikai analízise során 15 új és 6 korábban már leírt mutációt találtunk. A 24 beteg közül 12-nek homozigóta mutációja volt, 11-nek kettős heterozigóta mutációja, míg egy betegben nem tudtuk egyértelműen azonosítani a 3-as típusú VWD fenotípus genetikai magyarázatát. A szekvenált fragmentumokban található mutációk és polimorfizmusok elemzése azt mutatta, hogy családjaink közül egyiknek sem volt a Bevezetésben (18. old.) részletezett génkonverzióra visszavezethető pszeudogén rekombinációs eseménye, pedig ez a mechanizmus viszonylag gyakorinak számított a korábban elemzett populációkban.<sup>88</sup>

Öt olyan ismétlődő mutációt azonosítottunk, melyek egynél több betegben fordultak elő: delExon1-3 hét betegben (hat családban) szerepelt (a 3-as típusú családokon belüli allél frekvencia 25%), a c.2435delC öt betegben, míg a c.3379+1>A, p.Q1238X és p.E1853X mindegyike két-két betegben (**8. táblázat**).

Ez az eredmény váratlan volt, a korábbi vizsgálatokban nagy deléció csak a betegek csekély százalékában volt felelős a 3-as típusú VWB-ért. Ezt több példából is láthattuk: Schneppenheim és munkatársai 28 német 3-as típusú VWB beteg vizsgálata során egy homozigóta teljes és egy heterozigóta részleges nagy deléció-talált,<sup>76</sup> Shelton-Inloes és munkatársai két homozigóta teljes delécióról számoltak be 19 betegükben,<sup>93</sup> míg Baronciani és munkatársai egyetlen esetben

találtak homozigóta részleges delécióit negyven multietnikus származású betegük között.<sup>85,177</sup> Ez a három vizsgálatban összesen öt deléziós beteget jelent 87 vizsgált beteg körében (allél frekvencia 5,2%). A későbbiekben még részletezett, 265 európai és iráni beteget vizsgáló nemzetközi 3WINTERS-IPS tanulmányban hasonlóan ritka 6.8%-os allél frekvenciát találtunk<sup>169</sup>. Ezen kívül szerepel az irodalomban néhány esetismertetés is, melyekből az adott populációban való gyakoriság nem állapítható meg. E beszámolók körében négy olyan családot találtunk, melyekben komplett deléció és öt olyan családot, melyekben részleges nagy deléció volt feltüntetve a 3-as típusú VWB okaként.<sup>85,86,93,177,178</sup> A nagy deléciók tekintetében az eddigi beszámolók a különböző családokban egymástól eltérő defektusról számoltak be (vagyis ismétlődő nagy deléciót korábban nem ismertünk), két nemrég közölt kivétellel. Az egyiket Schneppenheim és munkatársai írták le két német és három olasz, egymással rokonságban nem álló 3-as típusú VWB családban. Azonos töréspontú, 235 kb nagyságú, a teljes VWF gént magában foglaló deléciót találtak, és az öt index beteg delécióhoz kapcsolható haplotípusa is minden esetben megegyezett<sup>86</sup>. A másik kivétel a Sutherland és munkatársai által közölt, több 3-as típusú nagy-britanniai VWB családban észlelt, a 4-5-ös exont érintő nagy részleges deléció.<sup>87</sup> Mindenesetre a kiemelkedő gyakoriság miatt a magyar populáció mindenképpen különlegesnek számít.



**8. ÁBRA. Korábban nem közölt 3-as típusú VWB-t okozó mutációk Magyarországon.** Látható, hogy a mutációk az egész VWF gén területén elszórtan foglalnak helyet. Fekete keretben a korai stop kodont eredményező (nonszensz) mutációk, sárga keretben a kereteltolódást okozó inszerciók és deléciók vannak jelölve. Kék keretben emeltük ki az aminosav cseréhez vezető (missense) mutációkat, és zöld keretbe került az intron kivágódási helyet érintő (*splice site*) mutáció. Külön van jelölve a magyarországi VWB populációban gyakori nagy részleges deléció, a DelExon1-3.

A mutációkat, valamint a laboratóriumi és klinikai jellemzőket a **8. táblázatban** és a **8. ábrán** foglaltuk össze. A továbbiakban áttekintjük a betegek klinikai és laboratóriumi jellemzőit, majd **8. TÁBLÁZAT. A magyar 3-as típusú VWB betegek laboratóriumi, klinikai és molekuláris adatai**

#	VWD típus	Ag	CB	FVIII	M**	Inh	VM <sup>†</sup>	Nem	Nukleotid csere	Aminosav csere	Exon	Intron 40 VNTR	Új mutáció <sup>††</sup>
1	3	1	1	1	-	-	20	N	delEx1-3 /c.5692C>T	delEx1-3/ p.Q1898X	1-3/ 34	18/14	Ú/Ú
2	3	<1	1	10	-	-	23	N	delEx1-3 /c.2435delC	delEx1-3/ p.P812RfsX31	1-3/18	18/19	Ú/L
3	3	<1	<1	2	-	-	12	F	delEx1-3/ delEx1-3	delEx1-3/ delEx1-3	1-3/1-3	18/18	Ú/Ú
4	3	1	1	1	-	-	26	N	delEx1-3/ delEx1-3	delEx1-3/ delEx1-3	1-3/1-3	18/18	Ú/Ú
5	3	1	1	1	-	-	19	F	delEx1-3/ delEx1-3	delEx1-3/ delEx1-3	1-3/1-3	18/18	Ú/Ú
6	3	1	1	3	-	-	29	N	delEx1-3/ delEx1-3	delEx1-3/ delEx1-3	1-3/1-3	18/18	Ú/Ú
7	3	1	1	1	-	-	28	F	delEx1-3/ delEx1-3	delEx1-3/ delEx1-3	1-3/1-3	18/18	Ú/Ú
8	3	1	1	2	-	-	19	F	c.2435delC/ c.2435delC	p.P812RfsX31/ p.P812RfsX31	18/18	19/19	L/L
9	3	1	1	3	-	-	10	N	c.2435delC/ c.5557C>T	p.P812RfsX31/ p.R1853X	18/32	16/19	L/L
10	3	<1	<1	3	-	-	18	F	c.22692270delC T/ c.2435delC	p.L757VfsX22/ p.P812RfsX31	17/18	17/18	L/L
11	3	<1	<1	4	-	-	21	N	c.2435delC/ c.7514C>A	p.P812RfsX31/ p.S2505X	18/44	18/19	L/Ú
12	3	1	1	7	-	-	32	N	c.21242125delC T/ c.21242125delC T	p.C709LfsX3/ p.C709LfsX3	16/16	18/18	L/L
13	3	1	1	5	-	-	18	N	c.3712C>T/ c.3712C>T	p.Q1238X/ p.Q1238X	28/28	16/16	Ú/Ú
14	3	1	1	2	-	+	14	F	c.3622delT/ c.3622delT	p.S1208QfsX7/ p.S1208QfsX7	27/27	18/18	Ú/Ú
5*	3	1	1	3	-	-	ND	N	c.3379+1G>A/ c.3379+1G>A	Splice/Splice	25/25	18/18	L/L
6*	3	1	1	5	-	-	24	N	c.3379+1G>A/ c.3379+1G>A	Splice/Splice	25/25	18/18	L/L
17	3	<1	<1	4	-	-	18	N	c.7333delG/ c.7703C>A	p.E2445RfsX/ p.S2568X	43/45	17/18	Ú/Ú
18	3	<1	<1	3	-	-	20	F	c.1992insC/ c.5557C>T	p.C665LfsX13/ p.R1853X	16/32	15/16	Ú/L
19	3	<1	<1	3	-	-	20	F	c.241A>G/ c.5315insGA	p.R81G/ p.D1772EfsX11	4/31	16/17	Ú/Ú
20	3	<1	<1	6	-	-	14	F	c.103T>C/ c.4975C>T	p.C35R/ p.R1659X	3/28	14/16	Ú/L
21	3	1	1	5	LM	-	15	F	c.1868G>A/ c.3712C>T	p.C623T/ p.Q1238X	15/28	16/17	Ú/Ú
22	3	3	1	4	LM	-	18	N	c.1730-10C>A/ c.1730-10C>A	Splice/Splice	15/15	18/18	Ú/Ú
23	3	4	2		LM	-	21	F	c.1730-10C>A/ c.5791C>T	Splice/p.Q1931X	15/34	17/18	Ú/Ú
24	3	5	1,5	7	LM	-	14	F	c.1786C>A	p.H596N	15	15/19	Ú
25	2A (II/C)	6	1	4	LM	-	25	N	c.883T>A/ c.2435delC	p.C295S/ p.P812RfsX31	8/18	16/19	Ú/L

\*Ez a két beteg szintén hordozta a p.R924Q aminosavcsereét (l. **10. táblázat**). Ag: VWF:Ag; CB: VWF:CB;

M\*\* Multimer: A legtöbb betegnél nem találtunk kimutatható VWF fehérjét a multimer gélen. A 19-25 betegek multimer géljeit a **13. ábra** mutatja. A 25-ös beteg valójában 2A altípusú – lásd szöveg.

LM: Kis molekulásúlyú multimer (Low Molecular Weight Multimer). F: férfi, N: nő.

<sup>†</sup>VM: Vérzésmutató (*Bleeding Score*). ND: Nem történt; a beteget nem tudtuk elérni a vérzésmutató meghatározásához.

<sup>††</sup>Ú: új, L: korábban leírt.

az egyes mutáció típusokat. Külön figyelmet szentelünk a nálunk gyakori (de más populációkban nem ismert) delExon1-3 mutációnak.



***Klinikai jellemzők és a VWF ellenes alloantitest-képződés kérdése***

Betegeink klinikai jellemzőit a **8. táblázat** mutatja. A VWF:Ag szint  $\leq 1\%$  volt 21 betegben, míg 3 betegben 1-5%-ot mértünk. Ebben a vizsgálatban 5%-nak vettük a 3-as típusú VWB VWF:Ag szint felső határát (a későbbi 3WINTERS-IPS vizsgálatban szigorúbb, 3%-os határt használtunk). Még egy további beteget is bevettünk a vizsgálatba, akinek VWF antigén szintje 6% volt, és akinek családi anamnézise egyértelműen recesszív öröklődésmentet mutatott. Ez a (25-ös számú) beteg 3-as típusú VWB diagnózist hordozott, és a vizsgálatba való belépéskor nem állt rendelkezésre jó minőségű multimer analízis. Bár a molekuláris és nagy felbontású multimer vizsgálat alapján diagnózisát a vizsgálat közben módosítottuk (2A-ra; IIC variáns), úgy éreztük, hogy az ilyen határhelyzetek beválasztása jobban tükrözi a mindennapi klinikai gyakorlatot, mintha a beteget utólag kizárnánk. A multimer gélen 5 betegnél találtunk nyomokban kis molekulású VWF multimert (LM, **13. ábra**). Az öt beteg között volt az a négy, akinél  $>2\%$  VWF:Ag szintet mértünk. Tizennyolc betegnél nyomokban sem volt kimutatható a VWF.

Vérzésmutató és részletes klinikai információ 24 betegről áll rendelkezésre. A vérzésmutató 12–28 (átlag 17,8) volt a férfi betegekben és 10–32 (átlag 22,0) a nőbetegekben, ami annak a következménye, hogy a nőbetegek súlyosabb vérzéses tünetekben szenvedtek a menorrhagia, petefészek- és posztpartum vérzések miatt. (A vérzésmutató skála elméleti tartománya -3 és 45 között van – lásd **2. táblázat**, 29. old.) A sokkal nagyobb esetszámú 3WINTERS-IPS vizsgálatban hasonlóan széles tartományban változó vérzésmutatót találtunk (medián 15,0, 8-20)<sup>167</sup>. A nőbetegekben a vérzéses epizódok száma a menarche után emelkedett meg. Azok a vérzéses tünetek, amelyek faktorpótlást igényeltek a férfi betegekben, főként sérülések következményei voltak, és típusosan a gyermekkor elmúltával ritkábbá váltak. A Haemate P akár profilaktikus, akár „*on-demand*” használata csökkentette a vérzéses epizódok súlyosságát és időtartamát. Évi 1-10 alkalommal volt szükség VWF faktorpótlásra. Az 1990-es évek eleje után egyöntetűen Haemate P-t használtak a betegek faktorpótlására, míg az azt megelőző időszakban krioprecipitátumot.

Két érdekes tanulsággal szolgál a **8. táblázat** vérzésmutatóinak elemzése ebben a viszonylag homogén betegpopulációban. Az első az a megfigyelés, hogy a betegek vérzékenységét kvantitatívan mérő vérzésmutató milyen széles határok között mozog (10–32). Ez aláhúzza azt a tényt, hogy a klinikai vérzékenység fenotípusának kialakításában a VWF szinten kívül más, ma még ismeretlen módosító gének is fontos szerepet játszanak. Ezen módosító gének

feltérképezése a jövő egyik fontos kutatási iránya. A másik érdekes kérdés, amit a táblázatból megválaszolhatunk, az, hogy vajon van-e különbség a vérzékenység mértékében aszerint, hogy minimális VWF:Ag szint mérhető vagy nem. Ha összevetjük a  $\leq 1$  IU/dl VWF:Ag szinttel rendelkező 20 beteg vérzésmutatóját (VM átlag  $\pm$  szórás  $20 \pm 5,74$ ) azzal a négy beteggel, akiknél a VWF:Ag  $> 2$  IU/dl, (VM:  $19,5 \pm 4,65$ ), akkor látható, hogy ez sem egymástól, sem a csoport egészétől (VM:  $19,9 \pm 5,48$ ) nem különbözik. A következtetés akkor sem változik, ha az utólag IIC variánsnak osztályozott 25-ös beteget kihagyva csak a 3-as típusú betegek csoportjában végezzük el az elemzést (összes beteg: VM:  $19,7 \pm 5,5$ , a  $> 2$  IU/dl VWF:Ag szinttel rendelkező három 3-as típusú beteg VM:  $17,7 \pm 3,51$ ). Ez logikus is, ha azt tekintjük, hogy a VWF aktivitás a betegekben egyöntetűen alacsony, de mindenképpen alátámasztja, hogy ezeket a betegeket egyetlen VWD típusba osztályozzuk.

**Inhibitorok 3-as típusú VWB-ben:** A magyarországi kohorszban VWF ellenes alloantitestek egyetlen betegben (14-es beteg) alakultak ki; ennél a betegnél anafilaxiás reakció is fellépett a VWF koncentrátum adása után (az inhibitor kialakulás aránya  $1/24$ , vagyis  $4,2\%$  a 3-as típusú kohorszban belül). Ez a beteg homozigóta volt a 27-es exon c.3622delT kereteltolódással járó mutációjára, és esetében a vérzéses tünetek rFVIIa (NovoSeven®) kezelést igényeltek. A többi beteg közül egyiknek sem alakult ki allergiás reakciója, és nem váltak refrakterre a VWF faktorpótlásra, bár gyermekkoruktól kezdve valamennyien rendszeresen kaptak faktorkészítményt. Egy másik vizsgálat részeként három betegnél (2-es, 12-es és 25-ös beteg) ellenőriztük a beadott VWF és FVIII farmakokinetikáját. Ezek a mérések e betegekben kétségkívül kizárták az inhibitor jelenlétét (nem publikált adatok). Minthogy nem lépett föl klinikai indikáció (kezelésre való refrakter állapot, illetve anafilaxiás reakció), részletes laboratóriumi vizsgálat az inhibitor kizárására a többi betegben nem történt, így igen alacsony titerben jelenlévő anti-VWF antitestek jelenlétét nem zárhatjuk ki teljes biztonsággal. Ezek az antitestek, ha jelen voltak is, klinikailag jelentéktelenek maradtak. Külön kiemelendő, hogy egyik homozigóta nagy részleges deléciónal (lásd alább) rendelkező betegünkönél sem jelentkezett inhibitor, noha az irodalmi adatok alapján<sup>74</sup> ezt várhattuk volna. (Megjegyezzük, hogy e homozigóta betegeink egyikének sem volt szüksége sebészi beavatkozásra, ezért a VWF preoperatív hatásosságát e betegekönél nem állapíthattuk meg.)

Az inhibitorok kérdését tovább elemeztük egy nagy nemzetközi vizsgálat (**3WINTERS-IPS**) keretében<sup>170</sup>. Ebbe a vizsgálatba összesen 265 európai és iráni 3-as típusú VWB-ben szenvedő beteget vontunk be<sup>169</sup>. E beteg közül 213-nál sikerült részletes VWF inhibitor vizsgálatot

végezni.<sup>170</sup> Korábbi magyarországi adatainkat megerősítve azt találtuk, hogy az inhibitor képződés ritka e betegekben, mindössze 18/213 (8,4%) betegnél sikerült inhibitort kimutatni, noha többszörös, érzékeny metodikát alkalmaztunk. Egy betegnél kiderült, hogy téves a diagnózis (inkább súlyos 2-es típus, a magyar kohorsz 25-ös betegéhez hasonlóan). A 18 inhibitoros betegek közül (15-nél állt rendelkezésre a teljes genetikai háttér) csak 6-nak volt nagy deléciója (33%), 7-nek másfajta null allélje volt, és kettőnek pedig misszensz mutációja. A 18 nagy deléció miatt kialakult 3-as típusú VWB közül csak 6-nál lehetett inhibitort kimutatni (33%, **9. táblázat**). A vizsgálat azt is újra megerősítette, hogy a DelEx1-3 a magyar populációra specifikus, mert más populációkban ezt a defektust nem találtuk. A teljes VWF gén hiánya (DelEx1-52) már nagyobb inhibitor rizikót képviselt, de nem jelentett biztos alloantitest-képződést, mert legalább két homozigóta teljes VWF gén hiánnyal rendelkező beteg negatív volt alloantitestekre, noha rendszeres faktorkezelésben részesültek<sup>170</sup>. Mindezek az adatok azt

**9. TÁBLÁZAT. A 3WINTERS-IPS vizsgálat kilenc nagy deléciója**

Deléció	EU	HU	IR	Rokon	összes	Inhibitor
DelEx1-52	4			3	7	5/7
DelEx1-5	1		1		2	NEM
DelEx1-3		3			3	NEM
DelEx4-5	1				1	NEM
DelEx6	1				1	NEM
DelEx17	1				1	NEM
DelEx4-34	1				1	NEM
DelEx14-15			1		1	NEM
DelEx35-52			1		1	IGEN
<b>Összesen</b>					18	

265 beteg 206 nem rokon családba tartozott. Inhibitor adat 213 betegről állt rendelkezésre

támasztják alá, hogy nem a korábban hangsúlyozott deléció típus, hanem inkább a fehérje teljes hiánya jelent rizikót az antitest képződésre, azonban a genetikai háttéren kívül más, egyelőre azonosítatlan tényezők is befolyásolják az immunológiai reakciót.<sup>170</sup>

A VWF ellenes alloantitest-képződés gyakoriságát korábbi adatok is mind ritka szövődménynek írták le 3-as típusú VWB-ben, de ezen általános megfigyelésen belül változó százalékos arányt találtak. A betegek 7,5–9,5%-ában,<sup>90,91</sup> vagy egy másik vizsgálat szerint (a teljes iráni 3-as típusú VWB populációban) mindössze 2,6%-ban.<sup>80</sup> Az irodalomban elérhető adatok heterogenitása részben azzal függhet össze, hogy a különböző populációkban különböző mértékben állt rendelkezésre faktorpótlás. Inhibitorok kifejlődését további szerzők is leírták különféle null alléllal járó (korai stop kodont okozó kereteltolódás vagy nonszensz) mutációk következtében.<sup>85,178,179</sup> Mindenesetre azt a korábbi álláspontot, miszerint a homozigóta VWF

részleges vagy teljes deléciója (igen ritka kivétellel<sup>87,89</sup>) mindig alloantitest-képződéssel jár,<sup>84-86,89,92-95</sup> a magyarországi kohorsz publikálása alapján kellett először megkérdőjelezni. A korábbi beszámolóknak beválogatási hiba (*selection bias*) is szerepet játszhatott az inhibitorképződés gyakoriságának túlértékeléséhez a nagy deléciókban. Mindezek alapján jól látható, hogy a VWB-ben megfigyelt inhibitorok kialakulásának genetikai és immunológiai mechanizmusát egyelőre csak nagyon felületesen ismerjük.

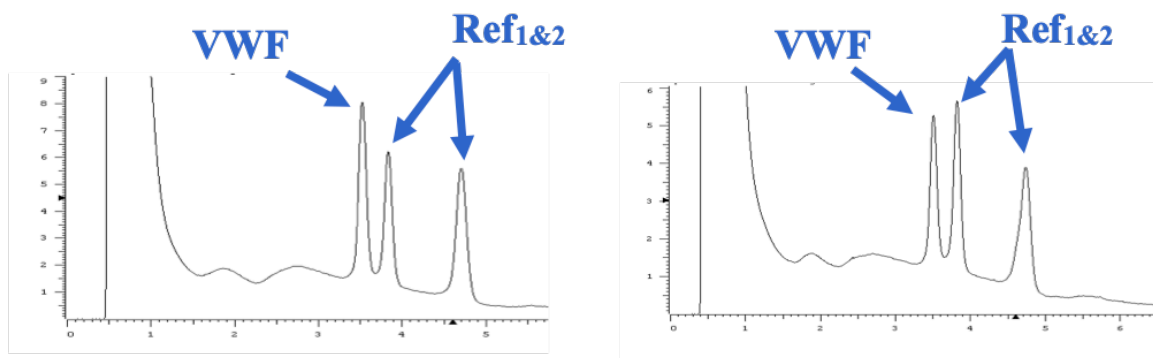
### ***Nagy deléció: a delExon1-3 jellemzése***

A vizsgálat egyik legváratlanabb eredménye tehát a nagy részleges deléció felfedezése volt. Ezt a deléciót ezért mélyrehatóan elemeztük. A többi molekuláris defektus bemutatása ennek az elemzésnek a részletezése után következik.

Az első szokatlan megfigyelés az volt, hogy öt betegben (négy, egymással nem rokon családból) nem sikerült specifikus PCR terméket nyerni a 2-es és 3-as exonból, annak ellenére, hogy több különböző primer párt is használtunk. Az amplifikációs termékek teljes hiánya alapján vetődött fel, hogy egy részleges nagy deléció áll a betegség hátterében, mely magában foglalja a *VWF* gén 1-es 2-es és 3-as exonját. E feltételezés igazolásához az egyes exonok jelenlétének mennyiségi megközelítésére volt először szükség – ez a géndóziselemzés módszerének segítségével vált lehetővé.

### 1. Géndóziselemzés

A géndóziselemzés módszere egy multiplex PCR reakción alapszik, melyben a vizsgált szakaszon kívül egy referencia génre specifikus primer pár is be van építve. A keletkezett termékeket HPLC-n analizálva lehet következtetni a templátok mennyiségének egymáshoz való viszonyáról. (A módszer részleteit lásd a megfelelő metodikai fejezetben.) Valamennyi betegünkön végeztünk géndóziselemzést abból a célból, hogy az esetleges heterozigóta deléciókat is megtaláljuk. Az öt homozigóta betegben természetesen nem keletkezett termék. Rajtuk kívül még két betegnél találtunk olyan VWF/referencia gén arányt, amely alatta maradt a normál határoknak (**9. ábra**). Később mindkét betegnél deléció-specifikus PCR-rel erősítettük meg, hogy valóban heterozigóta formában van jelen náluk a delExon1-3 (lásd alább). Ez a két beteg más 3-as típusú mutációval társulva kettős heterozigóta módon hordozta a deléciót (**8. táblázat**).



**Kontroll:**

**AUC:  $VWF/Ref_1=1,4$ ;**

**$VWF/Ref_2=1,2$**

**Heterozigóta:**

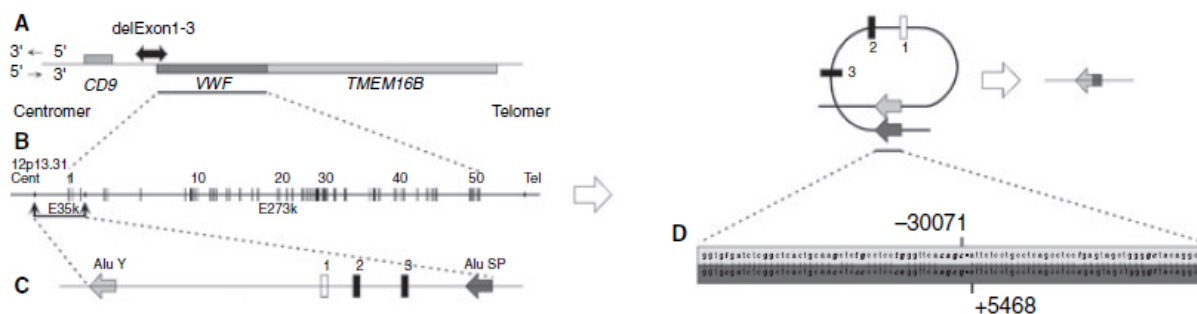
**AUC:  $VWF/Ref_1=0,8$ ;**

**$VWF/Ref_2=0,7$**

**9. ÁBRA.** A delExon1-3 kimutatása DHPLC-vel történő géndózis elemzés segítségével. Az első csúcs (I) a VWF gén 3-as exonjának, a második két csúcs (II) pedig a referencia gén (*Rab27a*, 15-ös kromoszóma) két szakaszának felel meg. Heterozigóta betegekben a görbe alatti területek (AUC) aránya a normálnak kb. a fele volt.

## 2. A deléciós töréspontok meghatározása

A nagy deléció töréspontjainak meghatározására standard géntérképezést használtunk. Az 5'-töréspont a VWF kezdő metionin AVG kódjának A-jától -30071 bázispárra volt található (GenBank accession no. NT009759), a VWF és a CD9 gének között. A 3'-töréspont a VWF gén hármask intronjában, az ATG-től +5468 bp-ra található. A teljes deléció összesen 35540 bp elvesztését eredményezte, mely magában foglalja a VWF 1-es exonját (nem kódoló), valamint a 2-es és 3-as kódoló exonokat (**10. ábra**). Így a mutáció helyes elnevezése delExon1-3.



**10. ÁBRA. A delExon1-3 elhelyezkedése és a deléció feltételezett mechanizmusa.** A és B: az 5' töréspont a VWF és CD9 gének között található, míg a 3' töréspont a VWF gén 3-as intronjában van. C: feltételezett mechanizmus: a két töréspontnál AluY és AluSP repetitív szekvenciát találtunk, melyek között homológ rekombináció jön létre, és a köztes génszakasz kihasítódik. D: A töréspontokat a homológ Alu-szekvencián belül jelöltük.

Az 1-3-as exonig tartó genetikai anyag elvesztésén kívül a deléció a VWF gén promóter szakaszának elvesztését is okozza. Egy ilyen defektusnál azt várjuk, hogy VWF még nyomokban sem termelődik a homozigóta betegeknél. Bár direkt mRNS vizsgálatot nem végeztünk, az a tény, hogy VWF még nyomokban sem volt kimutatható betegeink plazmájában, jól illeszkedik a VWF funkció fenti teljes elméleti elvesztéséhez.

## 3. In silico töréspont analízis

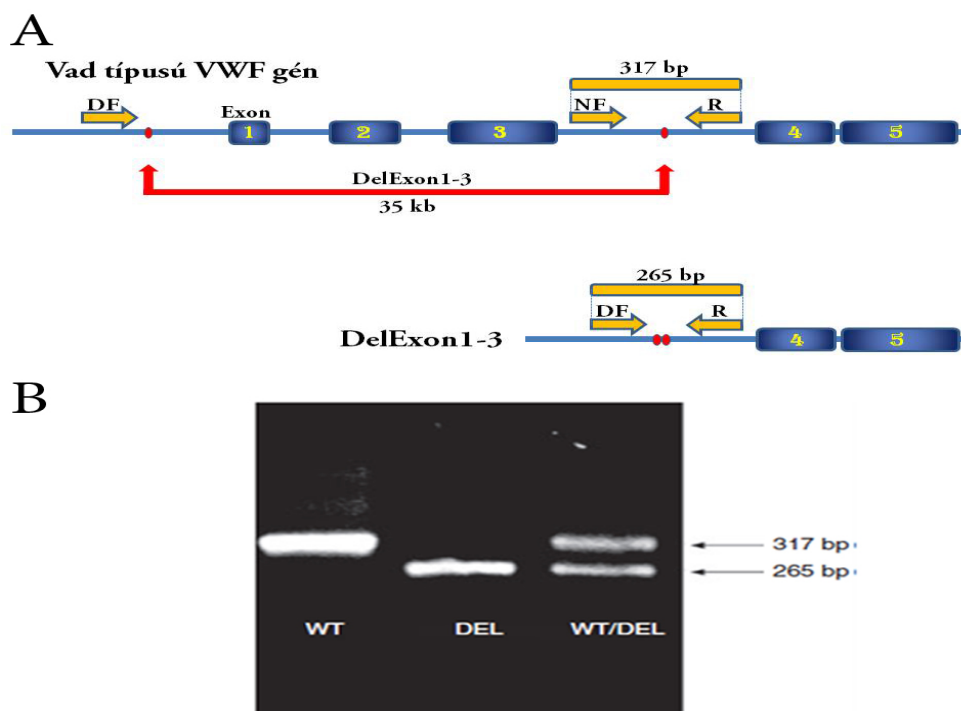
Ez után arra voltunk kíváncsiak, hogy ez a deléció vajon milyen mechanizmussal jött létre. Ehhez részletesen („in silico”) elemeztük az érintett DNS szekvenciát. Az elemzés során mind az 5', mind a 3' töréspontnál Alu elemeket találtunk. Így valószínűsíthető, hogy a deléciót egy nem engedélyezett homológ rekombinációs esemény okozta az 5' régió Alu Y és a 3-as intronban található 3' Alu SP elemek között. Ez a rekombinációs esemény vezethetett a két Alu elem közé került 35 kb fragmentum elvesztéséhez (**10. ábra**).

Az Alu család a mobilis genetikai elemek családjai közül a legnagyobb számban fordul elő; közel egymillió kópiát találunk a humán genomban, mely annak körülbelül 11%-át teszi ki.<sup>180</sup> A repetitív Alu szekvenciák hozzávetőleg 300 nukleotid hosszúságúak, s a genomban mindenfelé megtalálhatók, valószínűleg a transzpozíciós aktivitás következtében. Az Alu

elemek számának növekedését amplifikációnak nevezik; ez folyamatos, becslések szerint a retropozíciós ráta 1/100-125 születés. Az amplifikáció ugyanis RNS-dependens módon, „retropozíció”-nak nevezett mechanizmussal történik. A folyamat során az RNS transzkriptum reverz transzkripcióval cDNS formába íródik át, és „másolás-beillesztés” („*copy-and-paste*”) mechanizmussal ékelődik a genomiális struktúrába. Az Alu szekvenciáknak strukturális, valamint funkcionális szerepet is tulajdonítanak a genomban, így feltételezik, hogy génexpressziót módosító szerepet játszanak például a sejtet ért stresszhatások kivédésekor, promóter funkciót hordoznak egyes szteroid hormon receptorok esetében, valamint hozzájárulnak a DNS javítás (*repair*) mechanizmushoz.<sup>181-183</sup> Egyes elméletek szerint a genom evolúciós fejlődésében is jelentős az Alu elemek hatása. Nagyszámú jelenlétük a genomban számos lehetőséget biztosít a szekvenciák közötti egyenlőtlen (*unequal*) homológ rekombinációra. Ezek az események gyakran intrakromoszómálisan jönnek létre, ezáltal exon deléciókat vagy duplikációkat okozva az adott génben. Interkromoszómális rekombináció következményeként még komplexebb kromoszóma-rendellenességek is kialakulhatnak. A direkt mutagén hatáson kívül az exonok közelébe ékelődött Alu elemekről feltételezik, hogy az RNS szerkesztést (intron kivágás, *splicing*) módosítva is okozhatnak betegséget. E szekvenciák közismerten előszeretettel vesznek részt rekombinációs eseményekben. A különböző Alu alcsaládok, melyeket Alu J, Alu Sx, Alu Sq, Alu Ya és Alu Yb néven ismerünk, körülbelül 70-80% homológiát mutatnak az Alu konszenzus szekvenciával. Az Alu szekvencia magját képező (ún. *Alu core sequence*) bázissorrendek kb. 79%-os egymás közti homológiával rendelkeznek. Jelen ismereteink szerint elsősorban e hasonlóság felelős a homológ és nem homológ rekombinációért.<sup>184</sup> Számos betegség molekuláris alapját képezik Alu-közvetített rekombinációs események; ilyen mechanizmust találtak a hemofília, alfa thalassaemia, Hunter-betegség, C3 komplement deficiencia vagy az X-hez kötött agammaglobulinaemia hátterében.<sup>185-187</sup>

4. *Deléció-specifikus PCR – a delExon1-3 csak a Kárpát-medencében fordul elő*

A deléció háttérben felismert Alu-közvetített rekombinációs esemény logikusan veti fel a kérdést: milyen gyakran fordul elő ez a rekombináció? Mi lehet az oka, hogy más populációban ezt a deléciót még nem írták le? Minthogy a heterozigóta deléció a szekvenálás számára gyakran rejtve marad, a populáció szűrésére más módszert kellett alkalmaznunk. Ezért töréspont-specifikus PCR-t fejlesztettünk ki. Ehhez azt a szerencsés helyzetet használtuk ki, hogy homozigóta és heterozigóta deléciós betegek is rendelkezésre álltak, akiknek DNS-ét pozitív kontrollként használhattuk. Az így megtervezett PCR termék normál VWF esetén egy 317 bp, delExon1-3 esetén egy 265 bp fragmens létrejöttét eredményezte (**11. ábra**).



**11. ÁBRA. Töréspont-specifikus PCR.** **A:** A normál és deléciós génekre tervezett PCR reakció sematikus ábrázolása. A multiplex PCR reakciót úgy terveztük, hogy közös reverz primert (R) használtunk, mely a normál forward primerrel (NF) 317 bp nagyságú PCR terméket eredményez, míg deléció jelenlétében a deléció-specifikus forward primerrel (DF) 265 bp nagyságú a termék. **B:** A deléció-specifikus PCR a gyakorlatban: a normál kontrollokban 317 bp termék keletkezik, homozigóta delExon1-3 betegben 265 bp, míg heterozigóta betegekben mindkettő jelen van.

Ezzel a technikával **megerősítettük a homozigóta és heterozigóta delExon1-3 jelenlétét betegeinkben.** Tehát Magyarországon összesen hét betegben találtunk nagy deléciót, 12 allélon, mely az összes 3-as típusú allélok 25%-át képezi. Öt betegben a mutáció homozigóta, két betegben kettős heterozigóta formában volt jelen más null allélokkal.



A beállított deléció-specifikus PCR segítségével összesen **175** (50 német, 117 orosz, 8 lengyel) 3-as típusú von Willebrand beteg mintáit szűrtük, azonban ilyen deléciót nem detektáltunk egyetlen mintában sem. E populációs szűréshez korábbi genetikai vizsgálatokba bevont betegek tárolt mintáit használtuk fel.<sup>88,188</sup> Végül egy másik nemzetközi vizsgálatunk (3WINTERS-IPS) keretében 213 európai és iráni beteg között csak a magyarországi betegekben találtunk delExon1-3-at<sup>170</sup>. Mindebből arra következtethetünk, hogy ez a rekombinációs esemény nem következik be gyakran. Ezt a következtetést tovább erősítette az a megfigyelés, hogy valamennyi vizsgált betegben a VWF gén haplotípusa a vizsgálható nukleotid polimorfizmusok (SNP) és a 40-es intron STR elemzése alapján azonos volt (**10. táblázat**). A két heterozigóta beteg közül a szülők genotipizálása csak a kettes családban volt lehetséges; az anyai oldalról

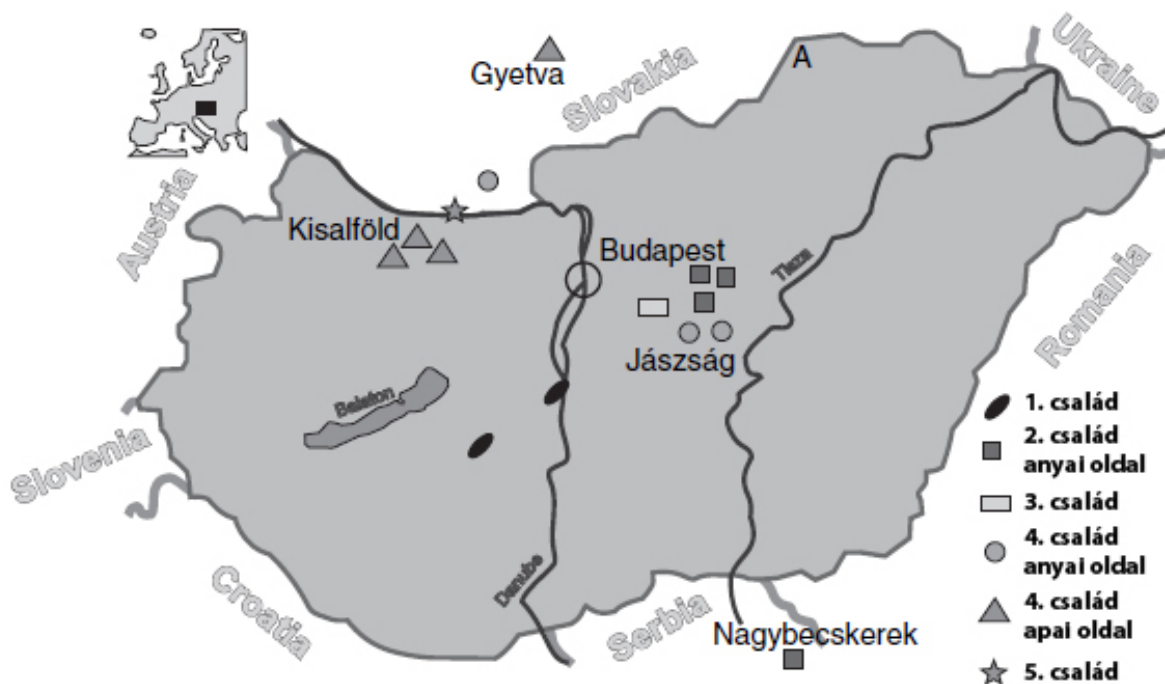
**10. TÁBLÁZAT. A 24 +1 hármastípusú VW beteg polimorfizmusokkal jellemzett genotípusa.**

Nukleotid szám	Allél	Frekvencia	Ex/In	Beteg sorszám																								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
c. 954	T/A	0.96/0.04	Ex.8	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	ND	T/T	T/T	T/A	T/T	ND	ND	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	
c. 998-27	T/C	0.93/0.07	Int.8	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	ND	T/T	T/T	T/T	ND	ND	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/C	
c. 1173	A/T	0.89/0.11	Ex.11	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	ND	A/A	A/A	A/T	A/A	ND	ND	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/T	
c. 1182	A/C	0.90/0.10	Ex.11	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	ND	A/A	A/A	A/C	A/A	ND	ND	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/C	
c. 1411	G/A	0.45/0.55	Ex.12	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	ND	G/G	G/G	G/G	G/G	ND	ND	G/G	G/G	ND	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/A	
c. 1451	A/G	0.43/0.57	Ex.13	A/G	A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	ND	A/G	A/G	G/G	G/G	ND	ND	G/G	G/G	G/G	A/G	A/G	A/G	A/A	A/A	A/G	A/G	
c. 1548	T/C	0.44/0.56	Ex.14	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	ND	T/C	C/C	C/C	C/C	ND	ND	C/C	C/C	ND	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	T/C	T/C	
c. 1626	G/A	?	Ex.15	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	ND	G/A	G/G	G/G	G/G	ND	ND	G/G	G/G	ND	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/A	
c. 2282-42	C/A	0.46/0.54	Int.17	C/C	C/A	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	A/A	A/A	C/A	C/C	C/C	A/A	C/A	A/A	C/A	A/A	
c. 2365	A/G	0.67/0.33	Ex.18	A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	A/A	A/A	A/G	G/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/G	A/A	
c. 2385	T/C	?	Ex.18	T/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	T/T	T/T	T/C	C/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/C	T/T	
c. 2546+25	C/T	0.33/0.67	Int.19	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	ND	T/T	C/T	C/T	T/T	ND	C/C	T/T	T/T	C/T	C/T	C/C	C/C	C/T	T/T	C/T	C/T	
c. 2555	A/G	0.08/0.92	Ex. 20	A/G	A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	ND	G/G	A/G	A/G	G/G	ND	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	G/G	A/G	G/G	G/G	G/G	G/G	
c. 2771	G/A	0.97/0.03	Ex.21	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	ND	G/G	G/G	G/G	G/G	ND	G/G	A/A	A/A	G/G	G/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	
c. 2880	G/A	?	Ex.22	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	ND	G/G	G/G	G/G	G/G	ND	A/A	G/G	G/G	G/A	G/A	G/G	G/G	G/G	G/A	G/G	G/A	
c. 3222+31	C/T	0.50/0.50	Int.24	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	ND	C/C	C/C	C/C	C/C	ND	T/T	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	
c. 3414	C/T	0.98/0.02	Ex. 26	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	ND	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	
c. 3675-75	A/G	0.55/0.45	Int.27	A/A	A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	ND	G/G	A/G	A/G	G/G	G/G	A/A	G/G	G/G	A/G	A/G	A/A	G/G	A/G	G/G	A/G	A/G	
c. 4141	A/G	0.50/0.50	Ex.28	A/A	A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	ND	G/G	A/G	A/G	G/G	G/G	A/A	G/G	G/G	A/G	A/G	A/A	G/G	A/G	G/G	A/G	A/G	
c. 4641	T/C	0.42/0.58	Ex.28	T/T	T/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	ND	C/C	T/C	T/C	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C	T/C	T/C	T/T	C/C	T/C	C/C	T/C	T/C	
c. 4665	A/C	0.64/0.36	Ex.28	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	ND	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/C	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	
c. 4693	G/T	?	Ex.28	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	ND	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/T	G/G	G/G	A/A	G/G	G/G	
c. 5277	C/T	0.98/0.02	Ex.30	C/C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C/C	ND	ND	ND	C/C	C/C	ND	ND	C/C	C/C	ND	C/C	C/C	C/C	
c. 5843-8	C/G	0.97/0.03	Int. 34	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	ND	C/C	C/C	C/C	C/C	ND	ND	G/G	G/G	ND	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	
c. 5844	C/T	0.50/0.50	Ex. 35	C/T	C/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	ND	C/C	C/T	C/T	C/C	ND	ND	C/C	C/C	ND	C/C	C/T	C/T	C/T	C/C	C/C	C/C	
c. 6532	G/T	0.99/0.01	Ex. 37	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	ND	G/G	G/G	G/G	G/G	ND	ND	T/T	T/T	ND	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	
c. 6846	A/G	0.92/0.08	Ex. 39	A/A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A/A	ND	ND	ND	A/A	A/A	ND	ND	A/A	A/A	ND	A/A	A/G	A/A	
c. 6976+856976+86	GT/delG	0.90/0.10	Int. 40	+/-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	++	ND	ND	ND	++	++	ND	ND	++	++	ND	++	++	++	
c. 7082-7	C/T	0.46/0.54	Int. 41	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	ND	T/T	T/T	T/T	T/T	ND	ND	C/C	C/C	ND	T/T	C/T	C/T	T/T	C/C	C/C	C/T	C/C
c. 7239	T/C	0.09/0.91	Ex. 42	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	ND	C/C	C/C	C/C	C/C	ND	ND	C/C	C/C	ND	C/C	T/C	T/C	C/C	C/C	T/C	C/C	C/C
c. 7549-59	A/C	0.01/0.99	Int. 44	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	ND	A/C	A/C	C/C	C/C	ND	ND	C/C	C/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	
c. 7771-13	C/T	0.97/0.03	Int. 46	C/C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	C/C	ND	ND	ND	T/T	T/T	ND	ND	C/C	T/T	ND	C/C	C/C	C/C	
c. 8113	G/A	0.94/0.06	Ex. 49	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	ND	G/G	G/G	G/G	G/G	ND	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	
c. 8116-20	A/C	0.77/0.23	Int. 49	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	ND	A/A	A/A	A/A	A/A	ND	ND	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	
c. 8155+50	C/T	?	Int. 50	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	ND	C/T	C/T	C/T	T/T	ND	ND	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	

A ritkán (<10%) előforduló polimorfizmusokat vastagon szedtem. Az öt homozigóta DelExon1-3 beteg sárgán, a két homozigóta intron kivágást érintő (splice site) mutációs (+p.R924Q) beteg zölden van kiemelve. A 25. beteg valójában 2A altípusú (IIC variáns; lásd szöveg).

öröklődött deléció haplotípusa itt is azonos volt. A másik heterozigóta beteg (akinek társuló mutációja a p.Q1898X volt) szüleit nem lehetett elérni a haplotípus analízis céljából, azonban

a genotípus allélmintázata nem zárja ki, sőt valószínűsíti, hogy ennek a betegnek a haplotípusa is azonos a többi betegével (10. táblázat). Mindez igen erősen ún. alapító hatásra („*founder effect*”) utal, azaz egyetlen alkalommal a múltban bekövetkezett delécióra, mely azután öröklődés révén terjedt el a populációban. Ezt még egy megfigyelés erősíti: eddig nem közölt adatok szerint ugyanezzel a deléció-specifikus PCR-rel szűrve az olaszországi 3-as típusú betegpopulációban (14 itáliai 3-as típusú VWB beteg) egy betegnél ki lehetett mutatni delExon1-3 mutációt kettős heterozigóta formában. Ez a beteg Temesváron született, és nevéből arra lehet következtetni, hogy magyar származású (Baronciani és Federici személyes közlése). Ki kell emelni, hogy a részletes haplotípus analízis az olaszországi beteg esetében is azonos haplotípust mutatott, tovább erősítve az alapító hatásra irányuló feltételezésünket.



**12. ÁBRA. A delExon1-3 földrajzi megoszlása az 1800-as évek közepén.** A genealógiai nyomozás azt mutatta, hogy az 1800-as évek közepén a mutáció egymástól távol álló területeken volt jelen, amiből következik, hogy a mutáció mindenképpen több mint néhány száz éves. Az 1-es, 3-as és 5-ös család ősei kis területre lokalizálható helyen éltek. A 2-es családban a genotipizálás szerint a mutáció az anyai oldalról származott. Egy kivétellel valamennyi ős a Jászságban lakott. A gén elhelyezkedésének valószínűsége: Jászság: 100%, Nagybecskerek: 6,25%. A 4-es családban az anyai oldalt két helyszínre lehetett visszavezetni (Jászság: 50%, Kisalföld: 50%), míg az apai oldal Észak-Magyarországról származik (Gyetva 50%, Kisalföld: 50%). Összesítve legalább három, egymástól távol álló területen volt jelen a mutáció.

### 5. Genealógiai elemzés

Ezután azt a kérdést tettük fel, hogy ez a bizonyos alapító hatás milyen régen jöhetett létre. E kérdés megközelítése érdekében az érintett családokban genealógiai vizsgálatot végeztünk: a hatból négy család rendelkezett részletes információval őseik születési dátumát és lakhelyét illetően, 3-5 generációra visszamenőleg egészen az 1800-as évek közepéig. Az 1-es család bizonytalan adatokkal rendelkezett, míg a 6-os család őseinek információi egyáltalán nem álltak rendelkezésre. Rokonzásra a 3-as és 5-ös családban derült fény; az egyik családban a szülők elsőfokú unokatestvérek voltak, a másik családban az anyai dédanya és az apai ükapa voltak testvérek. Ezen adatok alapján e négy (2–5-ös) család ősei legalább három (esetleg öt), földrajzilag egymástól távol lévő területre voltak visszavezethetők Magyarországon belül (**12. ábra**), mely határozottan arra utal, hogy a mutáció alapítása néhány száz évnél minden bizonnyal régebbi keletű.

### ***Korai stop kodont eredményező (nonszensz) és kereteltolódással járó (frameshift) mutációk jellemzése***

A magyar betegpopulációban (**8. táblázat**) összesen hét korai stop kodont eredményező (nonszensz) mutációt találtunk, tíz allélon. Ezek közül öt volt új mutáció, összesen hét allélnak megfelelően, melyek glutaminok, illetve szerinek kodonját változtatták stop kóddá: p.Q1238X (exon 28), p.Q1898X (exon 34), p.Q1931X (exon 34), p.S2505X (exon 44) és p.S2568X (exon 45). A két, korábban már leírt stop kód mutációra érzékeny arginin kodonoknál keletkezett: p.R1659X és p.R1853X.<sup>74</sup>

Hét olyan kereteltolódást okozó mutációt találtunk, melyek egy vagy két nukleotid elvesztéséből vagy hozzáadásából keletkeztek. Négy új mutációt találtunk öt allélon, melyek közül kettő inszerció volt: c.1993insC, c.5316incGA, kettő pedig delécio: c.3622delT és c.7333delG. A maradék három, korábban már leírt kis delécio közül a c.2124delCT-t és a c.2269delCT-t egy-egy betegben azonosítottuk.<sup>76,82</sup> Végül a fennmaradó kereteltolódással járó mutáció a nevezetes c.2435delC volt, melyet több európai populációban is ismétlődő mutációként írtak le. A magyarországi betegek között hat betegnél volt jelen. Öt beteg heterozigóta és egy beteg homozigóta volt erre a mutációra. A c.2435delC az összes hármas típusú allél 12,5%-át (6/48) képezte.

Ebből a csoportból két nevezetes beteget kell kiemelnünk. Az egyik a 14-es beteg, aki a c.3622delT kereteltolódáshoz vezető mutációt hordozta homozigóta formában. Ő az egyetlen beteg a magyarországi kohorszban, akinél VWF ellenes inhibitor alakult ki (lásd fent).

A másik nevezetes beteg a 25-ös beteg, aki kettős heterozigóta a gyakori c.2435delC és a p.C295S (exon 8) aminosavcserét eredményező misszensz mutációra. Ennek a betegnek klinikailag súlyos, recesszív öröklődésű VWB-e van, melyet a multimer analízis alapján 2A típusú (IIC variáns) VWB-nek tartunk. Ennek a betegnek az esetét alább részletesebben bemutatjuk a misszensz mutációkat elemző részben.

A fenti eredmények nem váratlanok. Mind a korai stop kodont eredményező nonszensz, mind a kereteltolódással járó mutációk gyakoriak voltak más populációkban is. Mindkettőből hét mutációt találtunk. Érdekes módon a hét korai stop kodont eredményező mutációból csak kettő érintette a mutációra érzékenynek ismert „hotspot” CGA kodont. A korábban ismételt több (holland, svéd, német, olasz és török) 3-as típusú VWB populációkban is leírt p.R2535X mutációt a magyar populációban nem tudtuk kimutatni.<sup>74</sup>

Valamennyi kis inszerció vagy delécio egy vagy két nukleotid beillesztésével vagy elvesztésével járt. A nevezetes, egy citozin elvesztésével járó c.2435delC mutáció, mely egyébként a Willebrand doktor által először vizsgált család és az első index beteg, Hjördis betegségét és halálát is okozta,<sup>45</sup> a Balti-tengert környező populációkban ismételt megtalálható. Magyarországon is jelen volt hat betegben az összes 3-as típusú allél 12,5%-át kiteve. Ennek a mutációnak a 3-as típusú VWF betegek között mért allélfrekvenciája Lengyelországban 75%, Svédországban 50%, Németországban 12,5% volt, míg Olaszországban csupán 2,5%.<sup>76,82</sup> Manapság sokak által elfogadott hipotézis szerint a mutáció valamikor egy ősi szláv baltikumai népességben jöhetett létre,<sup>76</sup> mely azután migráció révén terjedt el Európa-szerte (Schneppenheim, személyes közlés). A magyarországi c.2435delC betegek egy kivételével azonos SNP-eket hordoztak. A kivétel a 10-es beteg volt, akinek a 40-es intronban található VNTR polimorf helye más volt, mint a többi betegekben (**8. táblázat**). Ettől a kivételtől eltekintve a 10-es beteg SNP-i is megegyeztek a többi c.2435delC betegével. Ezek az adatok, a történelemből jól ismert német, lengyel és magyar populációk közötti keveredést és migrációt is tekintetbe véve, alátámasztják a fenti hipotézist. Magyarország földrajzi elhelyezkedése magyarázná a németországihoz hasonló c.2435delC frekvenciát Magyarországon. A 10-es betegben megfigyelt VNTR eltérés a VNTR-ek nagyobb mutációs rátájának, vagy esetleg egy rekombinációs eseménynek lehet köszönhető.

### ***Intron kivágódási helyet érintő (splice site) mutációk jellemzése***

Két beteg homozigóta volt a korábban már leírt c.3379+1G>A mutációra a 25-ös intron donor kivágódási helyén (*splice site*). Ez a mutáció a +1-es pozícióban változtatja meg a donor intron

kivágódási helyet. Igen valószínű, hogy ez a változás lehetetlenné teszi a normális intron kivágódást. A mutációt korábban több esetben is leírták.<sup>85,189,190</sup> A családi anamnézist ebben az esetben nem volt alkalmunk fölvenni, ezért a rokonházasságot sem kizárni, sem megerősíteni nem tudtuk.

Mindkét betegnél szintén azonosítottuk a p.R924Q homozigóta aminosav cserét a 21-es exonban. Ennek a mutációnak a szerepét több egészen friss vizsgálat is elemezte, ezért érdemes egy kis kitérőt tenni, hogy a magyar vizsgálatokkal napvilágra került adatok jelentőségét megérthessük.

***A p.R924Q mutáció hatásmechanizmusának felfedezése.*** A kitérő az 1-es típusú VWB genetikai hátteréhez vezet. Az elmúlt években három nagy multicentrikus tanulmány is készült az 1-es típusú VWB genetikai hátterének feltárására Európában, az Egyesült Királyságban és Kanadában. Mindhárom vizsgált populációban ismétlődött a p.R924Q aminosavcsere, ezért több munkacsoport is vizsgálni kezdte, hogy vajon mi módon okozhat 1-es típusú VWB-t ez a mutáció. A p.R924Q-t eredetileg 2N típusú mutációként írtak le<sup>191,192</sup> Azonban a rekombináns R924Q-VWF normál FVIII kötést mutatott, így ebben a típusban való kóroki szerepe nem igazolódott,<sup>192</sup> következésképpen benignus polimorfizmusnak tartották. Amikor kiderült, hogy ez a mutáció ismétlődő módon jelentkezik mindhárom 1-es típusú VWD populációban, ismét górcső alá vették a bioszintézisre való hatását,<sup>11,20</sup> ám kiderült, hogy a p.R924Q sem a VWF bioszintézisét, sem szekrécióját nem befolyásolja, hanem – heterozigóta formában – eddig ismeretlen mechanizmussal az alacsonyabb VWF szint markereként viselkedik.<sup>11,20</sup> Ezek az elemzések azt is feltárták, hogy a p.R924Q eltérést hordozó betegek VWF haplotípusa nagyban megegyezik, ami közös eredetre utal. Egyes kutatók kelet-európai eredetet tételeznek fel.<sup>20</sup> Mindkét homozigóta p.R924Q betegünk VWF haplotípusa pontosan egyezik mind az európai,<sup>20</sup> mind a kanadai<sup>11</sup> betegek között haplotípusával (**11. táblázat**). A táblázatban kiemelt c.7239 pozícióban található T/C polimorfizmus az egyetlen, ahol a p.R924Q betegek heterogenitását észlelték. A mi két homozigóta betegünk a Kanadában ritkább C variáns volt. Tudtommal a mi adataink megjelenése előtt a c.3379+1G>A intron kivágódási helyet érintő (*splice site*) mutációval való társulás nem volt ismert az irodalomban. Mindebből logikusan következik az a felvetés, hogy a p.R924Q világszerte megfigyelt hatása a VWF szintre nem másnak a következménye, mint annak, hogy a p.R924Q aminosavcsere egészen egyszerűen a c.3379+1G>A intron kivágódási helyet érintő (*splice site*) mutáció markereként szolgál, és a hatásért a mutáció a felelős. Ezt a hipotézist az európai és kanadai hatalmas beteganyag

könnyen lehet majd ellenőrizni (előzetes szóbeli információk megerősítették feltevésünket). A 15-ös és 16-os beteg esete szép példája annak, hogy egy megfigyelés hogyan fejthet meg tudományos rejtélyeket, és egyben alátámaszthatja a p.R924Q kelet-európai eredetét is, hiszen ezt az eltérést sem Nyugat-Európában, sem Kanadában nem figyelték még meg homozigóta formában.

E kitérő után beszélnünk kell másik két betegben észlelt új feltételezett intron kivágódási helyet érintő (*splice site*) mutációról a 15-ös intronban (c.1730-10C>A). A 22-es beteg homozigóta

**11. TÁBLÁZAT. A két p.R924Q polimorfizmusú beteg haplotípusának összehasonlítása az irodalmi adatokkal**

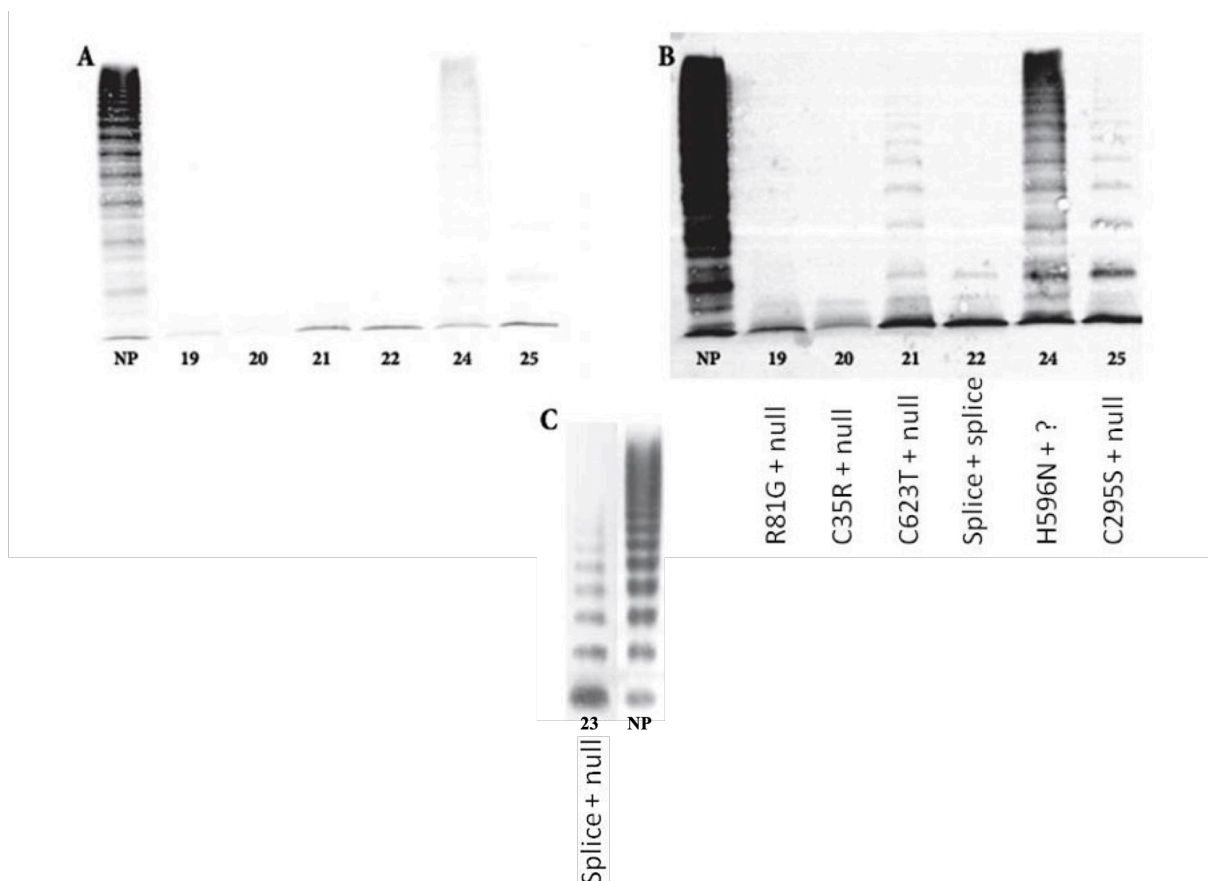
<i>Nucl. no.</i>	<i>Allél</i>	<i>Frekvencia</i>	<i>Ex/Int</i>	<i>Aminosav</i>	<i>15*</i>	<i>16*</i>	<i>Berber<sup>11</sup></i>	<i>Hickson<sup>20†</sup></i>	<i>Magyar 3-as t.<sup>38</sup></i>
c. 954	T/A	<b>0.96/0.04</b>	Ex.8	N/K 318	T/T	T/T	T (n=15/15)	N/A	T (43/44)
c. 1411	G/A	0.45/0.55	Ex.12	V/I 471	G/G	G/G	G (n=15/15)	G (8/8)	G (41/42)
c. 1451	A/G	0.43/0.57	Ex.13	H/R 484	G/G	G/G	G (n=15/15)	N/A	A (23/44)
c. 2365	A/G	0.67/0.33	Ex.18	T/A 789	A/A	A/A	A (n=15/15)	A (7/7)	A (43/50)
c. 2771	G/A	<b>0.97/0.03</b>	Ex.21	R/Q 924	A/A	A/A	A (n=15/15)	A (8/8)	G (46/50)
c. 4141	A/G	0.50/0.50	Ex.28	T/A 1381	G/G	G/G	N/A	G (7/7)	A (24/48)
c. 4641	T/C	0.42/0.58	Ex.28	T 1547	C/C	C/C	C (n=15/15)	N/A	T (24/48) C
c. 5843-8	C/G	<b>0.97/0.03</b>	Int.34		G/G	G/G	N/A	G (7/7)	C (38/42)
c. 5844	C/T	0.50/0.50	Ex.35	C 1948	C/C	C/C	N/A	C (7/7)	C (24/42) T
c. 6532	G/T	<b>0.99/0.01</b>	Ex.37	A/S 2148	T/T	T/T	N/A	N/A	G (38/42) T
c. 7239	T/C	<b>0.09/0.91</b>	Ex.42	T 2413	C/C	C/C	T (n=12) C	N/A	T (3/42) C
c. 7771-13	C/T	<b>0.97/0.03</b>	Int.46		T/T	T/T	N/A	N/A	C (14/20) T
c. 8116-20	A/C	0.77/0.23	Int.49		A/A	A/A	N/A	A (8/8)	C (4/44) A
c. 8155+50	C/T	0,87/0,13	Int.50		C/C	C/C	N/A	C (8/8)	T (9/44) C

\* A 15-ös és 16-os betegnél is homozigóta 3379+1 G>A intron kivágódási helyet érintő mutációt találtunk.

† Hickson és mtsai közleményében a számok családokra vonatkoznak, némelyik családban több beteg is volt. Az allél frekvencia adatok a sheffieldi adatbázisból származnak (<http://www.vwf.group.shef.ac.uk>). N/A: nem analizált. A magyar 3-as típusú betegcsoportban a számok allél frekvenciára vonatkoznak. Nem minden betegnél történt meg minden polimorfizmus analízise, ezért változik a nevező (max. 48).

volt erre a mutációra, míg a 23-as beteg kettős heterozigóta (a 34-es exon p.Q1931X mutációjával). Ez a valószínű mutáció 10 bázispár távolságra található az akceptor intron kivágódási helytől és három online elérhető intron kivágódási helyet (*splice site*) analizáló program közül kettő is azt jelezte, hogy helyes kivágódás a mutáció mellett nem jön létre, mivel egy új akceptor kivágódási hely keletkezik, és ennek következtében kereteltolódás alakul ki ([www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/), [www.fruitfly.org/seqtools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seqtools/splice.html), illetve lásd a GENESCAN honlapot – <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>, 2010. decemberi online eredmény). Bár messenger RNS vizsgálatot nem végeztünk, a két beteg hasonló fenotípusa és az azonos haplotípus alátámasztotta a mutáció patogenetikai szerepét, hozzátevé, hogy egyik betegnél

sem találtunk semmi más olyan mutációt, ami a 3-as típusú VWB fenotípusát megmagyarázhatta volna. E két betegben a VWF:Ag szint 3%, illetve 4% volt. A multimer gélen nyomokban lehetett detektálni kis molekulású VWF-et (**13.A és B ábra**). Ennek az lehet a magyarázata, hogy az intron kivágódásnak nem 100%-os megszakítása lehetővé teszi a két betegben található minimális mennyiségű VWF fehérje szintézisét, de nagyobb méretű multimerok már nem tudnak képződni. A 22-es és 23-as betegben található minimális mennyiségű diszfunkcionális fehérje jelenléte ellenére e betegeket 3-as típusú VWB-be soroltuk, a recesszív öröklődésment és az igen-igen alacsony VWF szint miatt. Hasonló gondolatmenetet követve soroltuk a 3-as típusba a 24-es beteget is, akinél nem találtunk egyértelmű genetikai magyarázatot a 3-as típusú VWB fenotípusára (lásd alább).



**13. ÁBRA.** A 3-as típusú VWB-ben időnként nyomokban fellelhető VWF multimer mintázata. Öt aminosavcsere eredményező (misszensz) + null alléllal kettős heterozigóta mutációval rendelkező beteg (19-21. és 24-25.), valamint két intron kivágódási helyet érintő (*splice site*) mutációs beteg (22. és 23.) multimer analízise. A 19. és 20. beteg a betegek többségéhez hasonlóan annak példája, amikor VWF nyomokban sem mutatható ki. A panel: A gél szokásos expozíciója (1.-25. beteg. B panel: Ugyanannak a gélnek túlexponálása során a nyomokban fellelhető VWF is láthatóvá válik. C panel: A 23. beteg túlexponált multimer analízise. Ezt a beteget nem tudtuk az A/B panelen látható gélen futtatni, mert már évek óta állandó szubsztitúción van. Egy évvel korábbi analízist mutat a C panel. NP: normál plazma.

***Aminosavcserét eredményező (misszensz) mutációk jellemzése***

Négy új aminosavcserét eredményező (misszensz) mutációt találtunk, mind a négyet kettős heterozigóta formában, valamely korai stop kodonnal járó (nonszensz) mutációval együtt. Érdekes módon valamennyi aminosavcsere a propeptid területén található, közülük három cisztein elvesztéséhez vezetett: p.C35R, p.C295S és p.C623T a 3-as, 8-as, illetve 15-ös exonokban. A negyedik, a p.R81G a 4-es exonban hozott létre Arg/Gly cserét. A négy beteg közül háromnak nyilvánvalóan 3-as típusú VWB-e volt 1% alatti VWF:Ag, és VWF:CB szintekkel, míg a 25-ös beteget, aki a p.C295R mutációt hordozta, utólag 2A (IIC variáns) VWB típusba kellett sorolnunk (részletesebben lásd alább).

A pontmutációt hordozó betegek közül LMWM nyomokban kimutatható volt a 21-es, 24-es és 25-ös beteg multimer géljein (**13. ábra**); ezek a betegek a p.C623T, H596N és a p.C295S pontmutációkat hordozták. A 19-es és 20-as beteg multimer géljén (R81G és C35R) VWF fehérjét nyomokban sem találtunk. Az intron kivágódási helyet érintő (*splice site*) mutációs 22-es és 23-as beteget fent már tárgyaltuk. A **13. ábrán** jól megfigyelhető, hogy a nyomokban jelen lévő VWF a legtöbb betegnél csak LMWM formában van jelen, melyekről tudjuk, hogy a hemosztázisban nem aktívak, így nem csoda, hogy ezek a betegek súlyosan vérzékenyek. Kivételnek látszik a 24-es beteg, akinél nagyobb molekulatömegű multimerek is jelen vannak. Őnála csak egy mutációt találtunk; esetét a következő fejezetben tárgyaljuk.

Külön tárgyalást érdemel a p.C623T mutációt hordozó 21-es beteg esete is. A p.C623 lokalizációjában korábban francia szerzők leírtak egy másik aminosavcserét. Goucher és munkatársai egy 2A típusú (IIC variáns, recesszív öröklődésmenettel) VWB betegről számoltak be, akinek VWF:Ag szintje 11% volt, VWF:RCo aktivitása pedig <1%. A beteg homozigóta volt a p.C623W (nukleotidcsere c.1869C>G) mutációra.<sup>193</sup> A multimer elemzés döntően dimerek jelenlétét mutatta néhány nagyobb molekulásúlyú multimer jelenléte mellett, a szatellita sávok teljes hiányában. A 21-es betegnél a p.C623T aminosavcsere kettős heterozigóta formában volt jelen egy null allállal nyilvánvaló 3-as típusú VWB fenotípust okozva; a beteg VWF:Ag szintje 1% volt, egészen elenyésző LMWM jelenléte mellett a multimer gélen (**13. ábra**). Azt kell feltételeznünk, hogy a 623-as pozíció ciszteinjének elvesztése nemcsak hogy gátolja a propeptid funkcióját, hanem az egész VWF alegység általános feltekeredés hibájához (*foldings*) is vezet. A fenti adatokból arra következtethetünk, hogy e hajtogatási hiba mértéke függ a cisztein helyére kerülő aminosavtól: kevésbé súlyos triptofán esetén, viszont lényegében teljes a treoninra való csere mellett. Talán arról van szó,



hogy a cisztein poláris aminosavra való cseréje a fehérje hajtogatására nagyobb hatással van, mint egy non-poláris aminosavra való csere.

A 25-ös beteg esetét is külön kell kommentálnunk. Őt, bár VWF:Ag szintje határeset (VWF:Ag: 6%; VWF:CB: 1%) volt, azért vettük be a vizsgálatba, mert recesszív öröklődésmentet mutató súlyos VWB-e volt, és korábban 3-as típusba sorolták egy olyan centrumban, ahol részletes elemzés nem állt rendelkezésre. Ennél a betegnél p.C295S propeptid aminosavcserét eredményező (misszensz) mutációt találtunk kettős heterozigóta formában a c.2435delC null alléllal. Az 5% feletti VWF:Ag koncentrációra és a multimer mintázatra való tekintettel utólag helyesebb a beteget a 2A típus IIC variánsai közé sorolni. Az eddig leírt IIC variánst okozó mutációk mind a propeptid D1-D2 doménjének területén találhatók, és azt feltételezzük, hogy akadályozzák a propeptid diszulfid izomeráz funkcióját, mely a multimerizáció nélkülözhetetlen kelléke a Golgiban. A szintén a D1 domén ciszteinjét érintő p.C295S az első olyan mutáció, mely a 8-as exonban található. Az eddigi mutációkat a 11, 12, 14 és 15-ös exonokban írták le.<sup>194,195</sup> A IIC variáns recesszív fenotípus, és a 25-ös beteg esete jól példázza azt, amit már a 21-es betegnél is láthattunk: néha a IIC variánst csak kevés választja el a 3-as típustól. Mindez aláhúzza azokat a nehézségeket, amelyekkel a gyakorló orvosnak szembe kell néznie a súlyos VWB diagnózisa és pontos osztályzása során.

### ***A 3-as típusú VWB genetikai alapja nem azonosítható***

A 24-es betegben nem találtunk olyan mutációt a VWF gén kódoló régióján belül, mely 3-as típusú VWB fenotípust egyértelműen magyarázta volna. Egyetlen heterozigóta báziscserét találtunk a 15-ös exonban, mely a p.H596N aminosavcseréhez vezetett. Ennek az eltérésnek a hatása bizonytalan; ebben a pozícióban eddig nem írtak le sem mutációt, sem polimorfizmust. (Megjegyezzük, hogy más lokalizációban a hisztidinről aszparaginra vagy glutaminra történő aminosavcsere kórokozó mutációk létrejöttéhez vezetett; ilyen mutációkat 2B és 2N típusú VWB okaként is találunk az adatbázisban – [www.vwf.goup.shef.ac.uk](http://www.vwf.goup.shef.ac.uk), 2010. novemberi adat). A teljes gén szekvenálása során számos SNP-t találtunk, melyek váltakozva homozigóta vagy heterozigóta formában voltak jelen, amely jelenséget összevetve azzal a ténnyel, hogy a géndózis analízis során normál értékeket kaptunk a 3-as exonra, arra a következtetésre juthatunk, hogy egy néma nagy deléción a *VWF* génben igen valószínűtlen. Mindazonáltal egy heterozigóta kisméretű deléciót, mely null allél kialakulásához vezethet, nem tudtunk teljes biztonsággal kizárni. Technikai problémák is vezethetnek ahhoz, hogy ne találjunk mutációt. Ennek minimalizálására két különböző primer párt alkalmaztunk minden egyes PCR termék

létrehozásához. Ezáltal annak az esélye, hogy egy SNP éppen a primer helyére esik, és megakadályozza az egyik allél amplifikációját, minimális volt. Elvi lehetőségként fölmerül, hogy valamely mutáció a *VWF* génen kívül tudna súlyos 3-as típusú betegséget okozni. Sajnálatos módon ennek a betegnek a családja nem volt elérhető, így *linkage*-analízist nem tudtunk végezni annak igazolására, hogy a fenotípus a *VWF* génhez kötötten öröklődik-e vagy sem. A betegnek a *VWF* antigén szintje 5% volt, és ennek megfelelően a multimer gélen nyomokban ki lehetett mutatni *VWF* fehérjét (**13. ábra**). A nyomokban található multimerek mintázata a 24-es beteg esetében eltér a többi beteg nyomokban talált multimer mintázatától (**13. ábra**), amennyiben a nagy molekulatömegű multimerek is képviselve vannak. Elvben ez alátámaszthatja azt a hipotézist, hogy egy a *VWF* génen kívüli erős negatív hatással állnánk szemben, mely kizárólag a fehérje termelésére hat, struktúráját egyáltalán nem befolyásolja.

**Összefoglalva:** vizsgálataink során lényegében a teljes 3-as típusú magyar von Willebrand beteg populáció genetikai hátterét feltártuk. A magyar beteganyag is rendkívül heterogénnek bizonyult genetikai szempontból, de érdekes módon a magyar populációban jelen volt egy addig még soha nem észlelt, ám hazánkban gyakorinak bizonyult nagy részleges deléció. A DelExon1-3 és a c.2435delC a 3-as típusú betegek alléljeinek 37,5%-áért felelős, ami akár genetikai tesztelést is lehetővé tesz ebben a betegcsoportban. Ezen kívül a fentiekben számos új mutációt írtunk le, melyek közül több is új ablakot nyitott a *VWF* biológiájára.

A „magyar 3-as típusú mutáció” létrejöttének hátterét kutatva kimutattuk, hogy azt alapító hatásként egy *Alu* rekombinációs esemény okozta, mely minden bizonnyal több száz évvel ezelőtnél régebben történt a magyar populációban.

Eredményeink megdöntötték azt a korábban dogmaként elfogadott álláspontot, hogy a nagy részleges deléciók egyöntetűen hordozzák az inhibitorképződés veszélyét, hiszen anyagunk az eddig egy kohorszba tartozó legnagyobb számú homozigóta részleges deléciót hordozó beteganyag, és egyetlen betegnél sem jelentkezett inhibitor. Ezeket az adatokat megerősítettük a 3WINTERS-IPS vizsgálatban is.

Végül adataink a 3-as típusú *VWB* patomechanizmusán túlmutatva az 1-es típusú *VWB* megértését is segítik. Két homozigóta intron kivágódási helyet érintő (*splice site*) mutációt hordozó betegünk elemzése rávilágított ugyanis, hogy a mostanában sok figyelmet kapott p.R924Q ennek az intron kivágódási helyet érintő (*splice site*) mutációnak a markereként függhet össze az alacsonyabb *VWF* szinttel.

## Egy izgalmas nyomozás: a VWF dimer diszulfid szerkezetének felgöngyölítése<sup>52</sup>

*Szerkezeti megfontolások: kiindulási pontként a CK fehérjecsaláddal való hasonlóság szolgált*

A normál hemosztatikus működéshez a VWF fehérjének először dimerizálnia, majd ezt követően multimerizálnia kell. Ezért érthető a von Willebrand faktor aminosav szekvenciájának az a különlegessége, hogy az N-terminális és a C-terminális régióban egyaránt halmozottan fordulnak elő ciszteinek. A cisztein a leggyakrabban előforduló aminosav a VWF fehérjében, melynek mintegy 8,36%-át teszi ki.<sup>196</sup> A vizsgálatok szerint valamennyi cisztein diszulfid kötésbe vonva alkotja a fehérjét,<sup>46</sup> amelyek egy része az alegységek között, más részük az alegységen belül képez hidat. Az endoplazmás retikulumba való kerülést követően a pro-VWF alegységek a C-terminális régióban kialakított diszulfid hidak révén dimerizálódnak. Ezek a „tail-to-tail” dimerek azután a Golgiba kerülnek, ahol további „head-to-head” diszulfid hidak képződnek az N-terminális régiók között. Így akár 20 millió daltont is meghaladó multimerek keletkeznek. E nagyméretű multimerek kialakulása kritikus lépése a szintézisnek, mert csak ezek a nagyméretű multimerek képesek hatékonyan szolgálni a vérlemezké-adhéziót.<sup>77</sup>

Munkánkat megelőzően a dimerizáció pontos helye és a C-terminális diszulfid híd struktúra ismeretlen volt. Rendelkeztünk részleges információkkal,<sup>46,47</sup> melyek szerint a VWF C-terminális proteolitikus töredéke dimer szerkezetű,<sup>46</sup> és az is ismert volt, hogy az utolsó 151 aminosav dimer formájában szintetizálódik egy COS sejtes rendszerben.<sup>47</sup> Következésképpen az utolsó 151 aminosav között szereplő 15 cisztein között kellett keresnünk azt (azokat), mely (melyek) a dimerizáció diszulfid hídját (hídjait) alkotja (alkotják). Az utolsó 87 aminosav (a jelenleg elfogadott nomenklatúra szerinti számozással a 2724–2811 számúak) a cisztin csomó fehérjecsaláddal való homológia alapján *cisztin csomót* képez (melyet az angol „cystine knot” elnevezésből CK-val rövidítünk). A CK fehérjecsalád több tagja is dimer szerkezetű, bár a dimerizáció módja nem teljesen egységes.<sup>197</sup>

A VWF CK doménje 11 ciszteint tartalmaz, és nagyon sok hasonlóságot mutat több epiteliális mucinnal és a norrinnal (*Norrie Disease Protein*), amelyek mind a C-terminális CK doménjeik segítségével képeznek oligomereket.<sup>6,9,23</sup> E fehérjék vizsgálata azt sugallja, hogy bizonyos ciszteineknek filogenetikusan konzervált szerepe lehet a dimerizáció létrejöttében. Ezt a következő példák illusztrálják: a norrinban a VWF C2773-nak megfelelő C95 cisztein

mutációja (C95A) meggátolja a rekombináns norrin oligomerizációját.<sup>198</sup> A sertés szubmaxilláris mucin (*porcin submaxillary mucin*, PSM) C13244 és C13246 ciszteinjei a VWF C<sup>2771</sup> és C<sup>2773</sup> ciszteinjeinek felelnek meg. E ciszteinek külön-külön történő mutációja (C13244A és C13246A) jelentősen csökkentette, bár teljes egészében nem függesztette fel a rekombináns PSM CK doménjének dimerizációját.<sup>199</sup> Végül a kísérletes vizsgálatok megtervezéséhez további értékes információt szolgáltatottak azok a fentebb részletezett közlemények, melyek kiderítették, hogy a von Willebrand kór 2A altípusának a dimerizáció zavara által okozott IID variánsát a CK domén mutációi okozzák.<sup>69-71</sup>

A fenti adatok alapján a VWF „tail-to-tail” dimerizációját alkotó diszulfid hidak lokalizációja a CK doménon belül többféleképpen is elképzelhető, és a valós szerkezetre vonatkozó kísérletes adattal nem rendelkezünk. Ezért olyan kísérletsorozatot terveztünk, amely részleges redukció és alkilálás, kémiai és enzimés emésztés, tömegspektrometria és aminosav-szekvenálás segítségével térképezi fel a VWF CK domén szerkezetét.

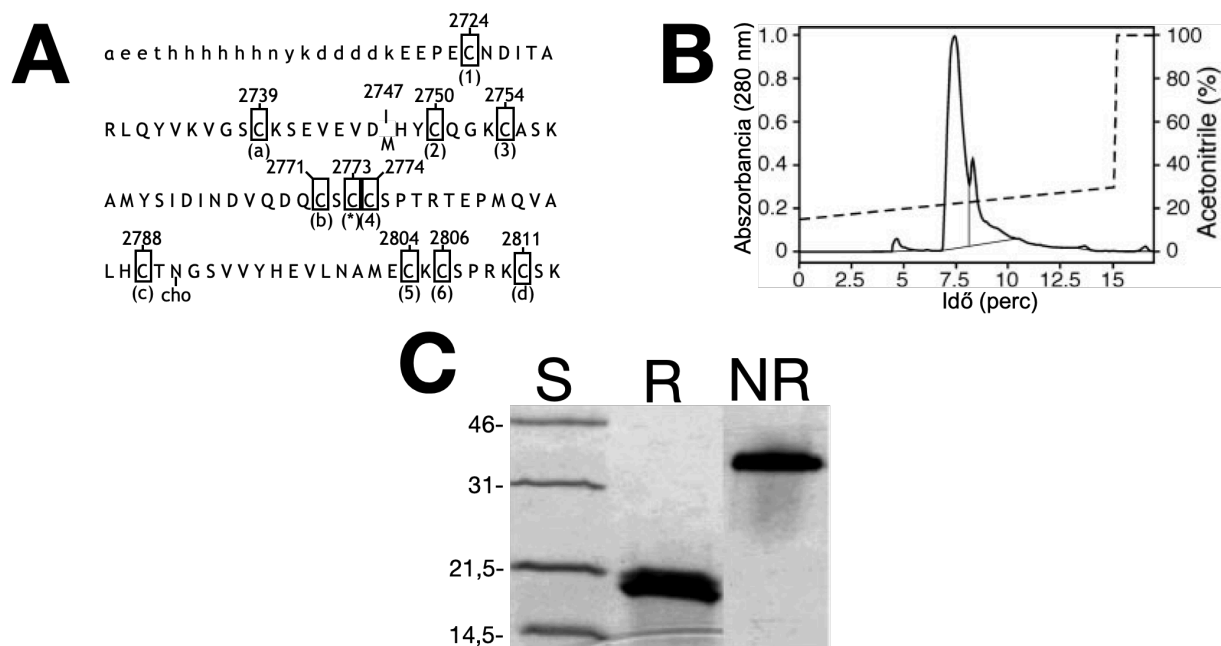
Ezt a kísérletsorozatot úgy kell elképzelni, mint egy kirakós játékot: először nagyobb darabokra szedjük szét (emésztés), majd ezeket a darabokat kisebb, közepes méretű részekre bontjuk (részleges redukció) úgy, hogy az összetartozó részeket megjelöljük egy bizonyos „színnel” (alkilálás NEM-mel), majd még kisebb részekre szedjük szét (teljes redukció) és a kapcsolódási helyeket egy másik „színnel” jelöljük (alkilálás 4VP-vel). Az egészen apró darabokat tömegspektrometria és szekvenálás révén azonosítjuk. Az összerakás így a „színek” segítségével egyszerű logikai feladattá válik.

### ***A munka során használt rekombináns VWF CK domének jellemzése***

Korábbi munkákból ismert volt, hogy a VWF C-terminális 151 aminosava tartalmazza azokat a ciszteineket, amelyek az endoplazmás retikulumban a dimer kötésért felelősek.<sup>46,47</sup> Az utolsó ~90 aminosav, amint arra már fentebb is utaltunk, homológ a más fehérjékben előforduló CK doménnel, amelyek gyakran szintén dimerizálódnak.<sup>197,200</sup> Szerkezetük közelebbi megismerésének céljából ezen analógiák felhasználásával olyan polipeptideket terveztünk, amelyek a VWF CK doménjét tartalmazták (**14. A ábra**). A *VWFCK* konstrukció a VWF szignál peptidből és a propeptid négy aminosavából áll (A prepro-VWF 1-26. aminosava), melyet hat hisztidin követ egy enteropeptidáz hasítási hellyel (NYKDDDDK), majd a VWF C-terminális 94 aminosava következik (2720-2813 aminosavak). A *VWFCKM* konstrukció hasonló, azzal az eltéréssel, hogy a 2747-es izoleucint (Ile) metioninra (Met) változtattuk célzott mutáció segítségével, megkönnyítendő a CNBr hasítás révén történő elemzést. Azért

választottuk ezt az aminosavcserét, mert az e pozícióval homológ helyén számos epiteliális mucin CK doménje metionint tartalmaz,<sup>200,201</sup> így várható volt, hogy ez a csere nem lesz gyökeres hatással a fehérje globális szerkezetére.

A *VWFCK*-t és *VWFCKM*-et baculovírus rendszerben expresszáltuk, majd affinitás kromatográfiával Ni-NTA agaróz oszlopon tisztítottuk RP-HPLC segítségével. A *VWFCK* esetében a végső lépésben egy nagy és egy kisebb csúcsot kaptunk (**14. B ábra**). A nagyobb csúcsot SDS-PAGE elektroforézissel elemeztük, mely egyetlen 34 kDa sávot mutatott (**14. C ábra**). Redukáló körülmények között a sáv 20 kDa-ig tolódott el, jelezve, hogy a *VWFCK* diszulfid híddal összekötött homodimer. A *VWFCKM* esetében hasonló eredményre jutottunk (itt nem mutatom), tehát konstrukciónk dimer szerkezete alátámasztja, hogy a VWF CK doménjének C-terminális szakasza (utolsó 94 aminosav) dimerizációs egységként működik.

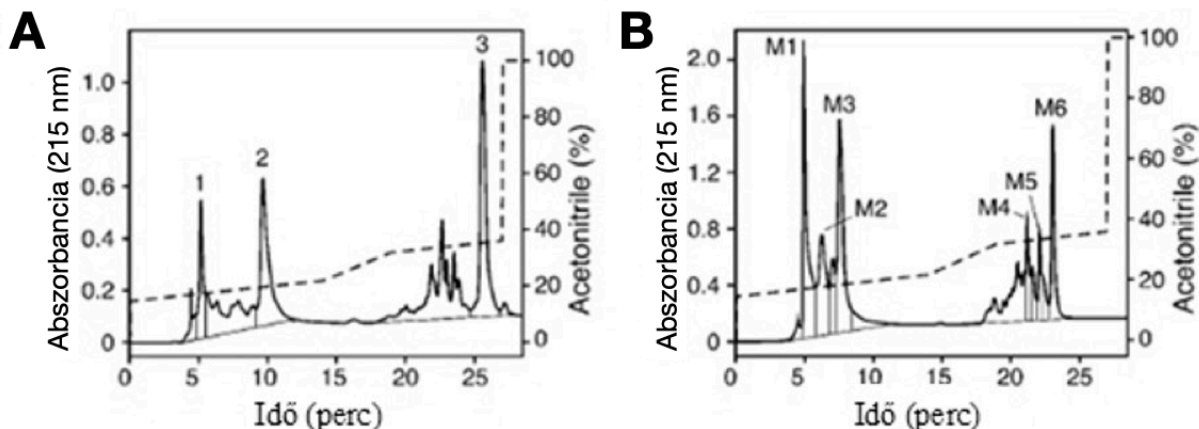


**14. ÁBRA. A rekombináns VWF CK domain dimerek jellemzése.** A: A szekretált *VWFCK* és *VWFCKM* proteinek aminosav sorrendje. A *VWFCK* a 2747-es pozícióban izoleucint, a *VWFCKM* pedig metionint tartalmaz. A VWF propeptidjének N-terminális része, a (His)<sub>6</sub> toldalék és az enteropeptidáz hasítási helye *kisbetűvel* van szedve. A ciszteinek be vannak *keretezve*, és pozíciójukat számmal jelöltük. Azt a hat ciszteint, mely valamennyi CK doménben konzervált pozícióban van jelen, a szekvencia alatt *zárójelben 1-6-ig* terjedő számokkal jelöltük. Azt a ciszteint, mely a TGF- $\beta$  család dimer szerkezetű tagjaiban az alegységek közötti diszulfid hidat adja, *csillag (\*)* jelöli. *Betűvel (a-d)* jelöltük azt a négy ciszteint, mely a VWF-ben, a norrinban és az epiteliális mucinokban jellegzetes lokalizációban található. Az N-glikoziláció helyét is megjelöltük (*cho*). B: HPLC tisztítás. A *VWFCK*-t tartalmazó egyesített Ni-NTA-agaróz frakciókat vizes fázisú 0,1% trifluoecetsavban vittük fel C8 oszlopra, ahonnan acetonitril grádienssel eluáltuk. A *folyamatos vonal* az eluátum 280 nm-en mért abszorbanciáját jelöli. A szaggatott vonal az acetonitril %-os arányát jelzi. C: A *VWFCK* SDS-PAGE analízise. A fő HPLC csúcsból származó, a *VWFCK*-t tartalmazó mintát SDS-PAGE gélelektroforézissel elemeztük 2,5% 2-merkaptóetanollal történő redukció (*R*) mellett, vagy redukció nélkül (*NR*). A gél Coomassie kékkel festettük. Az első sáv standard fehérjéket (*S*) tartalmaz, melyek molekulatömege a *bal oldalon* van jelölve.

Meghatároztuk a tisztított *VWFCK* és *VWFCKM* N-terminális aminosav szekvenciáját (AEETHHHHHHNYKDDDDK), ami azt mutatta, hogy a szignál peptid lehasítása a megfelelő helyen történt a várt Cys-Ala kötés bontásával. A tömegspektrometriás eredményekből látható, hogy az ép dimer szerkezetű *VWFCK* molekulatömege 27713,2 Da (**12. táblázat**), a várt 25729,2 Da-nal szemben. Az 1984 Da-os különbség az Asn<sup>2790</sup> pozícióban létrejött glikozilációnak köszönhető, mivel TFMS-el történő deglikozilálás után a *VWFCK* tömege 25929,4 Da-ra csökkent, ami megfelelően közel áll a várt értékhez. Teljes redukció és NEM-mel történő alkilálás után a *VWFCK* molekulatömege 15269,9 Da lett, ami 11,2 cisztein alegységenkénti módosítást jelent (1 Da/redukált Cys + 125,1 Da NEM-mel történő alkilálásonként), ami jól illeszkedik az elméletileg várt 11 ciszteinhez. A *VWFCKM* elemzése hasonló eredményeket hozott; a dimer szerkezetű *VWFCKM* tömege 27771,9 Da volt (**12. táblázat**), míg a redukált és alkilált monomer 15294,8 Da lett.

***Monomer VWF CK domének előállítása részleges redukcióval és alkilálással – az alegységek közötti diszulfid hidak száma***

A diszulfid kötések megfejtésének első lépése a részleges redukció volt, amit a módszerekben leírtak szerint TCEP-pel végeztünk. Ennek során monomereket kaptunk (**12. táblázat**), tehát biztosak lehettünk benne, hogy az alegységek közti valamennyi hidat bontottuk. A TCEP pH 4,6 mellett aktív, és ez az alacsony pH gátolja a diszulfid hidak újrendeződését, amely egyébként a redukció közben előfordulhatna.<sup>202,203</sup> A NEM pH 4,6 mellett jól használható a tiolok alkilálására<sup>158</sup>, és a TCEP és NEM együttes használata 4,6-os pH mellett elkerülhetővé tette a fehérje lúgos közegbe való kerülését, amely a diszulfid szerkezet megváltozásának veszélyével járt volna. A NEM-alkilálás részben a létrejött részlegesen redukált termék stabilitását biztosította, részben tömegspektrometria számára jól elkülöníthetően jelölte meg a redukált ciszteineket. Ugyanis a NEM-alkilálás S-ethylsuccinimidocystein (**ES-Cys**) létrejöttéhez vezet (melyet a **13.-17. táblázatokban** és a szövegben kék színnel szinkódoltam), szemben a 4VP-alkilálás S-pyridylethylcystein (**PE-Cys**, piros színek) végtermékével. Az egybetűs aminosav sorokban a félreértések elkerülése érdekében a **C<sub>e</sub>** (=ES-Cys) és **C<sub>p</sub>** (=PE-Cys) jelölést alkalmaztam. A részleges redukciós kísérletek különböző mértékben redukált termékek elegyéhez vezetnek, melyeket egymástól RP-HPLC segítségével szeparáltunk (**15. ábra**) az elemzés (**12. táblázat**) számára. A *VWFCK* részlegesen redukált termékelegyének RP-HPLC-vel való analízise három fő csúcsot eredményezett több elhanyagolható kisebb csúcs mellett (**15. A ábra**).



**15. ÁBRA.** A részlegesen redukált és NEM-mel módosított VWF CK domének HPLC szeparálása. **A:** A VWFCK mintát a „Módszerek” alatt részletezett módon részlegesen redukáltuk TCEP-pel és alkiláltuk NEM-mel. Az így módosított proteint RP-HPLC-n, C4 oszlopon szeparáltuk 0,1% vizes fázisú trifluorecetsavban, majd acetonitril grádiensben eluáltuk. A folyamatos vonal az eluátum 215 nm-en mért abszorbanációját mutatja, míg a szaggatott vonal az acetonitril %-os arányát jelöli. A kapott fő csúcsokat VWFCK-1, VWFCK-2 és VWFCK-3-ként jelöltük, melyek számozását az ábra mutatja. **B:** A VWFCKM azonos analízise. A VWFCK-M1-VWFCK-M6 csúcsok számozását itt is feltüntettük.

Az egyes csúcsokban a redukált és alkilált diszulfid hidak számát tömegspektrometriával állapítottuk meg (12. táblázat). A NEM-VWFCK-1 tömege hasonló volt az érintetlen dimeréhez, ami azt igazolja, hogy a VWFCK valóban nem tartalmaz szabad ciszteineket (különben azok ES-Cys formában lettek volna jelen). A NEM-VWFCK-3 tömege azt mutatta, hogy ez a csúcs olyan monomereket tartalmaz, melyekben mind a 11 ciszteint redukáltuk és alkiláltuk. A NEM-VWFCK-2 tömege 391 Da eltérést mutatott a redukálatlan alegységhez képest, ami három cisztein NEM-mel történő modifikálásának felel meg. Hasonló következtetésre jutunk, ha a NEM-VWFCK-2 tömegét a teljesen redukált és alkilált, 11 modifikált ciszteint tartalmazó VWFCK tömegéhez (15269,9 Da) hasonlítjuk. A különbség (1022,3) 8,1-del kevesebb cisztein alkilálásának felel meg. Minthogy a NEM-VWFCK-2 monomer szerkezetű, mindez arra utal, hogy az alegységek közötti diszulfid hidak száma háromnál nem lehet nagyobb.

A VWFCKM kísérletei hasonló eredményre vezettek. A részlegesen redukált és alkilált termék RP-HPLC-vel való szeparálása három apró és három nagy csúcsot adott (15. B ábra). A tömegspektrometriás elemzés (12. táblázat) azt mutatta, hogy a NEM-VWFCK-M1 tömege (27771,9 Da) igen közel állt a módosítatlan VWFCKM tömegéhez (27786,3), vagyis szabad

12. TÁBLÁZAT. A *VWFCK* és *VWFCKM* termékek tömegspektrometriás vizsgálata.

<i>Minta</i>	<i>Mért tömeg</i>	<i>A módosítatlan monomertől való eltérés</i>	<i>Az alkilált ciszteinek száma alegységenként</i>	<i>A monomerekben fennmaradt diszulfid hidak száma</i>
	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>		
<b><i>Módosítatlan VWFCK dimer</i></b>	27713,2	(0)	(0)	
<i>NEM-VWFCK-1</i>	27721,6	8,4	0	
<i>NEM-VWFCK-2</i>	14247,6	391	3,1	4
<i>NEM-VWFCK-3</i>	15259,1	1402,5	11,1	0
<b><i>Módosítatlan VWFCKM</i></b>	27786,3	(0)	(0)	
<i>NEM-VWFCK-M1</i>	27771,9	-14,4	0	
<i>NEM-VWFCK-M2</i>	28029,7	243,4	1,0	5 (DIMER)
<i>NEM-VWFCK-M3</i>	14281,4	388,2	3,1	4
<i>NEM-VWFCK-M4<sup>a</sup></i>	14794,6	901,4	7,1	2
	15042,1	1148,9	9,1	1
<i>NEM-VWFCK-M5</i>	14793,5	900,3	7,1	2
<i>NEM-VWFCK-M6</i>	15292,3	1399,1	11,1	0

A TCEP-pel történő részleges redukció és NEM-mel történt alkilálás termékeit RP-HPLC segítségével szeparáltuk (15. ábra), és az egyes csúcsokból nyert frakciókat tömegspektrometria segítségével elemeztük. A redukció+alkilálás következtében a tömeg növekménye 1 Da (redukció) + 125,1 Da alkilálás NEM-mel), összesen 126,1 Da. A módosítatlan monomer tömegét a módosítatlan dimer tömege felének vettük, ami a *VWFCK* esetében 13856,6, a *VWFCKM* esetében 13893,2-nek adódott. Az alkilált ciszteinek száma monomerenként vagy dimerenként = (mért tömeg – módosítatlan tömeg)/126,1.

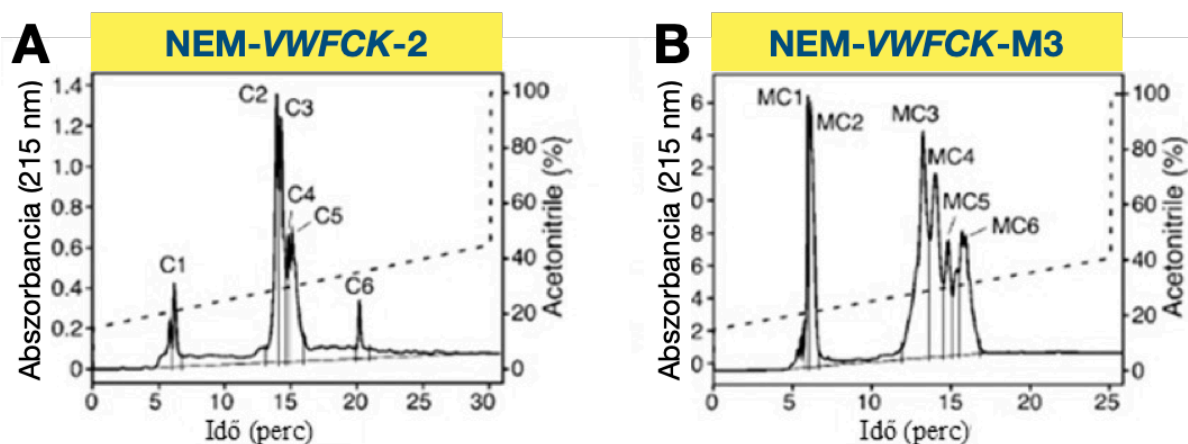
<sup>a</sup> *NEM-VWFCK-M4* frakció két különböző molekulát tartalmazott a jelölt tömegekkel *m/z* a tömegspektrometriában a tömeg/pozitív töltés. Minthogy  $z=1$ , az *m/z* a mért vegyület tömege.

ciszteint nem tartalmazott. A *NEM-VWFCK-M6* tömege (15292,3 Da) megfelelt a független kísérletben preparált teljesen redukált és alkilált *VWFCKM* tömegének (15294,8 Da), vagyis ez az utolsó csúcs tartalmazza a teljesen redukált és alkilált monomert. A monomer szerkezetű *NEM-VWFCK-M3* tömege (14281,4 Da) három cisztein alkilálásának felelt meg. A fennmaradó csúcsok tömegeik alapján szintén egész számú redukált és alkilált ciszteineknek tartalmaztak (12. táblázat). Így tehát a *VWFCK* és *VWFCKM* konstrukciókkal azonos eredményre jutottunk, mely szerint három vagy annál kevesebb alegység közötti diszulfid híd tartja össze a dimert. Ez logikusan azt jelenti, hogy a **kötések száma vagy 1, vagy 3**, hiszen az intramolekuláris kötésben lévő ciszteinek bontása természetesen páros számú cisztein redukációjához vezet.



### A potenciális alegységek közötti diszulfid hidak elhelyezkedése

Az alegységek közti diszulfid hidak azonosításához a legalkalmasabbnak a legkevésbé redukált termék, a NEM-*VWFCK-2* további vizsgálata látszott. Fennmaradó diszulfid hidait is



**16. ÁBRA.** A VWF CK domén monomerek részlegesen redukált és alkilált termékeinek CNBr hasítás utáni HPLC szeparálása. A: A NEM-*VWFCK-2* frakciót teljesen redukáltuk és 4VP-vel alkiláltuk. Sómentesítést követően a mintát CNBr-dal hasítottuk, és RP-HPLC-n C18 oszlopon szeparáltuk 0,1% vizes fázisú trifluoecetsavban, a „Módszerek” alatt leírtak szerint. A folyamatos vonal az eluátum 215 nm-en mért abszorbanciáját mutatja. A szaggatott vonal az acetonitril %-os arányát jelzi. A C1–C6 csúcsokat aminosav szekvenálással elemeztük tovább (13. táblázat). B: A NEM-*VWFCK-M3* azonos analízise. Az MC1–MC6 csúcsok aminosav sorrendjét a 14. táblázatban mutatjuk.

bontottuk teljes redukció révén, majd az újonnan felszabadult ciszteineket 4VP-vel alkiláltuk. Ezután az alkilált polipeptidet CNBr-dal hasítottuk, hogy aminosav-szekvenálás számára alkalmas méretű fragmenseket kapjunk (a CNBr a metioninek után hasít). A keletkezett peptideket RP-HPLC-n választottuk szét (16. A ábra). Az 1-5 csúcsokból származó aminosav-szekvenciát a 13. táblázat tartalmazza. A hatos csúcs nem tartalmazott aminosavakat. Mind a négy várható CNBr hasítási terméket valóban megfigyelhettük. A Cys<sup>2771</sup> Cys<sup>2773</sup> és Cys<sup>2811</sup> ciszteineket csak *ES-Cys*-ként, tehát az első részleges redukciót követő NEM-alkilálás termékeként detektáltuk. Mivel ez a termék monomer volt, e három cisztein közül egy vagy mindhárom felelős a dimer képződésért. Ezzel szemben a Cys<sup>2724</sup>, Cys<sup>2774</sup>, Cys<sup>2788</sup>, Cys<sup>2804</sup> és Cys<sup>2806</sup> ciszteineket kizárólag *PE-Cys*-ként, vagyis a második bontás utáni 4VP alkilálás termékeként azonosítottuk. A fennmaradó három cisztein, a Cys<sup>2739</sup>, Cys<sup>2750</sup> és Cys<sup>2754</sup>, legalább 33 aminosavnyi távolságban van az illető peptid N-terminusától; ezeket nem szekvenáltuk.

**13. TÁBLÁZAT. A NEM-VWFCK-2 CNBr hasítással és 4VP alkilálással létrehozott termékeinek aminosav szekvenciái.**

<i>Minta</i>	<i>Aminosav sorrend</i>	<i>ES-Cys pozíció</i>	<i>PE-Cys pozíció</i>
<b>C1</b>	E <sup>2803</sup> -C <sub>p</sub> -K-C <sub>p</sub> -S-P-R-K-C <sub>e</sub> -S-K <sup>2813</sup>	2811	2804, 2806
<b>C2</b>	[Q <sup>2783</sup> ]-V-A-L-H-C <sub>p</sub> -T <sup>2789</sup>		2788
<b>C3</b>	A-E-E-T-H-H-H-H-H-H-N-Y-K Q <sup>2783</sup> -V-A-L-H-C <sub>p</sub> -T-[N]-G-S-V-V-Y <sup>2795</sup> Y <sup>2760</sup> -S-I-D-I-N-D-V-Q-D-Q <sup>2770</sup>		2788
<b>C4</b>	A-E-E-T-H-H-H-H-H-H-N-Y Q <sup>2783</sup> -V-A-L-H-C <sub>p</sub> -T-[N]-G-S-V-V-Y-H-E-V-L-N-A <sup>2801</sup> Y <sup>2760</sup> -S-I-D-I-N-D-V-Q <sup>2768</sup>		2788
<b>C5</b>	Y <sup>2760</sup> -S-I-D-I-N-D-V-Q-D-Q-C <sub>e</sub> -S-C <sub>e</sub> -C <sub>p</sub> -S-P-T-R-T-E-P <sup>2781</sup> A-E-E-T-H-H-H-H-H-H-N-Y-K*-D-D-D-D-K-E <sup>2720</sup> -E-P-[E]-C <sub>p</sub> <sup>2724</sup>	2771, 2773	2774 2724

A NEM-VWFCK monomert CNBr-dal hasítottuk, majd RP-HPLC-n szeparáltuk (**16 A ábra**), majd meghatároztuk a csúcsonak megfelelő frakciók aminosav sorrendjét. Ce jelöli az S-ethylsuccinimidocysteinek (ES-Cys), és Cp az S-pyridylethylcysteinek (PE-Cys) helyét. A zárójelbe [...] tett gyököket nem azonosítottuk; ezek helyét a VWF ismert szekvenciája alapján ismerjük. A kitevőben feltüntetett számok a VWF-ben lévő pozíciót jelölik.

A NEM-VWFCK-M3 termékkel végzett hasonló kísérletek (**14. táblázat**) megerősítették, hogy a Cys<sup>2771</sup>, Cys<sup>2773</sup> és Cys<sup>2811</sup> ciszteinek csak **ES-Cys**-ként, míg a Cys<sup>2724</sup>, Cys<sup>2774</sup>, Cys<sup>2788</sup>, Cys<sup>2804</sup> és Cys<sup>2806</sup> ciszteinek csak **PE-Cys** formájában vannak jelen. Ezen túlmenően a Cys<sup>2750</sup> és Cys<sup>2754</sup> pozíciókban is kizárólag **PE-Cys** volt kimutatható (**14. táblázat**). Az a tény, hogy **ES-Cys**-t kizárólag a fenti három pozícióban találtunk, egyértelműen bizonyítja, hogy a dimerizációt e három cisztein (Cys<sup>2771</sup>, Cys<sup>2773</sup> és Cys<sup>2811</sup>) közül hozza létre egy vagy három, míg az összes többi cisztein alegységen belüli kötésben van.

**14. TÁBLÁZAT. A NEM-VWFCK-M3 CNBr hasítással és 4VP alkilálással létrehozott termékeinek aminosav szekvenciái.**

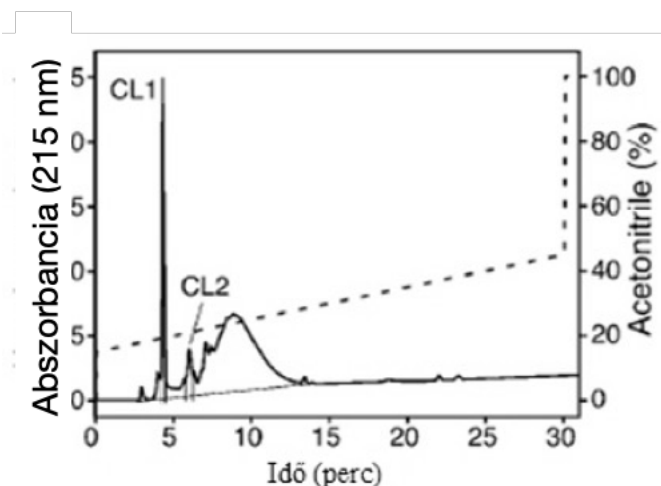
<i>Minta</i>	<i>Aminosav sorrend</i>	<i>ES-Cys pozíció</i>	<i>PE-Cys pozíció</i>
<b>MC1</b>	E <sup>2803</sup> -C <sub>p</sub> -K-C <sub>p</sub> -S-P-R-K-C <sub>e</sub> -S-K <sup>2813</sup> H <sup>2748</sup> -Y-C <sub>p</sub> -Q-G-K-C <sub>p</sub> -A-S-K-A <sup>2758</sup>	2811	2804, 2806 2750, 2754
<b>MC3</b>	A-E-E-T-H-H-H-H-H-H-N-Y-K-K-D-D-D-D-K-E <sup>2720</sup> -E-P-[E]-C <sub>p</sub> -N-D <sup>2726</sup> Q <sup>2783</sup> -V-A-L-H-C <sub>p</sub> -T-[N]-G-S-V-V-Y-H-E-V-L-N-A <sup>2801</sup> Y <sup>2760</sup> -S-I-D-I-N-D-V-Q-D-Q-C <sub>e</sub> -S-C <sub>e</sub> -C <sub>p</sub> -S-P-T-R-T-E-P <sup>2781</sup>	2771, 2773	2774 2724 2788

A NEM-VWFCK-M3 monomert CNBr-dal hasítottuk, majd RP-HPLC-n szeparáltuk (**16 B ábra**), majd meghatároztuk a csúcsonak megfelelő frakciók aminosav sorrendjét. A jelölések a **13. táblázat**ban leírtakkal megegyezők. Az MC2 csúcs az MC1-gyel azonos szekvenciákat szolgáltatott, míg az MC4, MC5 és MC6 csúcsok szekvenciái az MC3-mal egyeztek meg.

A Cys<sup>2739</sup> alkilálóját ebben a kísérletsorozatban nem sikerült megállapítani, mivel túl messze volt a CNBr hasítási peptid N-terminusától ahhoz, hogy a szekvenálás során észlelni lehessen. Ezért ennek az aminosavnak a diszulfid szerkezetben való részvételét a redukálatlan *VWFCK* és *VWFCKM* alegységen belüli diszulfid hídjainak elemzésével állapítottuk meg.

### *A Cys2739-Cys2788 alegységen belüli „a-c” diszulfid kötés*

Ehhez a redukálatlan dimer szerkezetű *VWFCK* és *VWFCKM* konstrukciók egymást követő CNBr-dal majd lizil endopeptidázzal történő emésztéséhez folyamodtunk (a CNBr metionin után, a lizil endopeptidáz a lizin után hasít). A keletkezett termékeket RP-HPLC-n választottuk el, és – ismét csak redukálás nélkül – szekvenáltuk. A *VWFCKM* hasítási termékeinek analizését a **17. ábra** mutatja.



**17. ÁBRA.** A *VWFCKM* CNBr és lizil endopeptidáz hasítás utáni termékeinek RP-HPLC szeparálása. A *VWFCKM*-et (200 µg) CNBr-dal emésztettük, majd liofilizáltuk. Ezt a mintát lizil endopeptidase-zal emésztettük 0,1 M Tris-HCl (pH 7,9) és 4 M urea jelenlétében. A mintát RP-HPLC-n (C18 monomer oszlopon, 4,6 x 250 mm, Vydac) szeparáltuk 0,1% vizes fázisú trifluoecetsavban, majd acetonitril gradiensben eluáltuk. A *folyamatos vonal* az eluátum 215 nm-en mért abszorbanciáját mutatja, míg a *szaggatott vonal* az acetonitril %-os arányát jelöli. A CL1 és CL2 csúcsokat szekvenálással elemeztük tovább (l. a szövegben és a **15. táblázatban**).

A CL1-es csúcs két szekvenciája a következő volt: AEETHHHHHHNYK és SEVEVD, melyek az N-terminális (His)<sub>6</sub> toldaléknak és a VWF 2741-2746 aminosav sorrendjének felelnek meg. A CL2-es csúcs két peptid aminosav sorrendjét szolgálta (**15. táblázat**), melyek a várakozásnak megfelelően a lizin és metionin utáni hasítás termékeinek feleltek meg (**14. A ábra**). Az Asn<sup>2790</sup> glikozilált,<sup>43</sup> ezért ebben a rendszerben nem detektáltuk. A Cys<sup>2739</sup> tekintetében a CL2 frakció hozta meg a megoldást, mivel két peptidje csak két ciszteint tartalmaz, és egyiket sem észleltük, amiből egyértelműen következik, hogy a Cys<sup>2739</sup> és Cys<sup>2788</sup> között diszulfidkötés van. Mivel, amint feljebb megállapítottuk, a Cys<sup>2788</sup> nem volt alkilálva NEM-mel a NEM-*VWFCK*-M3

**15. TÁBLÁZAT. A Cys<sup>2739</sup>-Cys<sup>2788</sup> diszulfid kötés azonosítása**

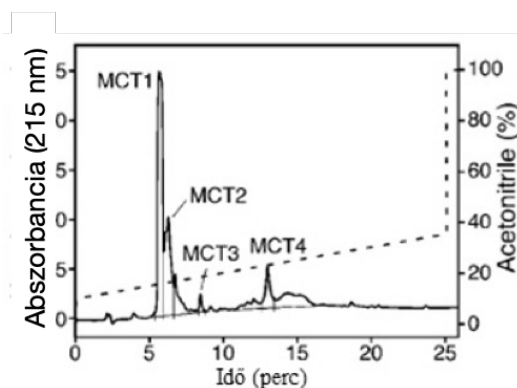
Ciklus	Aminosav	Aminosav
	<i>pmol</i>	<i>pmol</i>
1	V (435,5)	Q (95,9)
2	G (283,1)	V (190,3)
3	S (109,2)	A (131,1)
4	[C <sup>2739</sup> ]	L (124,2)
5	K (257,9)	H (58,6)
6		[C <sup>2788</sup> ]
7		T (67,5)
8		[N] = [cho]
9		G (53,6)
10		S (25,4)
11		V (57,9)
12		V (85,4)
13		Y (70,5)
14		H (35,4)
15		E (26,0)
16		V (50,6)
17		L (41,4)
18		N (15,9)
19		A (6,9)

A CL2 csúcs (17. ábra) aminosav sorrendjét redukció nélkül határoztuk meg. A jelölések a 13. táblázat leírását követik.

monomerben (13. táblázat), ez a kötés csak alegységen belüli diszulfid híd lehet. A VWFCK dimer emésztésével azonos eredményre jutottunk (itt nem közölt adatok). A Cys<sup>2739</sup> és Cys<sup>2788</sup> kötés a homológia alapján jelölt „a-c” kötésnek felel meg (14. ábra).

**A Cys<sup>2724</sup>-Cys<sup>2774</sup> alegységen belüli „1-4” diszulfidkötés**

Tehát a puzzle összerakásával ott tartunk, hogy sikerült azonosítani három ciszteint (Cys<sup>2771</sup>, Cys<sup>2773</sup> és Cys<sup>2811</sup>), melyek tartalmazzák az összes alegységek közötti diszulfid hidat, és megfejtettük az egyik („a-c”) alegységen belüli kötést. A szerkezet további megfejtéséhez ismét



**18. ÁBRA. A NEM-VWFCK-M3 CNBr és termolizín hasítás utáni termékeinek RP-HPLC szeparálása.** A NEM-VWFCK-M3 frakciót (15. B ábra) CNBr-dal emésztettük, majd liofilizáltuk. Ezt a mintát termolizinnel emésztettük 0,1 M Tris-HCl (pH 7,0) 1mM CaCl<sub>2</sub> és 1 M guanidin HCl jelenlétében. A mintát RP-HPLC-n (C18 monomer oszlopon, 2,1x150 mm, Vydac) szeparáltuk 0,1% vizes fázisú trifluoecetavban, majd acetonitril gradiensben eluáltuk. A folyamatos vonal az eluátum 215 nm-en mért abszorbanciáját mutatja, míg a szaggatott vonal az acetonitril %-os arányát jelöli. Feltüntettük a csúcsok (MCT1-MCT4) jelölését.

a részlegesen redukált NEM-VWFCK-M3 monomer kisebb darabokra bontásának módszeréhez folyamodtunk. A NEM-VWFCK-M3 monomert egymást követően CNBr, majd termolizin emésztésnek tettük ki, majd a termékeket RP-HPLC-n szeparáltuk (**18. ábra**).

A kapott frakciók közül leginformatívabbnak az MCT4-es frakció bizonyult, mely két aminosav sorrendet adott (**16. táblázat**). Ezek együttesen négy ciszteint tartalmaztak. Az egyik peptid a VQDQ $C_e$ S $C_e$ [C]SPTRTE (2767-2780) volt ( $C_e$  az előzőekben részletezettek szerint az **ES-Cys**-nek felel meg, míg a zárójelben lévő cisztein nem került detektálásra). A másik peptid a YKDDDDKEEPE[C]ND (az endopeptidáz hasítási hely és a VWF<sup>2720-2726</sup> aminosavak). A Cys<sup>2771</sup> és Cys<sup>2773</sup> alkilálva voltak, így nem vehetnek részt a többi ciszteinnel alkotott diszulfid kötésben. Az MCT4 frakció tömegspektrometriás vizsgálata egyetlen peptid jelenlétét mutatta, melynek tömege 3496,96 Da volt, mely megfelel a szóban forgó dimer szerkezetű peptid elméleti 3519,43 Da tömegének. Ennélfogva ezek az adatok azt bizonyítják, hogy az alegységen belüli diszulfidkötésnek a Cys<sup>2724</sup> és Cys<sup>2774</sup> között kell fennállnia (**16. táblázat**). Ez ismét megfelel a homológia alapján várt „1-4” kötésnek.

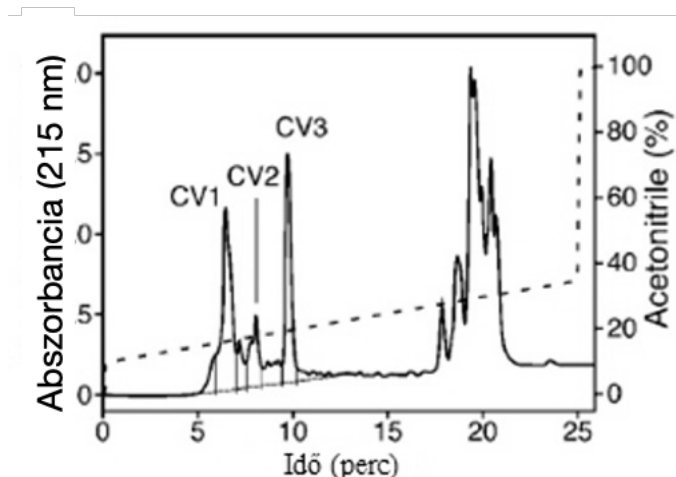
**16. TÁBLÁZAT. A Cys<sup>2724</sup>-Cys<sup>2774</sup> („1-4”) diszulfid kötés azonosítása**

<i>Ciklus</i>	<i>Aminosav</i>	<i>Aminosav</i>
	<i>pmol</i>	<i>pmol</i>
1	V (15,8)	Y (8,3)
2	Q (10,2)	K (5,9)
3	D (11,8)	D (11,8)
4	Q (8,21)	D (8,5)
5	$C_e^{2771}$	D (7,3)
6	S (2,4)	D (7,2)
7	$C_e^{2773}$	K (3,3)
8	[C <sup>2774</sup> ]	E (2,7)
9	S (2,3)	E (4,4)
10	P (2,6)	P (2,6)
11	T (1,4)	E (3,3)
12	R (1,6)	[C <sup>2724</sup> ]
13	T (1,7)	N (1,0)
14	E (2,0)	D (1,4)

A NEM-VWFCK-M3 frakció CNBr és termolizine emésztéséből származó MCT4 frakció (**18. ábra**) aminosav sorrendje. A jelölések a **6. táblázat** leírását követik. Az ES-Cys detektálása nem volt kvantitatív.

### ***A Cys2750-Cys2804, és a Cys2754-Cys2806 alegységen belüli „2-5” és „3-6” diszulfidkötések***

A maradék két diszulfid kötés is azonos stratégiával, a differenciált alkilálás segítségével azonosítottuk. Most a VWFCKM részlegesen redukált és NEM-alkilált frakciói közül az M4-es bizonyult informatívna (b) (**15. B ábra**). Az M4 frakció kétféle molekulát tartalmazott, 15042,1



**19. ÁBRA.** A NEM-VWFCK-M4 CNBr hasítás utáni termékeinek RP-HPLC szeparálása. A NEM-VWFCK-M4 frakciót (15. B ábra) CNBr-dal emésztettük, majd teljesen redukáltuk DTT-vel és 4VP-vel alkiláltuk. A mintát RP-HPLC-n (C18 oszlopon, 2,1x150 mm, Vydac) szeparáltuk 0,1% vizes fázisú trifluoecetsavban, majd acetonitril grádiensben eluáltuk. A folyamatos vonal az eluátum 215 nm-en mért abszorbanciáját mutatja, míg a szaggatott vonal az acetonitril %-os arányát jelöli. Feltüntettük a csúcsok (CV1-CV3) jelölését, melyeket szekvenálással és tömegspektrometriával elemeztünk tovább.

és 14794,6 Da molekulatömeggel (12. táblázat kiemelt rész), ami egy, illetve két bontatlan diszulfid kötés jelenlétére utal.

E diszulfid kötések lokalizációjának meghatározásához az M4 frakciót CNBr-dal emésztettük, majd teljesen redukáltuk DTT-vel és alkiláltuk 4VP-vel. Az emésztett terméket RP-HPLC-n szeparáltuk (19. ábra), majd a kérdéses ciszteineket tartalmazó peptideket

**17. TÁBLÁZAT.** A NEM-VWFCK-M4-ből nyert peptidek elemzése

Minta	Aminosav sorrend	Számított tömeg <i>m/z</i>	Mért tömeg <i>m/z</i>	ES-Cys pozíció	PE-Cys pozíció
CV1	H <sup>2748</sup> -Y-C <sub>p</sub> -Q-G-K-C <sub>p</sub> -A-S-K-A <sup>2758</sup> -[m]	1506,69 <sup>a</sup>	1507,4		2750, 2754
		1488,67 <sup>b</sup>	1489,6		
CV2	E <sup>2803</sup> -C <sub>p</sub> -K-C <sub>p</sub> -S-P-R-K-C <sub>e</sub> -S-K- <sup>2813</sup>	1603,85	1603,6	2811	2804, 2806
	H <sup>2748</sup> -Y-C <sub>p</sub> -Q-G-K-C <sub>e</sub> -A-S-K-A <sup>2758</sup> -[m]	1526,69 <sup>a</sup>	1526,3	2754	2750
		1508,67 <sup>b</sup>	1508,2		
	H <sup>2748</sup> -Y-C <sub>p</sub> -Q-G-K-C <sub>p</sub> -A-S-K-A <sup>2758</sup> -[m]	1506,69 <sup>a</sup>	1508,2		2750, 2754
		1488,67 <sup>b</sup>	1477,9		
CV3	E <sup>2803</sup> -C <sub>p</sub> -K-C <sub>e</sub> -S-P-R-K-C <sub>e</sub> -S-K- <sup>2813</sup>	1623,85	1622,8	2806, 2811	2804

A NEM-VWFCK-M4 monomert CNBr-dal hasítottuk, teljesen redukáltuk DTT-vel, majd 4VP-vel alkiláltuk, s végül RP-HPLC-n szeparáltuk (19. ábra). A csúcsoknak megfelelő frakciók aminosav sorrendjét és tömegspektrometriás vizsgálatát mutatja a táblázat. A várt, de nem észlelt aminosavak szögletes zárójelben szerepelnek. Az [m] jelölés arra utal, hogy a peptid homoszerin vagy homoszerin laktonek jelenlétével is detektálásra került. A C<sup>2754</sup> és C<sup>2806</sup> ciszteinek (kiemelve) a redukció intenzitásától függően szerepelnek ES és PE alkilálással is. Ez más ciszteinnel nem fordul elő, ami csak úgy képzelhető el, ha egymással vannak diszulfid kötésben.

<sup>a</sup>A peptid tömege C-terminális homoszerinnel

<sup>b</sup>A peptid tömege C-terminális homoszerin laktonnal

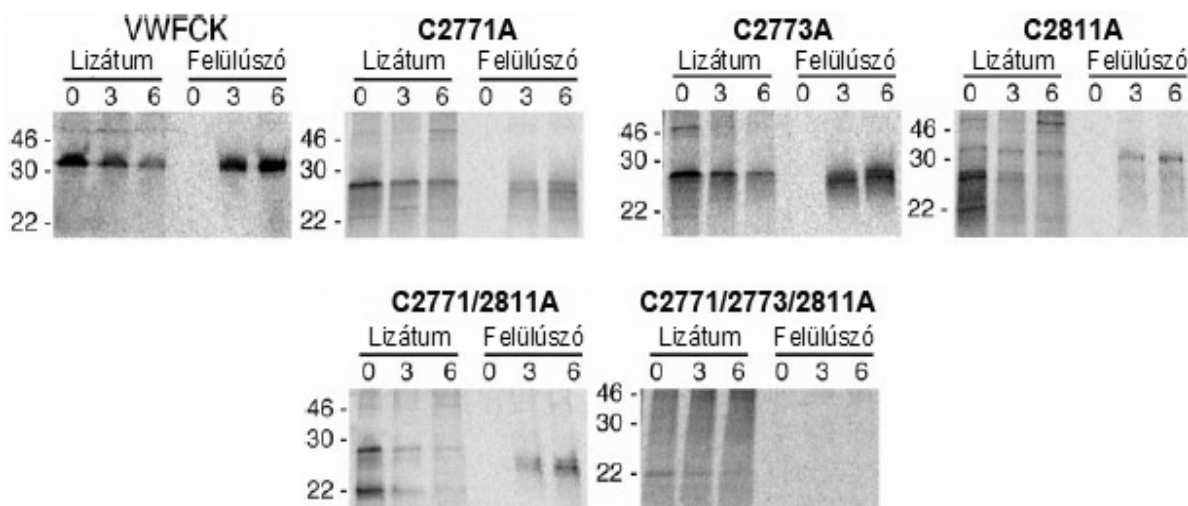
szekvenálással elemeztük (**17. táblázat**). A CV1 frakcióban egyetlen aminosav sorrendet találtunk, mely a His<sup>2748</sup>-nál kezdődik, és kizárólag *PE-Cys*<sup>2750</sup>-t és *PE-Cys*<sup>2754</sup>-t tartalmaz.

A CV1 frakcióban két molekulatömeget találtunk, melyek megfelelnek a peptid várt, két variációban megjelenő szerkezetének; az egyik a homoszerinnel végződő peptid, a másik a vízvesztéssel létrejött homoszerin lakton tömege. A CV2 frakció két aminosav sorrendet szolgáltatott. A fő szekvencia a C-terminális CNBr peptidnek felel meg *PE-Cys*<sup>2804</sup>, *PE-Cys*<sup>2806</sup> és *ES-Cys*<sup>2811</sup> jelenlétével. A másik szekvencia megegyezett a CV1 frakció aminosav sorrendjével, azzal az eltéréssel, hogy *ES-Cys* és *PE-Cys* egyaránt kimutathatók voltak a 2754-es pozícióban. A CV2 frakció tehát három peptid keveréke, melyek közül kettőnél azonos az N-terminális vég, és homoszerinnel, illetve homoszerin laktonnal végződnek. A tömegspektrometriás vizsgálat eredménye alátámasztotta ezt a következtetést, mivel olyan peptideket azonosítottunk, melyek molekulatömege a vártak megfelel (**17. táblázat**). A CV3 frakció egyetlen aminosav sorrendet eredményezett, mely a C-terminális CNBr peptidnek felelt meg *PE-Cys*<sup>2804</sup>, *ES-Cys*<sup>2806</sup> és *ES-Cys*<sup>2811</sup> jelenlétével. Ennélfogva a CV3 azonos a CV2 frakció fő peptidjével, kivéve a Cys<sup>2806</sup> alkiláló partnerét. A további frakciók a CNBr fragmensek különböző keverékeit tartalmazták, és elemzésük nem volt szükséges.

Ezek az eredmények lehetővé teszik a két hátralévő alegységen belüli diszulfid híd lokalizációjának megfejtését. Mind a négy kérdéses ciszteint azonosítottuk. A Cys<sup>2750</sup>-t és Cys<sup>2804</sup>-t kizárólag *PE-Cys* formájában azonosítottuk, míg a Cys<sup>2754</sup> és Cys<sup>2806</sup> mind *PE-Cys*, mind *ES-Cys* formájában jelen volt. A NEM-VWFCK-M4 frakció valójában két, kissé eltérő mértékben redukált termék keveréke, mindkettő monomer szerkezetű, de az egyik egy, a másik két alegységen belüli reziduális diszulfid kötést tartalmaz (**12. táblázat**). A **17. táblázat** adatai ezzel összhangban jól mutatják, hogy az M4 frakció valóban két fő peptidet tartalmaz. Mindkettőben megtalálható a Cys<sup>2750</sup>-Cys<sup>2804</sup> „2-5” alegységen belüli diszulfid kötés; mindkét pozícióban *PE-Cys* volt található mindkét peptidben, ami azt bizonyítja, hogy már az első (részleges redukálás bontotta a Cys<sup>2750</sup>-Cys<sup>2804</sup> kötést mindkét peptidben. A Cys<sup>2754</sup>-Cys<sup>2806</sup> „3-6” kötés viszont az egyik peptidben *ES-Cys*, a másikban pedig *PE-Cys* formájában volt jelen, amiből az következik, hogy az „óvatosabb” redukálás ezt a kötést nem bontotta (*PE-Cys*), a kissé erőteljesebb viszont igen (*ES-Cys*). Mindez csak úgy képzelhető el, ha a négy cisztein párosítása Cys<sup>2750</sup>-Cys<sup>2804</sup> („2-5”) és Cys<sup>2754</sup>-Cys<sup>2806</sup> („3-6”).

### A Cys<sup>2771</sup>, Cys<sup>2773</sup> és Cys<sup>2811</sup> irányított mutációja

Miután a biztosan alegységen belüli kötések feltérképezése befejeződött, figyelmünket a 2771-es, 2773-as és 2811-es pozícióban lévő ciszteinek felé fordítottuk, hogy ezek szerepét *VWFCK* alegységek közti kötés(ek) létrehozásában tisztázzuk. A három ciszteint irányított

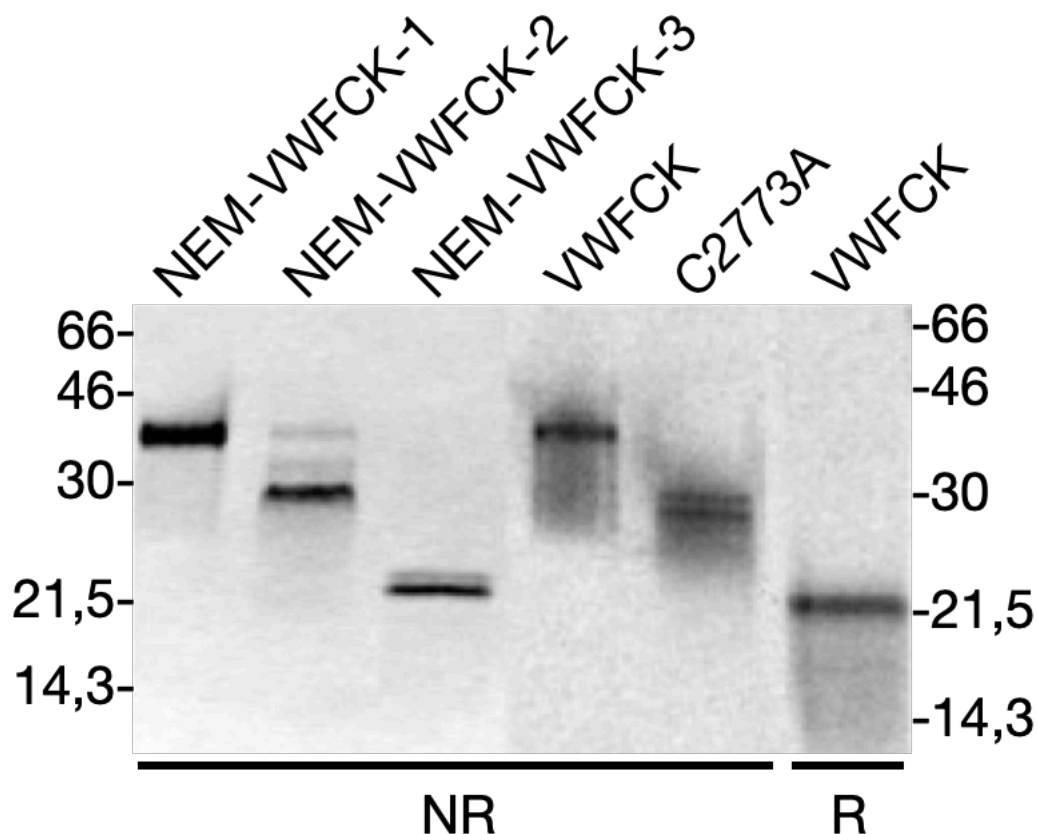


**20. ÁBRA.** A cisztein→alanin mutációk hatása a *VWFCK* expressziójára. COS-7 sejtekbe átmeneti transzfeccióval vittük be a vad típusú vagy az ábrán jelzett mutáns *VWFCK*-t tartalmazó plazmidot. A sejteket [<sup>35</sup>S]methioninnal jelöltük 30 percig („pulse”) majd jelöletlen metionint tartalmazó médiumban követtük a fehérjék sorsát („chase”) 0, 3 és 6 órán át. A felülűszókat és a lizátumokat poliklonális nyúl anti-humán VWF antitesttel immunprecipitáltuk. Az immunprecipitátumokat nem redukáló körülmények között szeparáltuk SDS elektroforézissel 15% poliakrilamid gélen, és a fehérjéket autoradiográfiával detektáltuk. Látható, hogy a mutációkkal járó konformáció változás megváltoztatja a konstruktumok elektroforetikus mobilitását. A C2811A csak részben akadályozta meg a dimerizációt (dimer és monomer mobilitás is jelen van)

mutáció segítségével alaninná változtattuk, és a mutáns *VWFCK*-t COS-7 sejtekben expresszáltuk (**20. ábra**). Lökésszerű („pulse”) izotópos jelölést követően a vad típusú *VWFCK* dimert 34 kDa intracelluláris fehérjeként detektáltuk, melyet a sejtek három órán belül szekretáltak a médiumba. Az egyszeri C2771A, C2871A vagy C2773A aminosavcsere, valamint a kettős C2771A/C2773A csere megnövelte az intracelluláris és a szekretált *VWFCK* elektroforetikus mobilitását, amely így kb. 28kDa-nak felelt meg, és a *VWFCK* dimer (34 kDa) és a redukált *VWFCK* (~20 kDa) közé esett (**14.**, **20.** és **21. ábra**).

E köztes termék alegység összetételét gélelektroforézissel elemeztük (**21. ábra**) ismert tömegű *VWFCK* derivátumokhoz hasonlítva (**12. táblázat**). A NEM-*VWFCK*1 dimer hasonló





**21. ÁBRA. A VWFCK dimer és monomer változatainak elektroforetikus mobilitása.** A VWFCK különböző számú alkilált ciszteint tartalmazó derivátumait RP-HPLC segítségével izoláltuk (16. ábra) és tömegüket is meghatároztuk (12. táblázat). A NEM-VWFCK-1 ép dimer formájú VWFCK, melyben egyetlen cisztein sincs alkilálva. A NEM-VWFCK-2 monomer szerkezetű, melyben három cisztein alkilált. A NEM-VWFCK-3 szintén monomer szerkezetű, melyben mind a 11 cisztein alkilált. COS-7 sejteket transzfektáltunk a vad típusú vagy a jelölt mutáns VWFCK-t tartalmazó plazmiddal, és [<sup>35</sup>S]metionin izotóppal jelöltük. Hat óras követés („chase”) után a mintákat poliklonális nyúl antihumán VWF antitesttel immunprecipitáltuk. A tisztított fehérjéket és immunprecipitátumokat SDS elektroforézissal szeparáltuk 15% poliakrilamid gélen nem redukáló (NR) vagy 2,5% merkaptóetanollal történő redukáló (R) körülmények között. A gélt Coomassie késsel festettük, megszáritottuk, majd autoradiográfiával hívtuk elő. Az ábra bal oldala a tisztított fehérjék Coomassie késsel festett mobilitását mutatja. Az ábra jobb oldala a VWFCK és C2773A-VWFCK autoradiográfiás képét mutatja. Bal oldalon a feltüntetett tömegű standard fehérjék redukció nélküli, jobb oldalon redukáló gélben való mobilitását mutatjuk.

mobilitású volt, mint az izotóppal jelzett VWFCK, mutatva a fehérjék dimerszerkezetét. A teljesen redukált és alkilált NEM-VWFCK3 a várakozásnak megfelelően a redukált izotóppal jelzett VWFCK-val azonos mobilitást mutatott. A NEM-VWFCK2 monomer, melyben három cisztein redukált és alkilált formában van jelen, köztes mobilitású volt, hasonlóan a C2771A, C2773A, valamint C2771A/C2773A mutáns fehérjékhez. A mind a négy fehérjében hasonlóan megtalálható szokatlan elektroforetikus mobilitást valószínűleg a kisebb mértékű SDS kötés magyarázza, amiből arra következtethetünk, hogy a C2771A, C2773A valamint a C2771A/C2773A mutációk olyan monomerek szintéziséhez vezetnek, melyekben legalább néhány aegységen belüli diszulfidkötés fennmarad. A C2811A mutáció 34 kDa dimer szekrécijához vezetett, ám bár megjelent egy intracelluláris ~28kDa-os sáv is, mely a monomer

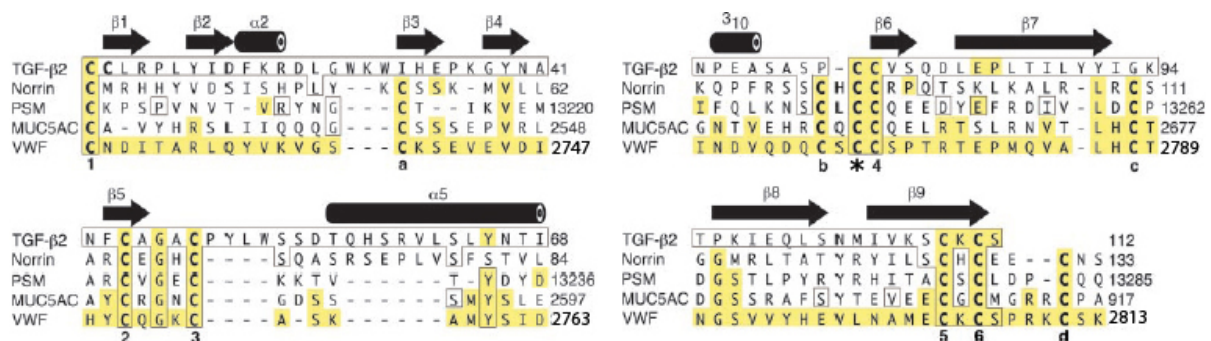
fehérje intracelluláris retenciójára utal (**20. ábra**). A C2811A és a C2771A/C2811A mutációk egy ~22kDa-os intracelluláris monomer megjelenéséhez is vezettek, mely feltehetőleg elegendően nyitott szerkezetű maradt megfelelő mennyiségű SDS kötéséhez, és így a teljesen redukált *VWFCK*-val megegyező mobilitást mutatott (**20. ábra**). Megjegyzendő, hogy az is lehetséges, hogy a gyorsabb mobilitású termékek proteolitikus degradáció következményei. A hármas C2771A/C2773A/C2811A mutáció 22 kDa-os intracelluláris monomer átmeneti megjelenéséhez vezetett, de szekretált proteint nem detektáltunk. Mindezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a *VWFCK* dimer szintéziséhez és szekrécijához a C2771 és C2773 jelenléte elengedhetetlen feltétel. Azonban a három cisztein pontos egymáshoz kapcsolódását ezekkel a kísérletekkel nem sikerült megnyugtatóan tisztázni. Ehhez a kitűzött célhoz a molekuláris modellezés hozott közelebb.

### ***Molekuláris modell megalkotása a CK domének közötti homológia segítségével***

A dimer szerkezet pontosabb megértéséhez ismét a bevezetőben már említett szerkezeti analógiákhoz fordultunk. Az a felismerés, hogy a norrin, a VWF és néhány rokon epiteliális mucin<sup>200</sup> C-terminális régiójukban valamennyien CK-szerű doménnel rendelkeznek, fontos előrelépést jelentett, és a variációs lehetőségek számát jelentősen leszűkítette. A CK domének megközelítőn 90 aminosavból állnak, melyek között hat olyan cisztein is szerepel, melyek egymáshoz csomószerű elrendezésben kapcsolódnak. A második és harmadik ciszteint általában három aminosav választja el egymástól; közülük a középső glicin: Cys-X-Gly-X-Cys. Az ötödik és hatodik ciszteint egyetlen aminosav választja el. A második és ötödik, valamint a harmadik és hatodik cisztein közötti diszulfid kötés olyan makrociklusos gyűrűt képez, melyen keresztülhatolva jön létre az első és negyedik cisztein közötti diszulfidkötés – innen a „csomó” elnevezés. Sok CK domént tartalmazó fehérje homodimer vagy heterodimer formájában van jelen, ami arra utal, hogy a CK domének gyakran szolgálják e fehérjék dimerizációját. A PSM vizsgálata azt is kiderítette, hogy a CK domén az epiteliális mucinok oligomerizációját is közvetítheti.<sup>199</sup> A PSM a VWF-fel nagymértékű homológiát mutat, és az oligomerizáció mechanizmusa is hasonló; a C-terminális domének az endoplazmás retikulumban dimerizálódnak, míg az N-terminális domének a Golgi apparátusban kapcsolódnak egymáshoz. A PSM C-terminális CK doménjének COS sejtekben való expressziója diszulfid híddal összekötött dimer szekrécijához vezetett.<sup>199</sup> Fenti kísérleteink azt sugallják, hogy a VWF CK doménje hasonlóképpen működik. Mint bemutattam, e kísérletek a dimerizációban részt vevő lehetséges ciszteineket mindössze háromra, a Cys<sup>2771</sup>, Cys<sup>2773</sup> és Cys<sup>2811</sup>-re szűkítették le.

Érdekes, hogy ez a három cisztein a sokféle CK domén között nincs széles körben konzerválva, és egyikük egy speciális CK alcsoportra jellemző.

Ugyanis a CK domének legalább négy különféle szerkezeti csoportra oszthatók, melyek különböznek egymástól a dimerizáció módjában. Az egyes csoportokat jellegzetes ciszteinek jellemzik, melyek nem részei a csomót képező hat ciszteinnek.<sup>197</sup> E csoportok közül a VWF CK domén leginkább a **TGF- $\beta$  család CK domén**jéhez tűnik hasonlónak, melyekben egy további cisztein található, és ez alkotja az alegységek közti diszulfid hidat. Ez az extra cisztein a VWF-en kívül a norrinban<sup>6</sup>, a PSM-ben<sup>9</sup> és az egyik humán epiteliális mucinban



**22. ÁBRA. A CK domének megfeleltetése.** A humán TGF- $\beta$ , Norrie betegség protein (norrin<sup>5,6</sup>), PSM<sup>5,9</sup>, humán mucin (MUC5AC<sup>23</sup>) és a VWF CK domén szekvenciáit feleltettük meg egymásnak a „Módszerek” alatt részletezettek szerint. A ciszteineket **vastagon** szedtük. *Csillag* jelöli azt a ciszteint, amely a TGF- $\beta$ -ban az alegységek közötti diszulfid kötést szolgáltatja. Azok az aminosavak, melyek megegyeznek a TGF- $\beta$  sorrendjével, be vannak *keretelve*, míg azok melyek a VWF-fel azonosak, *sárga kiemelés*t kaptak. A TGF- $\beta$  kristályszerkezetéből ismert másodlagos struktúrákat az aminosav szekvencia *fölött* tüntettük fel<sup>39</sup>; a nyilak  $\beta$ -lemezt, a hengerek  $\alpha$ -hélixet jelölnek.

(MUC5AC<sup>23</sup>) (**22. ábra**) is megtalálható, mely arra utalhat, hogy e fehérjékben konzervált pozíciójú ciszteinek hozzák létre az alegység hidat. Ezt a cisztein pozíciót csillaggal jelöltük a **22. ábrán**. A TGF- $\beta$ -án kívül a család többi tagjában még négy további cisztein is található, ezeket *a*, *b*, *c*, és *d*-vel jelöltük a **22. ábrán**. Ilyenformán a norrin, bizonyos epiteliális mucinok és a VWF a CK domének családjában egy olyan alcsoportot képez, melyek a dimerizációt egymáshoz hasonló szerkezettel oldják meg, és melyek több alegységen belüli, vagy alegységek közötti diszulfid hidakat is tartalmaznak. A szerkezet megértéséhez fontos információ, hogy a TGF- $\beta$ 2 kristályszerkezete ismert<sup>39</sup> volt, ami jó kiindulási alapul szolgált a rokon domének szerkezetének megfejtéséhez.

Vizsgálataink megkezdésének időpontjában már ismert volt ezen extra ciszteinek elhelyezkedésének számítógépes modellje<sup>200</sup> a norrinban, szintén a TGF- $\beta$ 2 kristály szerkezete alapján. Az az extra cisztein, mely a TGF- $\beta$ -val is közös, alegységek közötti diszulfid kötésben szerepelt a modell szerint, míg a négy további cisztein alegységen belüli kötést létesített a Cys<sup>a</sup>-Cys<sup>c</sup> és Cys<sup>b</sup>-Cys<sup>d</sup> elrendezés szerint. A VWF CK domén általunk észlelt szerkezete megfelelt

ennek a modellnek. A CK szerkezet magját jól mutatja a konzervált diszulfid kötések jelenléte a Cys<sup>2724</sup>-Cys<sup>2774</sup> "1-4", Cys<sup>2750</sup>-Cys<sup>2804</sup> "2-5" és Cys<sup>2754</sup>-Cys<sup>2806</sup> "3-6" elrendezés szerint. Ezen túlmenően a norrin számítógépes modellben feltételezett Cys<sup>2739</sup>-Cys<sup>2788</sup> "a-c" alegységen belüli diszulfid hidat szintén bizonyítottuk.

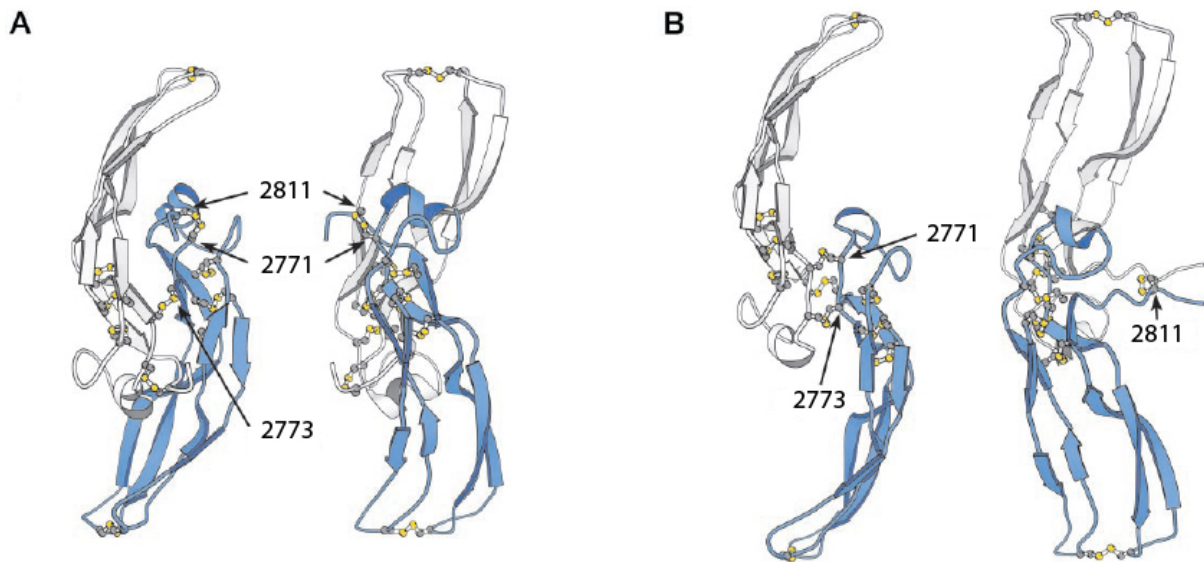
Érdeemes megjegyezni, hogy a rekombináns norrin szerkezete eltérni látszik a feltételezett modelltől, mivel a norrin nem dimer, hanem multimer szerkezetű. Abban a kísérletben, amelyben C-terminális régiót (His)<sub>6</sub> toldalékkal expresszálták, a fehérje fragmens nagy molekulásúlyú multimerek formájában szekretálódott, amelyet a C95A csere dimer szerkezetűvé változtatott.<sup>198</sup> Ez az eredmény alátámasztja a feltételezett Cys<sup>95</sup>-Cys<sup>95</sup> alegységek közötti diszulfid kötés jelenlétét, de egyben azt is mutatja, hogy a multimerek létrejöttéhez más diszulfid hidak is hozzájárulnak. Ebből az is következik, hogy a norrin CK domén a fent jelzett négy szerkezeti kategórián kívülálló ötödik típust képvisel.<sup>197</sup>

A fent részletezett kémiai adatok alapján, melyek három kivételével valamennyi cisztein alegységen belüli diszulfid kötésben való részvételét igazolták, molekuláris modellt hoztunk létre a VWF CK domén dimer szerkezetére (**23. A ábra**). Az aminosav sorrendek összehasonlítása<sup>201</sup> (**22. ábra**) azt mutatja, hogy a VWF, az epiteliális mucinok és (kisebb mértékben) a norrin különböznek a TGF-β2 családtól, főként abban, hogy a TGF-β2, α5 és 3<sub>10</sub> hélicei közötti távolságnak megfelelő szakaszok jóval rövidebbek. Ezt a szakaszt egy rövid α-hélixként modelleztük a VWF CK doménben. A VWF CK modell diszulfid szerkezete megegyezik a norrinéval (**23. A ábra**), és a TGF-β2 analógia alapján a Cys<sup>2773</sup>-Cys<sup>2773</sup> (\*-\*) alegységek közötti diszulfid hidat tartalmazza.

Ez a mintázat jól összeegyeztethető a fent bemutatott szerkezeti eredményeinkkel, melyek bizonyították a CK csomó szerkezetének jelenlétét, és az alegységek közötti lehetséges diszulfid hidakat a Cys<sup>2771</sup>, Cys<sup>2773</sup> és Cys<sup>2811</sup> ciszteinekre szűkítették le. A szabad (tehát nem diszulfid kötésben lévő) ciszteinek jelenlétét csak akkor kerülhetjük el, ha vagy egy, vagy három alegységek közötti diszulfid hidat feltételezünk (régóta ismert, hogy a VWF, és a rekombináns *VWFCK* valamennyi ciszteinje kötésben van, szabad ciszteint nem tartalmaz). Azonban ha feltételeznénk a Cys<sup>2771</sup>-Cys<sup>2811</sup> alegységek közti diszulfid kötések jelenlétét, ez olyan nagymértékben változtatná meg a dimer interfész szerkezetét, hogy az radikálisan eltérne a TGF-β-ban észlelttől, így ez alapján az egyetlen alegységek közötti diszulfid hidat feltételező modellt tarthatjuk valószínűnek. Ezt a megoldást valószínűsítik azok az újabb eredmények is,

melyek a rokon norrin CK doménjében egyetlen (a VWF Cys<sup>2773</sup>-Cys<sup>2773</sup> kötésének megfelelő) alegységeket összekötő diszulfid hidat igazoltak.<sup>204,205</sup>

Ám az alegységek között három diszulfid hidat tartalmazó VWF CK dimert is könnyen szerkeszthetünk, ha elfogadjuk nagyobb szerkezeti változások jelenlétét is, különösen, ha a Cys<sup>2773</sup> párosítását megváltoztatjuk. Mivel tudjuk, hogy valamennyi cisztein oxidált formában van jelen, ezért a párosítás ugyanezeket a ciszteineket kell, hogy tartalmazza. Elméletileg négy variáció lehetséges: Az egyik a Cys<sup>2771</sup>-Cys<sup>2771</sup>, Cys<sup>2773</sup>-Cys<sup>2773</sup> és Cys<sup>2811</sup>-Cys<sup>2811</sup> kombináció. A másik három kombinációt a Cys<sup>x</sup>-Cys<sup>x</sup>, Cys<sup>y</sup>-Cys<sup>z</sup> képlettel írhatjuk le, ahol Cys<sup>x</sup> sorrendben a Cys<sup>2771</sup>, Cys<sup>2773</sup>, vagy Cys<sup>2811</sup> ciszteinek felel meg. Például az egyik alegység 5Å-nyi elmozdítása lehetővé teszi két Cys<sup>2771</sup>-Cys<sup>2773</sup> kötés létrejöttét (**23. B ábra**).



**23. ÁBRA. A VWF CK domén dimer modelljei.** A VWF CK domén háromdimenziós modelljét a „Módszerek” alatt részletezettek szerint készítettük el, és szalagdiagram formájában ábrázoltuk. A két alegység közül az egyiket *kék* színben jelenítettük meg, hogy az átfedő helyeken segítsük az elkülönítést. A diszulfid hidak a *gömb-pálca* formátumot kapták; a kén atomok *sárgára* színezve. A jobb oldali ábrázolások lefelé tekintenek a dimer interfészre, míg a bal oldaliak a jobb oldali ábra függőleges tengelyei mentén balra 90° rotáció után ábrázolják a dimert. Jelöltük a kék alegység Cys<sup>2771</sup>, Cys<sup>2773</sup> és Cys<sup>2811</sup> ciszteinjeit, ahol jól látható helyre kerültek. **A:** Ez a modell egyetlen alegységek közötti diszulfid híd (Cys<sup>2773</sup>-Cys<sup>2773</sup>) jelenlétét feltételezi, mely a dimer formájú TGF- $\beta$  családban konzervált helyen van. A Cys<sup>2771</sup>-Cys<sup>2811</sup> ciszteinek alegységen belüli kötésben vannak. **B:** Ez a modell három alegységek közötti diszulfid hidat feltételez, melyeket a két Cys<sup>2771</sup>-Cys<sup>2773</sup>, valamint a Cys<sup>2811</sup>-Cys<sup>2811</sup> kötések alkotnak.

A (Cys<sup>2771</sup>-X-Cys<sup>2773</sup>)<sub>2</sub> elrendezés hasonló az antiparalel Cys-X-Cys/Cys-X-Cys cisztein vázhoz, mely több influenzavírus neuraminidázban és a sertés leukocita protegrin-1-ben is megtalálható (lásd Tamaoki és mtsai összefoglalását<sup>206</sup>). E szerkezet befejezéséhez a Cys<sup>2811</sup>-Cys<sup>2811</sup> kötésre is szükség van, mely a C-terminálisok csekély elmozdításával könnyen létrehozható (**23. B ábra**). Ebben az alternatív modellben mindhárom lehetséges ciszteint felhasználtuk az alegységek közötti diszulfid hidakhoz. Minthogy mindhárom cisztein az

alegységnek ugyanazon a felszínén helyezkedik el, ezért ez az elrendezés megőrzi a TGF- $\beta$ -ban található konkáv dimer interfészt.

A CK dimer szerkezet különféle lehetőségei közül a helyes megoldás kiválasztását elvben a ciszteinek irányított mutációival is segíthetnénk, de ez a stratégia csak részben bizonyult sikeresnek. A Cys<sup>2811</sup> mutációja nem akadályozta meg a VWF CK domén dimer képződést, ami arra utal, hogy egy vagy két diszulfid híd (Cys<sup>2771</sup>, Cys<sup>2773</sup>) köti össze a mutáns alegységeket. Azonban a Cys<sup>2771</sup>-at vagy a Cys<sup>2773</sup>-et érintő mutációk mindegyike megakadályozta a dimer létrejöttét, így ezek az adatok nem zárják ki, sőt valószínűsítik a Cys<sup>2771</sup>-Cys<sup>2773</sup> közötti kötést. A PSM CK doménjének hasonló irányított mutációi szintén nem zárták ki az egynél több alegységek közötti diszulfid híd jelenlétét, de azok pontos lokalizációját nem sikerült azonosítani.<sup>199</sup> A PSM-mel végzett kísérletekben egy alanin behelyettesítése a Cys<sup>13244</sup> (Cys<sup>b</sup>), Cys<sup>13246</sup> (Cys<sup>\*</sup>) vagy Cys<sup>13283</sup> (Cys<sup>d</sup>) lokalizációkba lehetővé tette, hogy a PSM CK dimerizálódjon, ami azt jelezte, hogy e ciszteinek egyike sem felelős önmagában az alegységek közötti kötésért. Így a rendelkezésre álló szerkezeti és mutációs adatok alapján *feltételezhetjük*, hogy azok a CK domének, amelyek a VWF-hez és PSM-hez hasonlóan 11 konzervatív elhelyezkedésű ciszteint tartalmaznak, a *CK domének új altípusát* képezik, amelyben az alegységeket három diszulfid híd köti össze. Bár a norrin ugyanezt a 11 konzervatív ciszteint tartalmazza, ebben a különleges esetben ugyanezek a ciszteinek (Cys<sup>b</sup>, Cys<sup>\*</sup> és Cys<sup>d</sup>) nem kettő, hanem három monomert kötnek össze, így nem dimerek, hanem multimerek képződnek.

Ezt a hipotézist további vizsgálatokkal kell megerősíteni; a protein hasítására támaszkodó analitikai módszerek általában nem tudják megkülönböztetni az alegységek közötti és alegységen belüli diszulfid hidakat. Minthogy nem tudunk háromnál kevesebb redukált és alkilált ciszteint tartalmazó VWF CK monomert izolálni, valamennyi diszulfid híd teljes jellemzéséhez más módszerre lesz szükség. Ilyen módszer lehet a röntgen krisztallográfia.

**Összefoglalva**, ebben a munkában a VWF CK domén diszulfid szerkezetét sikerült megfejteni, mindössze két elvi lehetőségre leszűkítve az alegységek közti hidak helyzetét, melyek közül a három kötést tartalmazó modell látszott sokkal valószínűbbnek. Mindez logikus szerkezeti háttérrel képez a VWF IID variáns molekuláris patogenezisének megértéséhez, hiszen a IID fenotípushoz vezető mutációk vagy az alegységek közti diszulfid hidak ciszteinjét érintik (C<sup>2771</sup> és C<sup>2773</sup>), vagy azok közvetlen közelében vannak (C<sup>2806</sup>). Munkánk publikálása után 14 évvel Springer munkacsoportjának sikerült megfejtenie a kristályszerkezetet<sup>207</sup>, mely a fenti három diszulfid híd modellt mindenben megerősítette.

## **A nagy penetranciájú súlyos 1-es típusú VWB. A VWF „minőségi ellenőrzése” az ER-ban, és a p.C1149R mutáció patomechanizmusa<sup>208</sup>**

Az 1-es típusú VWB általában autoszomális domináns öröklődésmenetet mutat, melyet két csoportra lehet osztani. A gyakoribb csoportban változó a penetrancia és még ugyanazon családon belül is változó a betegség súlyossága, míg a kevésbé gyakori csoportban a penetrancia magas, az öröklődésmenet nyilvánvalóan domináns és a VWF szint általában igen alacsony. Ezekben a családokban a VWF szint 20% alatti szokott lenni, ami jóval alacsonyabb, mint amit egy heterozigóta VWF géndefektustól várnánk. Ebből arra lehet következtetni, hogy a mutáns VWF alegységek az egészséges alegységek beépülését is gátolják a szekretált multimerekbe.

Az 1-es típusú VWB genetikai háttere még ma sem tisztázott teljesen. Nagy előrelépést jelentett három nemrég lezárult multicentrikus vizsgálat, melyet Európában,<sup>67,128</sup> Kanadában<sup>189,209</sup> és az Egyesült Királyságban<sup>190</sup> végeztek. E munkák alapján kiderült, hogy az 1-es típusú VWB családoknak csak kb. kétharmadában lehet a *VWF* génen belül mutációt kimutatni. Az az összefüggés is nyilvánvalóvá lett, hogy minél alacsonyabb a VWF szint és minél teljesebb a penetrancia az illető családban, annál nagyobb a valószínűsége annak, hogy a *VWF* génen belül mutációt azonosíthatunk. Azokban a betegekben, akiknél alacsony penetranciájú mutációt azonosítunk, illetve egyáltalán nem találunk mutációt, a „0” vércsoport kimagaslóan gyakoribb, mint az átlag populációban. Az azonosított mutációk többsége aminosavcserét eredményező (misszensz) pontmutáció.

A nagy penetranciájú súlyos 1-es típusú VWB előfordulásának és okainak vizsgálatára a kelet-magyarországi régió vérzékeny betegeit ellátó Debreceni Egyetem II. Belklinika nyilvántartása adott lehetőséget. Itt **257** 1-es típusú von Willebrand kórban szenvedő beteget tartottak nyilván kutatásunk időpontjában. E betegek többsége (**221** beteg) „sporadikus” 1-es típusú betegségben szenvedett, vagyis a családban egyedül volt érintett. A fennmaradó 36 beteg egy részéről csak részleges adatok álltak rendelkezésre. Kilenc család 25 érintett családtagjából mindössze hét olyan családot találtunk, akik megfeleltek a magas penetranciájú súlyos 1-es típusú VWB definíciójának. Ebből látható, hogy ez az altípus az összes egyes típusú beteg kevesebb, mint 10%-a. A hét családból kettő (F, G) nem óhajtott részt venni a vizsgálatban. A maradék öt család részletes genetikai vizsgálata úgy történt, hogy a **18. táblázatban** A-E kóddal szereplő családok teljes *VWF* kódoló régióját szekvenáltuk<sup>127</sup>. E családok között egyetlen ismétlődő mutációt (**2** család), a Vicenza variánsért felelős p.R1205H mutációt találtuk. A két Vicenza családban a p.R1205H mutáción kívül (27-es exon) más genetikai eltérést nem

azonosítottunk; az irodalomban néhány családban leírt p.M740I mutációt, mely a korábban leírt családokban sem volt mindig jelen,<sup>210</sup> a magyarországi Vicenza betegekből nem tudtuk

**18. TÁBLÁZAT. A magas penetranciájú 1-es típusú VWB populációgenetikai háttere Kelet-Magyarországon**

Család	Mutáció†	Fenotípus
A	C1130Y (Cys1130Tyr)	Súlyos 1-es típusú VWD
B*	A1597Q (Ala1597Gln)	2A altípusú VWD
C	R1205H (Arg1205His)	Vicenza
D**	?	Súlyos 1-es típusú VWD
E	R1205H (Arg1205His)	Vicenza
F	ND	Súlyos 1-es típusú VWD
G	ND	Súlyos 1-es típusú VWD

26 családban volt egynél több 1-es típusú von Willebrand betegségben szenvedő családtag. Ezek közül 7 felelt meg a nagy penetranciájú súlyos VWB kritériumainak (VWF:Ag<20%; minden generáció hasonló fenotípussal érintett). ND - két család nem volt elérhető a vizsgálat számára.

† Valamennyi azonosított mutáció heterozigóta formában volt jelen.

\*A „B” családban a genetikai vizsgálat világított rá a pontos diagnózisra. Ez jellegzetes példája annak, hogy nem megfelelő felbontású multimer analízis tévedésekhez vezethet.

\*\*Részletes, ismételt szekvenálási kísérlet után sem tudtunk mutációt azonosítani.

kimutatni.

E genetikai analízis<sup>127</sup> a két családban talált p.R1205H mutáción kívül azonosította a D3 domén p.C1130Y mutációját is. Egy családban nem sikerült megtalálnunk a mutációt, míg az ötödik családról (B család) a részletesebb vizsgálat kiderítette, hogy betegsége valójában 2-es típusú. Így a kutatás a továbbiakban a Vicenza variáns (lásd következő fejezet) és a D3 domén mutáció molekuláris patogenezisére irányult.

Már vizsgálataink kezdetekor is ismert volt néhány súlyos egyes típusú betegséget okozó mutáció. Ezek a D3 doménben voltak találhatóak, az alegységek közötti diszulfid híd közelében. Az egyik ilyen mutációt (p.C1149R) egy holland család három érintett tagjában írta le Sadler munkacsoportja, akikben a VWF szint 10-15% közötti volt.<sup>143</sup> Két, egymással nem rokon, hasonló fenotípusú olasz családnál a p.C1130F mutáció volt kimutatható,<sup>143</sup> és Sadler munkacsoportjához való csatlakozásom után ezekhez adódott a fent említett magyar családban az ugyanezt az aminosavat érintő p.C1130Y mutáció.<sup>127</sup>

Vizsgálataink céljából tehát a nagy penetranciájú súlyos 1-es típusú VWB-nek azonosított csoport genetikai és funkcionális vizsgálatát tűztük ki. Először a a fent említett holland család mutációjával (p.C1149R) kapcsolatos kísérleteimet mutatom be, majd – a következő fejezetben – a Debreceni Egyetem beteganyagában is azonosított nevezetes Vicenza variáns patomechanizmusának felderítésével kapcsolatos munka összefoglalása következik.



***p.C1149R - a kísérletes megközelítés háttere***

A p.C1149R mutáció valószínű hatásmechanizmusát vizsgálva abból indultunk ki, hogy heterozigóta mutációk gyakran gátolják az oligomer szerkezetű fehérjék funkcióját, és a VWF komplex bioszintézise ilyenfajta hatásnak számos céltáblát nyújt.<sup>55,77</sup> Amint azt a bevezetőben említettem, és az előző fejezetben részleteiben is bemutattam, a pro-VWF alegységek az ER-ban diszulfid hidak által összekötött dimereket képeznek az alegység C-terminális CK („cisztin csomó”) doménjein keresztül. A pro-VWF dimerek a Golgi rendszerbe kerülnek át, ahol a propeptid furin hatására lehasad és az N terminális D3 domének közötti további diszulfid kötés révén multimerek képződnek. E hatalmas méretű multimer fehérje tömege, mely gyakran több mint negyven alegységet tartalmaz, meghaladhatja a 10 000 kDa-t. A VWF alegységek intracelluláris útjának számos pontját gátolhatja egy-egy mutáns alegység. Például több olyan mutációt azonosítottak, melyek gátolják a multimerizációt vagy csökkentik a multimerek stabilitását, így okozva a nagyméretű multimerek hiányát (2A típusú VWB).<sup>148,211</sup>

Munkacsoportunk kezdeti vizsgálatai tisztázták, hogy a p.C1149R mutáció azáltal eredményez alacsony VWF plazmaszintet, hogy a pro-VWF alegységek intracelluláris retencióját okozza a transzfektált sejtek ER-ában. Így a VWF szekréció erősen csökkent. Továbbá ha p.C1149R mutáns alegységeket normál VWF fehérjével együtt expresszálunk, a normál VWF szekréciója is csökken.<sup>143</sup> Ezek alapján munkahipotézisünk az volt, hogy a normál és mutáns alegységek egymással heterodimert képeznek, melyek ugyanúgy fennakadnak az ER-ban, mint a mutáns alegységek homodimerjei. Egy ilyen mechanizmus magyarázatot adna a domináns negatív hatásra, melyet a p.C1149R mutációnál megfigyeltünk. Sajnos az egyetlen aminosav különbség, mely a normális és mutáns alegységek között fennáll, nem teszi lehetővé a heterodimer képződés közvetlen demonstrálását. Azt sem lehetett eldönteni, hogy a mutáns és normál alegységek egymáshoz kapcsolódása az ER-ban vagy a Golgi apparátusban történik-e.<sup>143</sup>

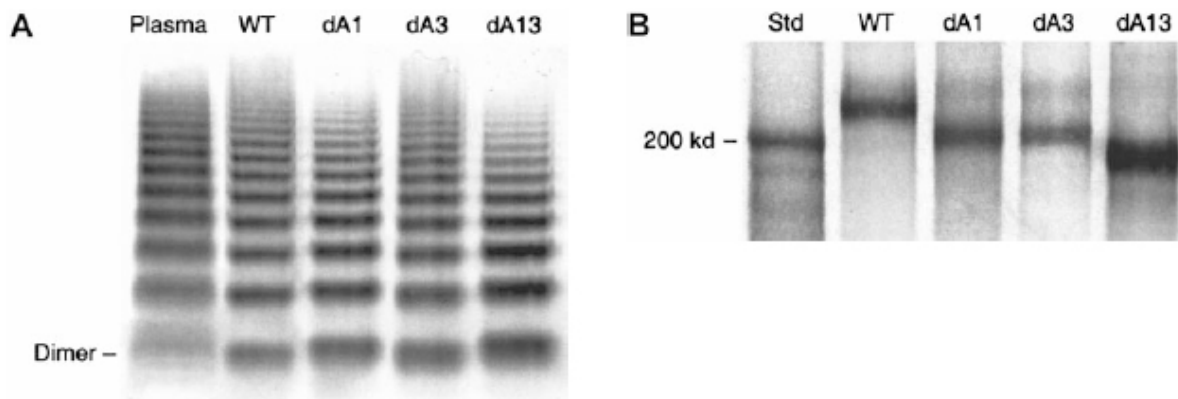
Ezért egy olyan modellt rendszert dolgoztunk ki, melyben a p.C1149R mutáns alegységeket el lehet különíteni a normál VWF-től. Kiderült, hogy az A1 és A3 domén deléciója (dA1 és dA3) nem gátolja a VWF hatékony szintézisét és normál szerkezetű multimer formában való szekrécióját. E deléciókat hordozó alegységeket könnyedén el lehet különíteni a normál VWF-től, részben molekulatömegük alapján gélelektroforézis segítségével, részben azért, hogy az A1 doménre specifikus monoklonális antitest a deléciót hordozó alegységet nem ismeri fel. Az ebben a modellrendszerben kapott, alább részletesen bemutatott eredményeink több ponton is

alátámasztják a fenti hipotézist, és megvilágítják, hogy egy pontmutáció hogyan okozhat magas penetrációval járó, viszonylag súlyos 1-es típusú VWB-t.

A vizsgálatra kiválasztott p.C1149R *VWF* génmutációt hordozó holland család a súlyos nagy penetrációjú 1-es típusú VWB típusos példája volt. A két „allélt” egymástól megkülönböztetni képes modellrendszer kialakításának első lépése tehát az volt, hogy létrehoztuk az A1 és az A3 doméneket nélkülöző dA1, dA3, illetve a kettős deléciót hordozó dA13 konstrukciókat. Ezután igazolnunk kellett, hogy a VWF bioszintézis valóban jól elviselte e nagy deléciók jelenlétét. A **24. ábra** mutatja, hogy a dA1 és dA3 deléciót tartalmazó alegységek hatékonyan szekretálhatók az ismert multimer szerkezettel. Ez a tapasztalat egyezik korábban publikált megfigyelésekkel.<sup>212,213</sup> A kombinált dA1 és dA3 deléciót is tartalmazó molekulát is hasonlóképpen hatékonyan szekretálták a sejtek multimer formájában (**24. A ábra**). A nagyobb deléciók alkalmazása megkönnyíti a teljes nagyságú alegységtől való elkülönítést a gélelektroforézis során (**24. B ábra**), így a legtöbb kísérletben a kettős deléciót használtuk.

#### ***Az A1 és A3 domén deléciója nem gátolja a VWF bioszintézist***

A kialakított modellrendszerben a mutáns és vad típusú alegységeket nagyságuk alapján (**24. ábra**) és a hiányzó doménekre specifikus monoklonális antitestek segítségével is el lehet különíteni.



**24. ÁBRA. A dA1, dA3 és dA13 rekombináns deléciós VWF konstrukciók elemzése elektroforézissel.** COS-7 sejtek rövid távú transzfekciójával expresszáltuk a rekombináns normál humán VWF-et (WT) és deléciós variánsait, melyekből eltávolítottuk az A1 (dA1) vagy az A3 (dA3, illetve mind az A1, mind az A3 (dA13) domént, és a felülűszót elemeztük. **A:** A plazma és rekombináns VWF preparátumok multimer szerkezetét 1,5%-os SDS agaróz elektroforézissel hasonlítottuk össze. Jeleztük a dimer pozícióját (500 kDa). **B:** A normál és deléciós rekombináns VWF konstrukciók alegységeinek vizsgálata 5% SDS poliakrilamid gél elektroforézissel (merkaptóetanol redukció). A molekulatömeget 200 kDa méretű standard fehérjéhez viszonyítottuk. Az alegységek mérete 250 kDa (WT), 225 kDa (dA1 és dA3) és 205 kDa (dA13).

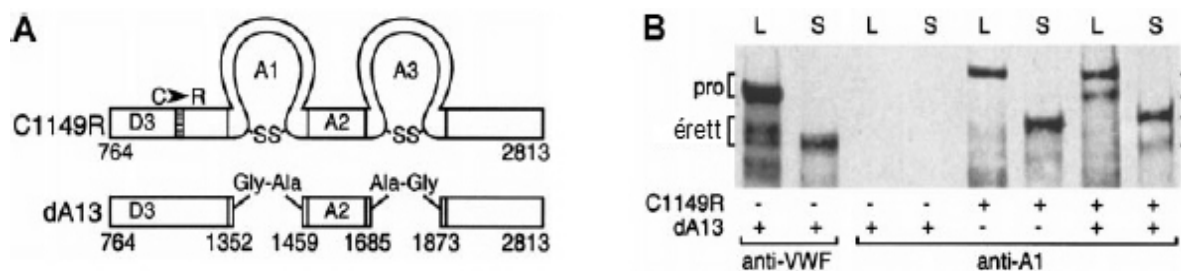
A dA1-VWF-ben az A1 domén legnagyobb részét eltávolítottuk oly módon, hogy a Cys<sup>1353</sup>-Cys<sup>1458</sup> közötti aminosavakat egy Gly-Ala dipeptiddel helyettesítettük. A dA3-VWF-ben az A3 domént távolítottuk el a Cys<sup>1686</sup>-Cys<sup>1872</sup> közötti aminosavak Ala-Gly dipeptiddel való

helyettesítésével (**25. ábra**). A két deléciót a dA13-VWF-nek nevezett konstrukcióban egyesítettük. E deléciós fehérjéket COS-7 sejtekben expresszáltuk, ami mindhárom deléció szintézisét és multimer formában való szekrécióját lehetővé tette (**24. A ábra**). Ezek az eredmények jól összeegyeztethetők azokkal a korábbi vizsgálatokkal, melyek szerint az A1 és az A3 (a miénktől különböző) deléciói sem gátolták a VWF szekrécióját és multimer szintézisét.<sup>212,213</sup> A deléciós alegységeket igen könnyen elkülöníthettük a vad típusú VWF-től gélelektroforézissel, redukáló körülmények között (**24. B ábra**). A várakozásnak megfelelően a dA1 és dA3 kb. 22 kDa-nal, a dA13 pedig kb. 45 kDa-nal volt kisebb, mint a teljes nagyságú VWF. A látszólag normál bioszintézis azt bizonyította, hogy kitűzött célunknak megfelelően a deléciós fehérjék valóban hasznos eszközei lehetnek az alegységek közötti kapcsolatok intracelluláris vizsgálatának.

Ezek a tulajdonságok tették lehetővé, hogy kísérleteinkben az A1 és A3 domén-hiányos dA13-VWF molekula mintegy helyettesítse a normál VWF allélt.

### ***A pro-VWF alegységek heterodimereket képeznek***

Annak eldöntésére, hogy vajon létrejön-e a különböző pro-VWF alegységek közötti heterodimerizáció, 239T sejteket ko-transzfectáltunk deletált dA13-VWF-et és a teljes nagyságú, de p.C1149R mutáns VWF-et tartalmazó plazmidokkal (**25. ábra**). A kísérlet kontroll ága igazolta, hogy a dA13-VWF a sejtlizátumokból és a felülúszóból is jól immunprecipitálható poliklonális VWF ellenes antitesttel. Továbbá, a várakozásnak



**25. ÁBRA. Pro-VWF heterodimer képződés.** **A panel:** A C1149R és dA13 rekombináns VWF konstrukciók sematikus szerkezete. Az ábrán az A1, A2, A3 és a D3 domének vannak kiemelve. A satírozott szakasz a C1149R aminosav cserét jelöli a D3 doménben. Az ábra alatti számok az egyes aminosavak pozícióját jelölik. A dA13-ban a Gly-Ala a VWF 1353-1458. aminosavakat helyettesíti, míg az Ala-Gly a 1686-1872 aminosavak helyére került. **B panel:** A VWF dimerek SDS PAGE vizsgálata. 293T sejteket transzfectáltuk teljes nagyságú C1149R-t, dA13-at, vagy mindkettőt kódoló plazmidokkal, amint az ábra alatt jeleztük. A sejt lizátumokat (L), illetve felülúszókat (S) vagy poliklonális anti-VWF (082), vagy monoklonális anti-A1-specifikus (B710) antitesttel immunprecipitáltuk. A mintákat redukáló körülmények között 5% SDS PAGE segítségével elemeztük, és a VWF-et Western blottal detektáltuk HRP-poliklonális anti-VWF segítségével. A bal oldalon az intracelluláris pro-VWF és a szekretált érett VWF mobilitását tüntettük fel. Az egyes alegység típusok molekulatömegei a következők: 350 kDa (C1149R-pro-VWF), 310 kDa (dA13-pro-VWF), 250 kDa (érett C1149R-VWF) és 205 kDa (érett dA13-VWF). Az utolsó két sáv a dA13 alegységeket is tartalmazza, ami csak ko-precipitáció (tehát a kétféle alegység heterodimer képződése) esetén lehetséges.

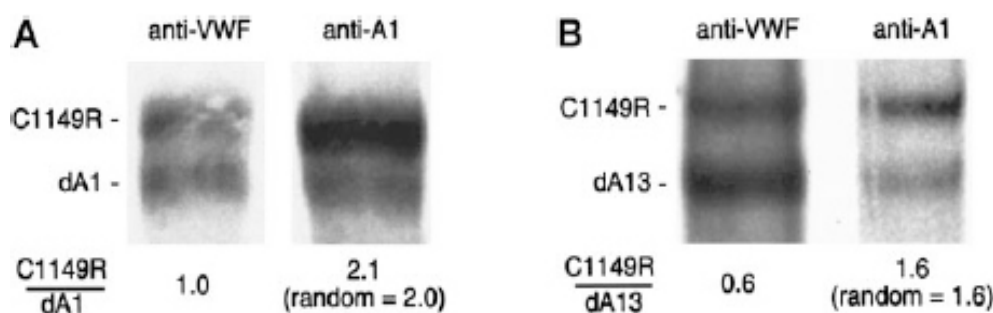
megfelelően, a B710 monoklonális antitest, mely egy A1 domén egyik epitópja ellen irányul, jól fölismeri a teljes nagyságú p.C1149R mutánst, de nem kapcsolódik a dA13-VWF-hez, és így nem precipitálja azt. Ezzel szemben, amikor mindkét VWF konstrukciót egyszerre expresszáltuk ugyanabban a sejtben, a sejt-lizátumok B710 antitesttel történő immunprecipitációja mind a teljes nagyságú p.C1149R, mind a dA13-pro-VWF alegység együttes immunprecipitációját eredményezte, bizonyítva, hogy e molekulák az ER-ban heterodimereket képeznek (**25. ábra**). Nem redukáló körülmények között végzett multimer gélelektroforézissel igazoltuk, hogy a sejt-lizátumok csak dimereket tartalmaznak, multimer nem (itt nem közölt adatok). Mindez egyértelműen bizonyítja az ER-ban történő heterodimer képződést.

Bár a p.C1149R mutáns csekély effektivitással szekretálódik a 293T sejtekben,<sup>143</sup> a ko-transzfektált sejtek felülcszójából a B710 antitesttel sikerült mind a p.C1149R, mind a dA13-VWF formák érett változatát kinyernünk (**25. ábra**, utolsó sáv). Ebben az immunprecipitátumban a p.C1149R dA13-hoz viszonyított aránya sokkal nagyobb, mint 1:1, ami a p.C1149R alegységek multimer képzésre való viszonylagos képtelenségét mutatja.<sup>143</sup> E defektus miatt a legtöbb p.C1149R alegység homodimerként és igen kicsi méretű multimerként volna megtalálható, melyet viszonylag csekély mennyiségű dA13 alegység kísér. Következésképpen a B710-el történő immunprecipitációtól azt várjuk, hogy főként p.C1149R alegységeket halásszanak ki a kétféle, p.C1149R és dA13-VWF-fel transzfektált sejtek kondicionált felülcszójából, amint azt ebben a kísérletben valóban megfigyelhetjük.

Az ilyen heterodimerek képződése nem magától értődő. A két különböző allél által kódolt VWF molekula nyilvánvalóan más és más poliriboszómákon képződik, és elképzelhető lenne, hogy az ER-ban a heterodimerizációt valamely térbeli elrendeződés gátolja. Ezért megvizsgáltuk, hogy a két különféle allélból származó pro-VWF molekulák heterodimerizációja vajon random folyamat-e, vagy a homodimer képződés mellett csak jelentéktelen másodlagos jelenség.

### ***A pro-VWF alegységek dimerizációja random reakció***

A heterodimerizáció effektivitását a kétféle pro-VWF féleség denzitometriás elemzésével vizsgáltuk az immunprecipitált lizátumokból. A poliklonális 082 antitest valamennyi VWF formát immunprecipitálja (itt nem közölt adatok), ezért lehetővé teszi, hogy meghatározzuk a p.C1149R és dA1 (**26. A ábra**) vagy dA13 (**26. B ábra**) egymáshoz viszonyított arányát. Ez az arány annak függvényében változik, hogy a különféle alegységek milyen effektivitással expresszálódnak az adott kísérletben. A monoklonális B710 antitest csak a p.C1149R mutáns



**26. ÁBRA. A denzitometriás analízis random dimerizációra utal.** A 293T sejteket A: p.C1149R-t és dA1-et, illetve B: p.C1149R-t és dA13-at kódoló plazmidokkal transzfektáltak. A sejt lizátumokat poliklonális *anti-VWF* (082) vagy monoklonális *anti-A1*-specifikus (B710) antitestekkel immunprecipitáltak. 5% poliakrilamid gél PAGE elektroforézist és Western blot detektálást követően a sávokat az „Anyagok és módszerek” részben leírtak szerint kvantifikáltuk. A nagyobb alegységnek (p.C1149R) a kisebbhez (dA1 vagy dA13) való arányát tüntetik fel a számok. Zárójelben a második egyenlet alapján *számított értéket* tüntettük fel, a kísérletben alkalmazott B710 anti-A1, tehát a p.C1149R-ra specifikus immunprecipitációval számolva. A mért és elméleti számított értékek hasonlóak.

alegységeket ismeri fel, ezért a B710-zel történő immunprecipitátum nem tartalmazza a dA1 vagy dA13 homodimereket. A főlösen alkalmazott B710-zel történő immunprecipitátum az összes p.C1149R alegység körülbelül 50%-át tartalmazza a lizátumban (itt nem közölt adatok). Mivel a B710 konformáció-érzékeny,<sup>155</sup> ez az eredmény arra utal, hogy az ER-ban az A1 domének egy része nem natív szerkezetű.

Random dimerizációt feltételezve elméleti alapon (4. egyenlet a „Betegek, anyagok és módszerek” fejezetben, 49. old.), azt várjuk, hogy a p.C1149R/dA1 vagy p.C1149R/dA13 arány a B710-es immunprecipitátumokban 1,0-del emelkedik a 082 antitesttel nyert értékekhez képest. A mért arányok közel állnak ezekhez a várt értékekhez (26. ábra). Ez az eredmény kizárja az exkluzív heterodimer vagy exkluzív homodimer képződést feltételező modelleket, és arra utal, hogy a pro-VWF molekulák közötti dimerizáció random folyamat az ER-ban. A tisztán random dimerizációtól való némi eltérés nem zárható ki teljesen eredményeink alapján, mivel a p.C1149R alegységeket nem kvantitatív módon nyertük vissza a B710 immunprecipitátumokban.

Az alegységek közti diszulfid hidak helye a VWF alegység C-terminális „CK domén” nevű legvége, az utolsó kilencven aminosavon belül körülírható fehérjerész (CK domén; lásd következő fejezet).<sup>52</sup> Ebből arra lehet következtetni, hogy a dimerizáció minden valószínűség szerint nem szimultán történik a transzlációval, hanem valamikor azt követően, hogy a polipeptid láncok teljes egészében az ER lumenébe kerültek. Továbbá az is nyilvánvaló, hogy bár a p.C1149R alegységek intracelluláris retenciója és lebontása minden bizonnyal különböző dajkafehérjék (*chaperonok*) kapcsolódását feltételezi a helytelenül hajtogatott N-terminus

közelében, e dajkafehérjék kapcsolódása láthatólag nem gátolja a C-terminusnál létrejövő dimerizációs folyamatot.

A random dimerizációból az következik, hogy a pro-VWF dimerek fele lesz heterodimer, egynegyedük pedig mutáns homodimer, így ha valamennyi mutáns egységet tartalmazó dimer retencióra kerül, akkor az várható, hogy a szekréciónak szintje a normális 25%-ára esik le. Amennyiben a plazmaszint arányos a termelés szintjével, akkor mindebből az következne, hogy e betegekben a VWF szint 25% körüli. A p.C1149R mutációjú betegek VWF szintje ennél alacsonyabb, 10-15% körüli, és itt meg kell jegyeznünk, hogy e súlyosabb csökkenés oka vizsgálatunk idejében még nem volt ismert.<sup>143</sup> A plazma VWF normálértéke széles tartományban mozoghat, és számos faktor befolyásolja, többek között az AB0 vércsoport vagy hormonális tényezők. Például a 0-s vércsoportú egyének VWF szintje átlagosan 75% ( $\pm 2SD$  36-157).<sup>214</sup> Tehát ha összeadódna a p.C1149R és a 0-s vércsoport hatása, akkor elméletileg elképzelhető lenne, hogy a kettős hatás okozza a betegekben megfigyelt értékeket. Azonban ez az elméleti lehetőség nem magyarázhatta a jelenséget az adott családban, mivel az egészséges családtagok VWF szintje 83-86% között mozgott, és az érintett családtagokban az AB0 vércsoport nem korrelált a VWF szinttel.<sup>143</sup> A jelenség alternatív magyarázata lehetne, ha a mutáns alegységet tartalmazó dimerek egy kis része mégis el tudná kerülni az ER retenció mechanizmusát, és át tudna kerülni a Golgi-apparátusba. Irodalmi megfigyelések szerint e „szökevény” hibásan hajtogatott fehérjék visszatartására a disztális szekretoros rendszerben is lehetőség van.<sup>215-218</sup> A hetero-oligomerek retenciója a Golgi apparátusból viszont megmagyarázhatná a megfigyelt súlyosabb VWF szint csökkenést, mivel ez a mechanizmus jóval több normál alegység visszatartását is eredményezné. E modell úgy adna magyarázatot a vártnál alacsonyabb plazma VWF szintre, hogy nem feltételezi a dimerek szökését követő egyik bioszintetikus vagy katabolikus lépés kóros voltát sem (multimerizáció, a W-P testekben való tárolás, a szekréciónak és a keringésben való túlélés). Két megfigyelésünk is alátámasztotta ezt a modellt: az érintett betegek multimer szerkezete közel normális volt, és DDAVP adására a VWF szint jelentősen megemelkedett plazmájukban (itt nem közölt adatok).

Bár a fenti „szökevény mutáns” néven aposztrofálható mechanizmus intellektuálisan vonzó, ezt bizonyítani eddig nem sikerült. Ugyanakkor a vizsgálatunk közzlése óta eltelt időben bebizonyosodott, hogy a p.C1149R életideje rövidült a plazmában,<sup>174</sup> amely mechanizmus már kielégítő magyarázatot ad a 25%-osnál alacsonyabb plazmaszintekre az érintett családokban. Hozzáteesszük, hogy a fenti, általunk leírt diszkrepancia volt az első jele annak, hogy a csökkent

szintézis nem mindig ad elegendő magyarázatot az alacsony plazmaszintre, és ez a megfigyelés indította el azokat a vizsgálatokat,<sup>219,220</sup> melyek alapján kiderült, hogy a fokozott plazma clearance igen jelentős szerepet játszik az 1-es típusú VWB egy alcsoportjában.

***A p.C1149R mutáns alegységek retenciója Cys<sup>1169</sup> jelenléte nélkül is bekövetkezik***

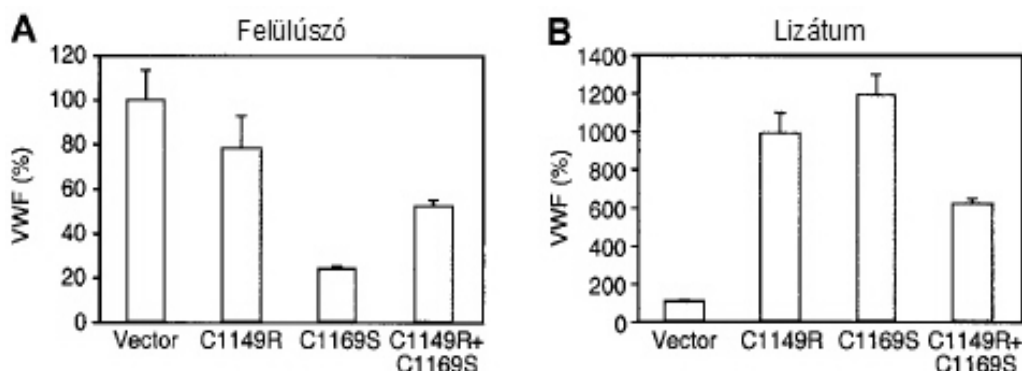
A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy a p.C1149R mutáció milyen oknál fogva vezet a VWF alegységek lebomlásához. Több fehérje esetében is ismert, hogy a pár nélkül maradt ciszteinek akadályozzák az intracelluláris transzportot, és elvben a C1149R-VWF fenotípusához is hozzájárulhatna ez a mechanizmus. A páratlanul maradt cisztein fehérjét retineáló hatására példa, hogy a sejtek redukáló anyagokkal való kezelése több fehérje reverzibilis felhalmozódásához is vezetett az ER-ban, mint például az influenza hemagglutinin,<sup>217</sup> albumin és aszialoglikoprotein receptor<sup>218</sup> esetében, de semmi hatása nem volt az  $\alpha_1$ -antitripszinre, melyben nincsenek diszulfid hidak.<sup>218</sup> Redukáló anyagok a VWF retenciójához is vezetnek az endotélsejtek ER-jában.<sup>221</sup> További példa az IgM, mely nem képes elhagyni az ER-t, míg egyik specifikus ciszteinje diszulfid kötést nem létesít a C-terminális másik ciszteinnel, és az adott cisztein mutációja megszünteti ezt a transzportblokkot.<sup>222</sup> Hasonló mechanizmust írtak le az acetil-kolinészteráz még össze nem kapcsolódott alegységei esetében.<sup>223</sup> Ezek a megfigyelések fölvetik annak reális lehetőségét, hogy a C1149R-VWF mutáns alegységek retenciójáért a Cys<sup>1169</sup> tiol csoport pár nélkül maradása lehet felelős, mivel a normál VWF molekulában a Cys<sup>1149</sup> a Cys<sup>1169</sup>-cel képez alegységen belüli diszulfid hidat.<sup>46</sup> Így a p.C1149R mutáció a Cys<sup>1169</sup>-et következképpen pár nélkül hagyja, ami a fenti okfejtésből következően megakadályozhatja az ER-ból való kilépést.<sup>222,223</sup> Annak eldöntésére, hogy a Cys<sup>1169</sup> pozíciójú tiol csoport hozzájárul-e a p.C1149R alegységek intracelluláris retenciójához, olyan molekulákat szerkesztettünk, melyekben jelen volt vagy a p.C1149R, vagy a p.C1169S, vagy mindkettő; és ezeket normál VWF molekulával ko-transzfektáltuk (**27. ábra**). A p.C1149R-gal történő koexpresszió csökkentette a VWF szekrécióját és növelte az intracelluláris koncentrációt, megerősítve korábbi megfigyeléseinket.<sup>143</sup> A p.C1169S és a kettős p.C1149R+p.C1169S mutációk lényegében azonos fenotípushoz vezettek. Vagyis a második Cys1169Ser mutáció hozzáadása nem csökkentette a p.C1149R mutáció fenotípusának

súlyosságát. Következésképpen a pár nélkül maradt Cys<sup>1169</sup> tiol csoport nem járul hozzá a p.C1149R mutáció által okozott intracelluláris retenció mechanizmusához. (27. ábra). Tehát a p.C1149R intracelluláris retencióját nem a pár nélkül maradt Cys<sup>1169</sup> tiol csoport okozza, hanem a mutációnak valamely kevésbé direkt hatása a fehérje hajtogatására.

A pro-VWF heterodimerek ER-ban történő retenciója és lebontása érdekes általános kérdéseket vet föl a fehérjeszintézis minőségi ellenőrzésével kapcsolatban. Az újonnan transzlált fehérjéket az ER dajkaféhrjéi (*chaperon-jai*) ismerik fel, melyek kapcsolódnak hozzájuk, és visszatartják a fehérjéket az ER-ban egészen addig, míg a hajtogatás pontosan be nem fejeződik.<sup>224</sup> Nem ismert, hogy a hajtogatás hibás voltát mely jelek révén ismeri fel a sejt, de úgy tűnik, hogy nagy fehérjék esetében e szignálok lokálisak lehetnek, vagyis a fehérjének bizonyos doménjai hibásan hajtogatottak, melyekhez továbbra is kapcsolódnak az illetékes dajkaféhrjék, de közben más domének hajtogatása helyes, melyről a dajkaféhrjék annak rendje és módja szerint leválnak.<sup>225</sup> A VWF p.C1149R mutáció mechanizmusáról szerzett ismereteink jól illeszkednek ebbe a modellbe, mivel az N-terminus közelében lévő mutáció az ER-ban való retenciót anélkül okozza, hogy a több mint 1500 aminosav távolságban és kb. 30 nm távolságban lévő C-terminus cisztin csomó doménjében létrejövő dimerizációt akadályozná.<sup>226,227</sup>

#### ***A p.C1149R mutáns pro-VWF alegységek a proteaszómában bomlanak le***

Az ER-ban csapdába esett fehérjék retenciójának és proteolitikus lebontásának egyik fő útja a proteaszómában történő emésztés.<sup>228</sup> Következésképpen a folyamat része az is, hogy az ER-ban a már létrejött diszulfid hidak redukálódnak, a polipeptid már hajtogatott része széthajtogatódik, és így válik lehetségessé a re-transzlokáció az ER specifikus pórusain

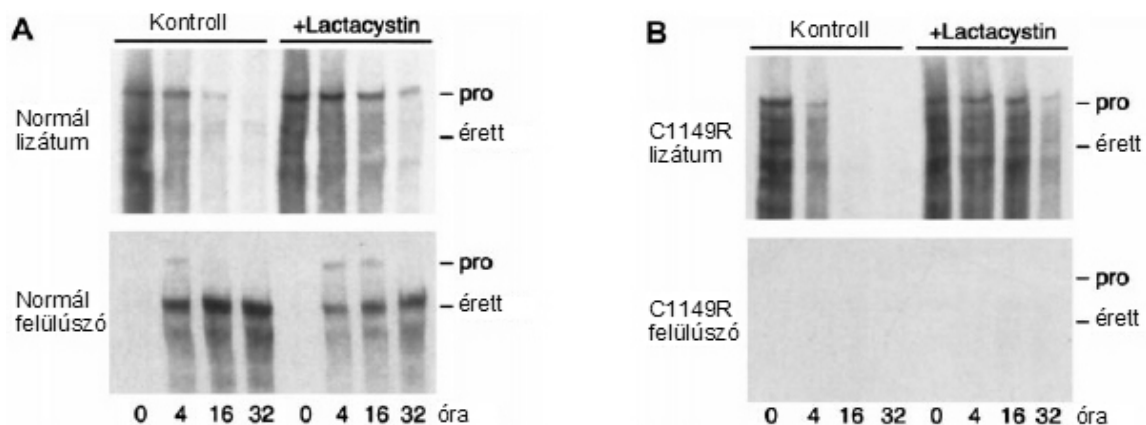


**27. ÁBRA.** *A p.C1149R, p.C1169S, és kettős p.C1149R-p.C1169S mutáns VWF fenotípusa hasonló.* A 293T sejteket ko-transzfektáltuk olyan pSVHVWF1 plazmidokkal, melyek normál VWF-et (3 µg) és a jelzett mutáns VWF-et (6 µg) kódolták. A felülúszó (A) és sejt lizátum (B) VWF koncentrációját ELISA módszerrel határoztuk meg. A kapott értékeket a kontroll (pSVHVWF1-gyel és vektor plazmiddal ko-transzfektált sejtek) százalékos arányában fejeztük ki. Mindegyik oszlop két független kísérlet átlagát ±SD mutatja. A 100% a felülúszó esetében 304 ng/ml-nek, a lizátum esetében 34 ng/ml-nek felel meg.



keresztül a citoplazmába.<sup>224</sup> Ezért a következő lépésben szeretnénk volna meggyőződni arról, hogy a C1149-VWF retenciója is a proteaszómában történik.

Ehhez az intracelluláris pro-VWF dimerek sorsának követése céljából izotóppal jelzett kísérletet terveztünk („pulse-chase” technika) lactacystin, egy specifikus proteaszóma inhibitor<sup>229</sup> jelenlétében, illetve távollétében (**28. ábra**). A normál VWF-et expresszáló Fur4BHK sejtekben a követés („chase”) negyedik órájában megjelent az intracelluláris pro-VWF, amely 16 órán belül lecsengett, majd eltűnt a sejtekből. A VWF fehérje szekréciója logikusan hasonló időzítést mutatott (**27. A ábra**). A lactacystin késleltette a VWF szekrécióját és elnyújtotta az ER-ből való clearance-ét. E normál VWF-fel nyert eredményekkel szöges ellentétben a p.C1149R mutáns VWF-et expresszáló sejtek nem szekretáltak detektálható mennyiségű VWF-et, és a jelzett molekulák csaknem teljes mennyisége négy órán belül



**28. ÁBRA.** A lactacystin hatása a normál és mutáns p.C1149R VWF szintézisére. Normál VWF-et (A) vagy mutáns p.C1149R-VWF-et (B) stabilan expresszáló BHK sejteket lactacystinnel vagy tápfolyadékkal (Kontroll) kezeltünk, és 30 percig jelöltük őket [<sup>35</sup>S]ciszteinnel és [<sup>35</sup>S]metioninnal („pulse”). Ezután jelöletlen tápfolyadékkal folytattuk a kísérlet követés („chase”) részét a jelzett időpontokban történő leállításig. A VWF-et a felülűszóból és lizátumokból immunprecipitáltuk, majd SDS-PAGE 5% poliakrilamid gél elektroforézissel elemeztük. A detektálás autoradiográfiával történt. A pro-VWF (kb. 350 kDa) és az érett VWF (kb. 250 kDa) alegység pozícióját feltüntettük a jobb oldalon.

lebontásra került (**27. B ábra**). A p.C1149R mutáns szekréciójának teljes hiányát ELISA méréssel is megerősítettük, mellyel a kondicionált felülűszóban nem találtunk VWF-et (itt nem közölt adatok). Ez azt mutatja, hogy a stabilan transzfektált BHK sejtek a mutáns VWF alegységeket még nagyobb hatékonysággal tartják vissza, mint az átmeneti transzfekcióval vizsgált 293T sejtek (**25. ábra**). A lactacystin proteaszóma inhibitor a mutáns pro-VWF alegységek eltávolítását több mint 16 óráig késleltette, mintegy stabilizálta az intracelluláris p.C1149R mutáns alegységeket (vagyis gátolta lebontásukat, **28. ábra**), mely egyértelműen bizonyítja, hogy a C1149R-VWF intracelluláris lebontásának szerves része a citoplazmába történő retrográd transzport és a proteaszómában történő emésztés.

A fenti kísérletek tehát meggyőzően bizonyították a mutáns és vad típusú allélok között random módon létrejött kapcsolatot, és azt is, hogy azok a normál alegységek is lebomlanak a proteaszómában, amelyekhez mutáns alegység kapcsolódott. Ez a megfigyelés-sorozat bepillantást enged a sejten belüli fehérjeszintézis minőségellenőrzésének folyamatába, és a von Willebrand betegség kérdéskörén messze túlmutató általános kérdések felvetésére is alkalmat ad.

A heterozigóta p.C1149R mutáció domináns negatív hatásából arra következtethetünk, hogy a mutáció következtében létrejött hajtogatási hiba elegendő szignált biztosít ahhoz, hogy ne csak a beteg, de a diszulfid híddal hozzákötött normál alegység is áldozatául essen ennek a lebontási folyamatnak. Ha belegondolunk abba, hogy e retro-transzláció során a diszulfid hidak bontásra kerülnek, akkor nyilvánvalóvá lesz, hogy előbb vagy utóbb a két alegységet összekötő diszulfid híd bontása is bekövetkezik, ami elválasztja egymástól a beteg és normál alegységet, azonban a lebomlás mégis folytatódik. Ebből indirekt módon arra következtethetünk, hogy létezik az ER-ban lebontásra kijelölt polipeptideket megjelölésére valamilyen mechanizmus, mely jelölést követően már nincs visszaút.

A fentiekben leírt domináns negatív hatásmechanizmus a heterozigóta VWF p.C1149R mutáción túl általában is érvényes lehet más oligomer/multimer szerkezetű fehérjékre. Ha egy mutáció úgy okozza a fehérje ER-ban történő retencióját, hogy közben nem akadályozza meg az alegység másik alegységekkel való kapcsolódását, akkor bekövetkezhet a teljes komplex retenciója és lebontása. Ezek a feltételek valószínűleg főként olyan fehérjék esetében következhetnek be, amelyeket alegységek közti diszulfid hidak kötnek össze, és elegendően nagyok ahhoz, hogy több, egymástól függetlenül hajtogatott doménjük is legyen, így válhat lehetővé a fehérje egyik részének hibás feltekeredése (*fold*ing), mely az egész oligomer ER-ban való retenciójához vezet. E mechanizmus potenciális példái lehetnek például a fibrinogén, mely polipeptid összetétele  $(\alpha\beta\gamma)_2$  és melynél ismertek a hipofibrinogénémia autoszomális domináns formái. Különösen azok között a betegek között feltételezhetünk hasonló mechanizmust, akiknél ismert, hogy aminosavcserét eredményező (misszensz) mutáció gátolja az alegység szintézisét,<sup>230,231</sup> vagy a fibrinogén fehérje intracelluláris felhalmozódásához vezet.<sup>231,232</sup> Azonos mechanizmus okozhatja a heterozigóta kollagén mutációk által létrehozott kórképeket is, melyekben a kollagén  $\alpha$  láncának aminosavcserét eredményező (misszensz) mutációiról ismert, hogy domináns módon okoznak osteogenesis imperfectát<sup>233</sup> illetve hipokondrogenezist.<sup>234</sup> E hipotézis teszteléséhez, akárcsak a VWF esetében, olyan módszerre

lesz szükség, melynek segítségével a mutáns és egészséges alegységeket egymástól el lehet különíteni, hiszen az különböző allélok egymáshoz való kapcsolódását csak így lehet bizonyítani.

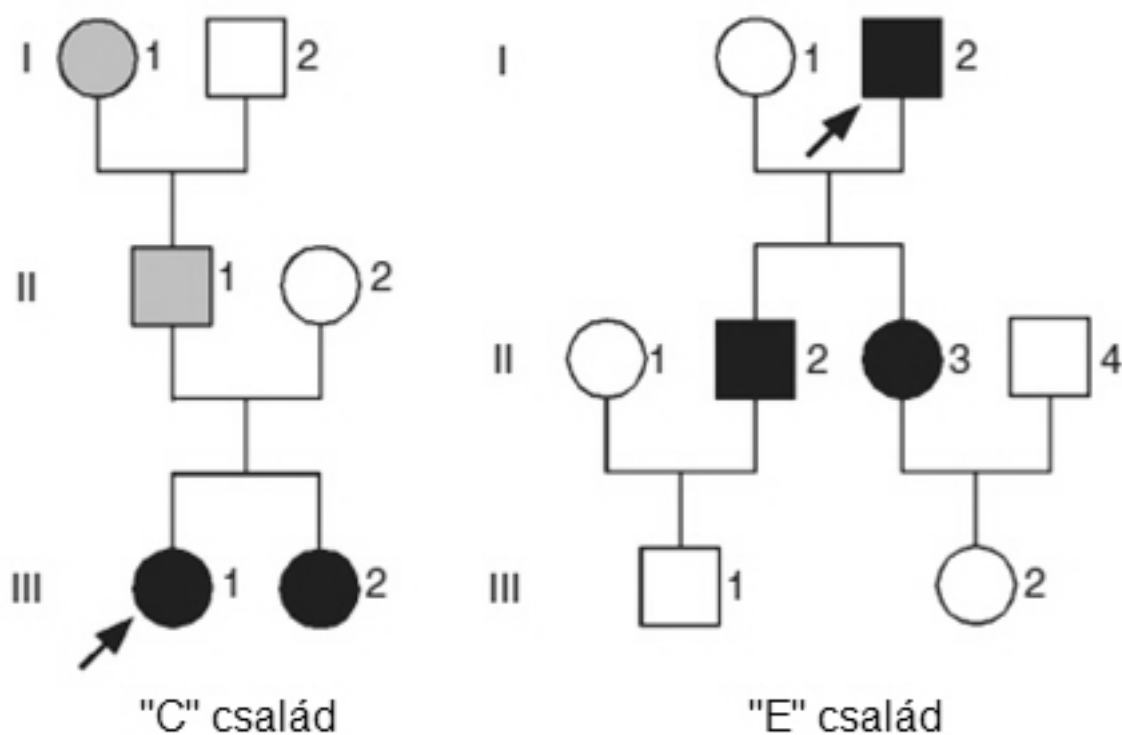
*Összefoglalva*, ebben a munkában azt sikerült egy modellrendszer segítségével bizonyítani, hogy a mutáció miatt hibásan feltekeredett VWF alegység az ER minőségellenőrző rendszerén fennakadva a proteaszómában kerül lebontásra, de ebbe a „fehérjesírba” magával viszi a hozzá kapcsolódott ép alegységet is. Így az ER-ból a Golgiba és onnan szekrécióra kerülő VWF mennyisége sokkal kevesebb lesz, mint amit az egyik allél kiiktatása egyébként okozna. Minthogy ez a domináns negatív hatás más fehérjéknél is megfigyelhető, a mechanizmus általánosítható az oligomer formájú fehérjék domináns negatív mutációinak magyarázatára.

## A VWF clearence jelentősége: A Vicenza variáns molekuláris patogenezeise<sup>235</sup>

### *A súlyos 1-es típusú VWB egy részének hátterében a Vicenza variáns áll*

Amint az előző fejezet elején kitértünk rá, az 1-es típusú VWB okainak vizsgálata a kelet-magyarországi régió vérséves betegeit ellátó Debreceni Egyetem II. Belgyógyászati Klinika nyilvántartása segítségével rávilágított, hogy a nagy penetranciájú súlyos 1-es típusú VWB az 1-es típuson belül ritka<sup>127</sup>. A **29. ábra** mutatja a debreceni nagy penetranciájú súlyos 1-es típusú csoportban talált két Vicenza család családfáját (melyek betűjele C és E volt). Bár a családok kis létszámúak, a domináns öröklődés menet jól megfigyelhető.

Az 1-es típusú betegekről rendelkezésre álló adatok alapján váratlan eredménynek számított a Vicenza variáns ilyen nagymértékű reprezentáltsága. Így, figyelmünk e rejtélyes kórkép felé fordult, és a kutatás a továbbiakban a *Vicenza variáns patogenezeisére* irányult.



**29. ÁBRA.** A két Vicenza család (VWB, Vicenza variáns) családfája. Szürkén vannak jelölve azok a családtagok, akik az anamnézis szerint vérsévesek, de laboratóriumi adataik nem állnak rendelkezésre. A bizonyítottan érintett családtagok feketén jelzettek.

### *A Vicenza variáns jellemzése*

A von Willebrand betegség Vicenza variánsát eredetileg 1988-ban az olaszországi Vicenza tartományában írták le<sup>236</sup> (innen a név), amelyet később Németországból,<sup>237</sup> Törökországból<sup>237</sup>

és Magyarországról<sup>127</sup> származó beszámolók követtek. A VWB Vicenzát nagy penetranciájú autoszomális domináns öröklődésű, alacsony plazma és normális vérlemezké VWF szintek jellemzik. A VWF antigén és aktivitás szintje arányosan csökken, és a betegek egy részében ultra-nagy VWF multimerok (UL-VWF) vannak jelen.<sup>236</sup> A szerzők egy része rámutatott arra is, hogy a multimer gélen a szatellita sávok kevésbé kifejezettek.<sup>219</sup> E különös fenotípus hátterében a heterozigóta p.R1205H aminosavcserét sikerült kimutatni.<sup>238</sup>

A p.R1105H mutációhoz kapcsolható Vicenza fenotípus<sup>236</sup> a nagy penetranciájú súlyos 1-es típusú VWB kategóriában különleges helyet foglal el. Eleinte a 2M csoportba sorolták, mivel sok családban ultra-nagy multimerok (ULMW-VWF) jelenlétét észlelték/észleltük. Így a multimer szerkezet a normálistól eltérő volt ugyan de – nagyrészt saját munkánkból – hamarosan kiderült, hogy funkcionálisan a VWF fehérje intakt, ezért az újabb beosztás az 1-es típusba sorolja.<sup>4</sup>

A VWB Vicenza patogenezise a betegség leírása óta rejtély. 2002-ben Casonato és munkatársai ugyan leírták, hogy e betegekben a DDAVP adás utáni VWF túlélése a plazmában megrövidült,<sup>219</sup> de ezt a tanulmányt metodikai okok miatt kételkedve fogadta a tudományos közvélemény<sup>239</sup> (lásd később). Bár a fokozott clearance, amennyiben a fenntartások ellenére valósan bizonyul, magyarázatot adhatna az alacsony VWF szintekre a Vicenza típusú VWB betegeknel, az azonban továbbra sem volt világos, hogy az UL-VWF multimerok jelenléte ok, következmény vagy egy független jelenség-e.<sup>219</sup> Hasonlóképpen továbbra is magyarázatra szorult a multimer szatellita mintázatában megfigyelt csekély eltérés. Két hipotézis keletkezett az UL-VWF multimerok magyarázatára. Az egyik szerint a konstitutív szekréció sérülése vezet az UL-VWF multimerok jelenlétéhez. A Vicenza betegek UL-VWF multimerjei valóban hasonlítanak a trombocitákban megfigyelhető (és feltehetően a W-P testekben tároltához hasonló struktúrájú), illetve a DDAVP adás után a W-P testekből frissen kilökött VWF multimerokhoz.<sup>238</sup> A másik alternatív hipotézis azt feltételezte, hogy a mutáns alegységek ektópiás módon már az endoplazmás retikulumban (ER) multimerizálódnak, ami egyszerre adhatna magyarázatot a túlzottan nagy multimerok jelenlétére, és – más magas penetranciával öröklődő 1-es típusú VWB variánsokhoz hasonlóan – az igen alacsony VWF szintekre is. Az ektópiás multimerizáció hipotézisét munkacsoportunk állította fel, a mutáns alegységek egész oligomerek retencióját okozó hatásának analógiája alapján<sup>127</sup> (a jelenséget az előző fejezetben fejtettük ki).

Ebben a vizsgálatban a fenti (ektópiás multimerizáció) hipotézist szeretnénk volna tesztelni, illetve negatív válasz esetén a gondolkodást kiterjesztve azt próbáltuk megfejteni, hogy a p.R1205H aminosavcsere milyen más mechanizmussal hozhatja létre a Vicenza fenotípust (alacsony plazma VWF, normál vérlemezke VWF és UL-VWF jelenléte a plazmában). Az alábbiakban részletesen bemutatandó kísérletekben bizonyítjuk, hogy a rekombináns rVWF-R1205H bioszintézise azonos a vad típusú VWF bioszintézisével. Továbbá cáfoljuk az ektópiás multimerizáció hipotézist, mivel a mutáns és a vad típusú VWF multimerek intracelluláris szintézise egyaránt érzékenynek bizonyult a Golgit bénító monensinre, hozzáátve, hogy a sejt lizátumok nem is tartalmaztak detektálható mennyiségű multimert.

### ***A két debreceni Vicenza VWB család érintett tagjainak fenotípusa jellegzetes***

A vizsgálatot a családok érintett és nem érintett tagjainak részletes anamnézisével és laboratóriumi vizsgálatával kezdtük. Az érintett tagok középsúlyos vérzékenységben

**19. TÁBLÁZAT. A Vicenza családok klinikai és laboratóriumi\* adatai**

Család- tag	ABO	VWF:Ag (%)	VWF:RCo (%)	VWF:CB (%)	FVIII (%)	aPTI (s)	Ivy (perc)	Multimer <sup>†</sup>	PFA <sup>‡</sup>	Vérzés
C-III-1	0	17	<10	ND	9	34,7	12	UL	ND	N-E-T
C-III-2	0	8	<10	ND	ND	ND	14,5	UL	Abnorm	Nem volt
E-I-2	A	14	<10	6,8	12	48	12	UL	Abnorm	N-G-B-GI
E-II-2	0	6	<10	8,5	17	45,8	20	UL	Abnorm	N-B
E-II-3	A	16	<10	8,0	20	49,6	15	UL	Abnorm	N-M-P
E-III-1	0	83	64	ND	148	37,5	ND	Norm	ND	N-B
E-III-2	0	116	122	ND	206	41,2	ND	Norm	ND	Nem volt

VWF: von Willebrand faktor; N: orrvérzés (nasalis haemorrhagia); E: post-extractiós vérzés; T: post-tonsillectomiás vérzés; G: ínyvérzés (gingiva haemorrhagia); M: menorrhagia; B: „easy bruising”; GI: gastrointestinalis vérzés; P: post-partum vérzés (vastagon szedtük a major vérzést). \*A laboratóriumi normálértékek a következők: VWF:Ag: 50-150; VWF:RCof: 50-150; VWF:CB: 50-150; FVIII: 50-150; aPTI (aktivált trombolasztin idő): 25-35; Ivy vérzési idő: <10 perc; <sup>†</sup>UL: ultra-nagy multimerek jelenléte; <sup>‡</sup>A PFA-100 (platelet function analyzer-100) kétféle töltetével (kollagén/epinefrin és kollagén/ADP) hasonló eredményeket kaptunk.

szenvedtek, csak az E-I-2 jelű betegnél jelentkezett major vérzés. Az anamnesztikus és laboratóriumi adatokat a **19. táblázat**ban foglaltuk össze.

### ***A Vicenza típusú VWB betegekben az endogén R1205H-VWF clearance jelentősen fokozott az exogén (vad típusú) VWF clearance-éhez képest***

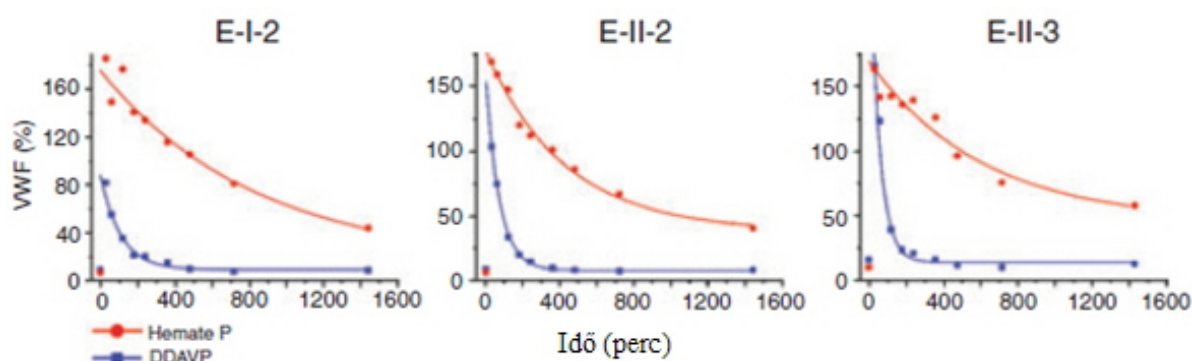
Ezek után arra voltunk kíváncsiak, hogy az akkor még friss és vitatott eredménynek számító gyorsult clearance észlelhető-e a magyarországi Vicenza betegek esetében is. A méréseket úgy akartuk megtervezni, hogy a Casonato eredményeivel<sup>219</sup> kapcsolatos kételyeket teljesen eloszlassuk. Ugyanis, amint azt fentebb már említettük, Casonato és munkatársai megfigyelését joggal kritizálták azért, mert normál kontrollként olyan egyéneket használtak, akiknek VWF szintje normális volt, ahelyett, hogy a Vicenza betegekhez hasonlóan alacsony VWF koncentrációval rendelkező 1-es típusú betegeket használtak volna kontrollnak.<sup>239</sup> A kritika

alátámasztására két 1-es típusú betegről is beszámolnak, akiknek p.C1130F mutációjuk volt, ám VWF clearance-üket szintén gyorsultnak találták, hasonlóan a Vicenza fenotípushoz.<sup>239</sup> A VWF féléletidejének alacsony számú személyek közötti összehasonlítása azért is problémás, mert a VWF szintek közismerten igen széles határok között mozoghatnak, ami normál körülmények között is jelentős variációt tükröz a VWF termelésben és/vagy clearance-ben. A problémát tovább fokozza a DDAVP-re adott összetett válasz, valamint az a tény is, hogy a VWF féléletidejének pontos meghatározásához sok időpontban levett mintavételre van szükség.

A kétségek eloszlatására tehát két újítást vezetünk be: egyrészt a VWF felezési idő mérését egy (a DDAVP beadás időpontjában induló) 10 pontból álló interpolált időgörbe alapján végeztük, mely az addig az irodalomban szereplő adatoknál jóval pontosabbnak és reprodukálhatóbbnak bizonyult. Másrészt a kontroll csoporttal kapcsolatos fent kifejtett problémák áthidalására kontrollként nem egészséges egyének vagy egy másik betegcsoport szolgált, hanem ugyanazokban a személyekben hasonlítottuk össze a DDAVP adás utáni *endogén* VWF szint csökkenés sebességét az *exogén* módon adott Haemate P adás után hasonló precizitással mért csökkenéssel. A Haemate P egészséges egyének plazmájából készül, tehát normális, azaz vad típusú VWF forrásnak tekinthető.

Az „E” családból származó három Vicenza VWB betegnek DDAVP-t adtunk standard (0,3 µg/kg) dózisban 15 perces infúzióban. Vérmintát a következő időpontokban vettünk: 0, 30, 60 perc és 2, 3, 4, 6, 8, 12 és 24 óra. A Haemate P-t egy legalább kéthetes kiürülési periódus után adtuk, 60 egység/kg dózisban (VWF:RCo egységben mérve). A VWF:Ag szint jóval gyorsabban csökkent DDAVP adása után (felezési idő,  $\pm$ SD: 0,72 $\pm$ 0,12 óra), mint Haemate P után (felezési idő 5,93 $\pm$ 2,28 óra) (**30. ábra**). A különbség statisztikailag is szignifikáns volt. Vicenza betegeinkben az átlagos (DDAVP után mért) saját VWF:Ag felezési idő az exogén vad típusú VWF felezési idejéhez képest kilencszer rövidebbnek adódott. Ugyanakkor az exogén vad típusú VWF felezési ideje hasonló volt, mint amit normál kontrollokban (n=5) mértünk (**20. táblázat**).

A DDAVP adás után észlelt multimer mintázatot a **31. ábra** mutatja. A normál kontrollokon kívül még két ismert mutációval rendelkező beteg is összehasonlítási kontrollként szolgált; az A család II-1-es tagjának heterozigóta p.C1130Y mutációja van, mely súlyos 1-es típusú VWB-t okoz, míg a B család III-2-es tagjának heterozigóta p.R1597Q mutációja 2A típusú VWB-ben manifesztálódott. A C1130Y-VWF felezési ideje a vad típushoz képest negyedére csökkent (1,2, illetve 4,79 óra DDAVP, illetve HP után), míg a R1597Q-VWF felezési ideje hasonló volt a vad típuséhoz (4,33 és 5,3 óra) (**20. táblázat**). Hasonló eredményeket kaptunk a VWF:RCo és a FVIII mérése kapcsán (itt nem közölt adatok) azzal a kivétellel, hogy a R1597Q-VWF VWF:RCo aktivitás felezési ideje jelentősen csökkent (0,78, illetve 3,18 óra). E jelenség



**30. ÁBRA. Vicenza betegeknél fokozott az R1205H-VWF clearance-e.** A betegeknek DDAVP-t és legalább két hét elteltével Haemate P-t adtunk. A VWF:Ag szintet a 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 8, 12 és 24 órai időpontokban mértük. Az endogén R1205H-VWF sokkal gyorsabban ürül ki, mint a Haemate P-vel beadott exogén vad típusú VWF.

nyilvánvaló magyarázata a 2A típusú VWB betegségben észlelhető fokozott érzékenység a hasító enzim iránt. A másik Vicenza család („C” család) két érintett tagja nem kívánt részt venni a vizsgálat DDAVP/HP részében.

Fent már utaltunk rá, hogy a VWF clearance-ének mérése technikailag nem könnyű. Egy-egy időpont mérésében bekövetkezett csekély laboratóriumi hiba is a becsült felezési idő viszonylag nagy eltéréseihez vezethet. Ennél fogva a pontosabb összehasonlításokhoz elengedhetetlen, hogy a DDAVP (vagy Haemate P) adása után a lehető legnagyobb számú

**20. TÁBLÁZAT. VWF:Ag clearance különféle VWB altípusokban**

Család	Személy	Mutáció)	$T_{1/2}$ -DDAVP (óra)	$T_{1/2}$ -HP (óra)	VWF:Ag alapvonal (%)	VWF:Ag csúcs* (%)
E	I-2	R1205H	0,99	9,71	10	97
E	II-2	R1205H	0,84	4,96	8	103
E	II-3	R1205H	0,59	7,09	16	165
<b>Átlag ± SD</b>			0,81±0,2	7,25±2,38	11,3±4,2	121,7±37,7
A	II-1	C1130Y	1,20	4,79	12	27
B	III-2	R1597Q	4,33	5,3	84	198
<b>Kontroll (n = 5)</b>			5,59±2,22	N/A	70±21	181±33

VWB: von Willebrand betegség; VWF: von Willebrand faktor

\*A DDAVP adás után mért legmagasabb koncentráció.

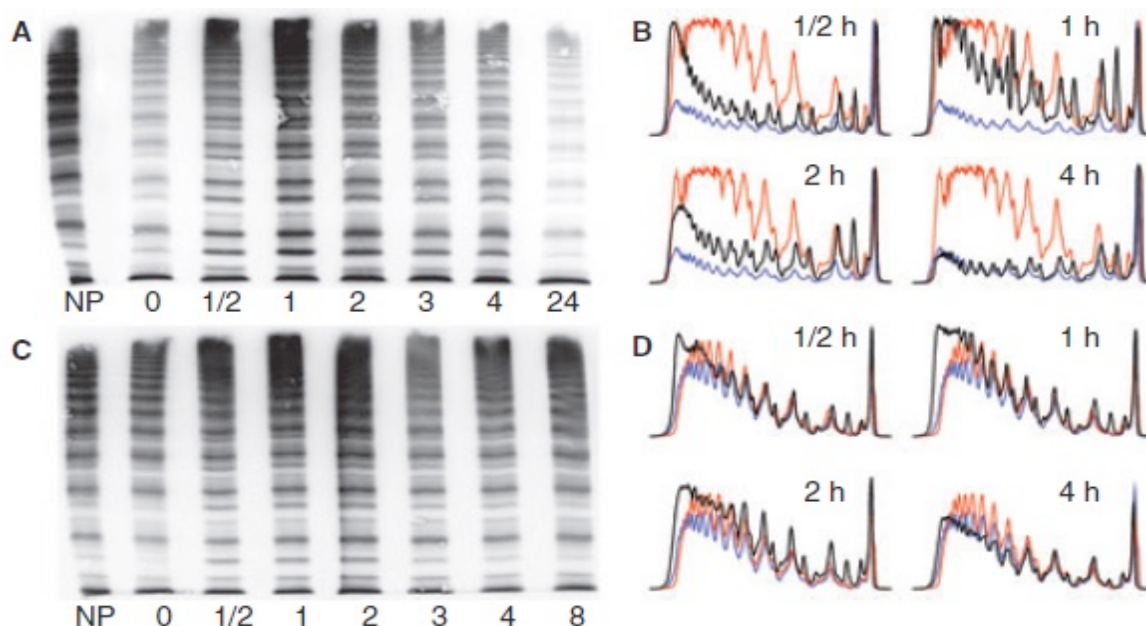


időpontban történt méréseket használjuk. Az általunk bevezetett 10 pontból álló görbe jelentősen csökkentette a clearance mérésének belső pontatlanságát. Mindezt összesítve megállapíthatjuk, hogy adataink kétséget kizáróan bizonyították, hogy emberben a R1205H-VWF clearance-e egy nagyságrenddel gyorsabb a VT-VWF clearance-énél. Ez az eredmény a rágszálókban tett megfigyelésekkel is szinkronban van, ahol a R1205H-VWF szintén jelentősen rövidült plazmatúlélést mutatott.<sup>164</sup>

Így tehát nemcsak megerősítettük, hanem ki is terjesztettük, és bizonyító erővel támasztottuk alá Casonato és munkatársai<sup>219</sup> megfigyelését, hogy a Vicenza betegekben a VWF plazma életideje lerövidült. Adataink nyilvánvalóan mutatják, hogy a R1205H-VWF felezési ideje hozzávetőlegesen egy nagyságrenddel rövidebb, mint a vad típusú VWF felezési ideje ugyanazon betegekben. Ezt az eredményt a von Willebrand faktorról foglalkozó nemzetközi kutató közösség széles körben elfogadta és idézi.

#### ***A Vicenza betegek multimer mintázata DDAVP adás előtt és után***

A DDAVP adást követő változás nem csak a VWF plazmaszintet érintheti, hanem a multimer eloszlás változásának vizsgálata is érdekes tanulságokkal szolgálhat. Az egyik Vicenza beteg multimer mintázata DDAVP adás előtt és után a **31. ábrán** látható. Amint azt az ábra mutatja, az E-II-3 betegnél alacsony VWF szintet és az UL-VWF szokatlanul magas arányát találtuk. Továbbá a proteolitikus darabokat tartalmazó szatellita sávok a szokásosnál



**31. ÁBRA. VWB Vicenza beteg multimer mintázata DDAVP adás előtt és után.** Az ábra az E-II-3 beteg (A panel) és normál kontroll (C panel) SDS agaróz elektroforézises multimer mintázatát mutatja DDAVP előtt és után a jelzett időpontokban. A beteg (B panel) és normál kontroll (D panel) multimerjeinek denzitometriás elemzését a 0, 1/2, 1, 2 és 4 órás időpontokban mutatjuk. Az összehasonlítás elősegítésére a beteg, illetve a normál kontroll 0 időpontban vizsgált görbéjét kék vonal mutatja, míg az a normál plazma kontroll pirossal van ábrázolva. NP: normál plazma.

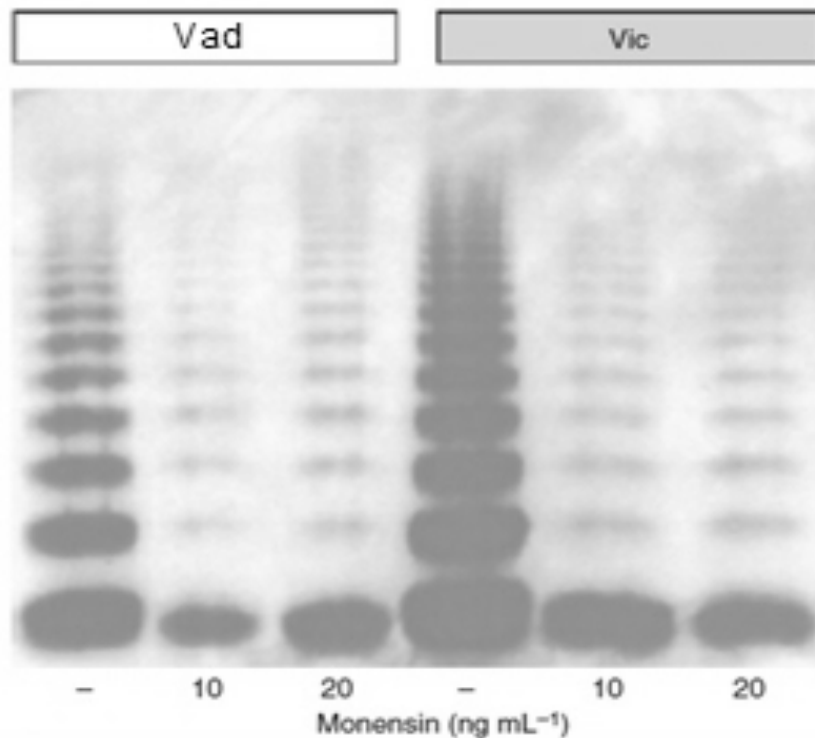
halványabbak. DDAVP adása után azonban a szatellita sávok átmenetileg kifejezettebbé válnak egészen az egyensúlyi állapot eléréséig (az adás után 4 órával).

Bár a gyorsult clearance megmagyarázza a Vicenza betegekben észlelt alacsony VWF szintet, az még mindig nem volt világos, hogy az ultra-nagy VWF (UL-VWF) a Vicenza fenotípusban ok, következmény vagy esetleg egy független epifenomén.<sup>239</sup> Következő célkitűzésünk tehát az UL-VWF jelenlétének magyarázatára alkotott két korábbi hipotézis (ektópiás multimer szintézis az ER-ban, illetve a konstitutív szekréció sérülése) tesztelése volt. Minthogy a konstitutív vs. regulált szekréció szétválasztására nem rendelkezünk metodikával *in vivo*, ezért csak az ektópiás multimerizáció hipotézisét tesztelésére volt módunk. Erre a célra rekombináns R1205H-VWF mutáns fehérjét szerkesztettünk.

### ***A rekombináns vad típusú és R1205H-VWF szintézise és multimer szerkezete megegyezik***

Az p.R1205H mutációnak a VWF szintézisére gyakorolt hatását 293T sejtekben expresszáva vizsgáltuk. A 293T sejtekbe VT-rVWF és R1205H-rVWF vektorokat vittünk be. Választ kerestünk arra a kérdésre is, hogy az R1205H-rVWF nagyobb hatékonysággal képez-e multimereket a Golgiban. E kérdés tisztázására a Golgi működését monensin kationos ionofor segítségével gátoltuk.<sup>146</sup> A 293T sejtek felülúszóiban ELISA módszerrel mértük a mutáns és

vad típusú VWF szintjét, melyek hasonló mennyiségben termelődtek (itt nem közölt adatok), és a monensin hasonlóképpen gátlólag hatott mind a mutáns, mind a vad típusú VWF multimerizációjára (32. ábra). Következésképpen az ER-ban történő ektópiás multimer képződés nagy valószínűség szerint nem játszik szerepet a Vicenza fenotípus kialakításában.



**32. ÁBRA. A vad típusú és R1205H rVWF multimer szerkezete.** A vad típusú és mutáns VWF-t 293T sejtekben expresszáltuk. Sem a multimer mintázat, sem a VWF fehérje szekréciójának mértéke nem különbözött a vad típusú és mutáns plazmákkal transzfektált sejtek felülcszói között, sem a kezeletlen sejtek, sem a monensinnel (a Golgi működését gátló ionofor, mely akadályozza a multimerizációt a Golgiban) kezelt sejtek esetében.

Összesítve, ezek az adatok azt mutatják, hogy az ektópiás multimer képződés az ER-ban igen valószínűtlen oka az ultra-nagy multimerek kialakulásának, tehát korábbi hipotézisünket<sup>127</sup> elvethetjük.

A fenti kísérletekkel ugyan a fölvetett konstitutív szekréció sérülésére vonatkozó adatot nem sikerült nyerni, de az a tény, hogy a vad típusú VWF és a mutáns R1205H-VWF között semmiféle strukturális különbséget nem találtunk, és szintézisük is teljesen azonosnak bizonyult, egyre inkább arra utalt, hogy a mutáció nem a VWF fehérje termelésén, hanem katabolizmusán keresztül fejt ki hatását. Emberben a plazmafehérjék katabolizmusát nagyon nehéz kísérletesen vizsgálni (általában izotóppal jelzett fehérjék útját van csak mód követni, ami emberben etikai korlátokba ütközik), ezért újszerű vizsgálóeljárást fejlesztettünk ki a biológiai folyamatok matematikai számítógépes modellezésének bevezetésével. A modell



mindig csak egyetlen paramétert változtatva (**33. ábra**). A felezési idő tizedrészére való csökkentése 12 órától 1,2 órára (amely változás hasonló a betegekben megfigyelt felezési idő csökkenéshez) mindenben reprodukálta a VWB Vicenza multimer mintázatát. A clearance-nek ilyen mértékű fokozása az egyensúlyi helyzetben a VWF szintet 12%-ra csökkentette, ami szintén típusos érték ezekben a betegekben. Viszont ha a  $k_{op}$ -ot ötszörösére növeltük (mely az  $N_{op}$  178-ról 145-re való csökkenésének felel meg), típusos 2A típusú VWB-nek megfelelő multimer mintázatot nyertünk (**33. ábra**).

Természetesen óvatossá kell lennünk bármely olyan komplex modell interpretálásánál, amely számos beviteli paraméterrel dolgozik. Éppen ezért kimerítő validálási munkát végeztünk, hogy meggyőződhessünk róla, hogy a számítógépes szimulációk valóban megfelelnek a mérhető biológiai folyamatoknak (**5.-6. ábra** a „Módszerek” fejezetben). Miután sikerült úgy optimalizálnunk a paramétereket, hogy azok tükrözzék az ismert irodalmi adatokat és saját független megfigyeléseinket a VWF túléléssel kapcsolatban, a modell pontosan a várt multimer mintázatokat szolgáltatva, mind egyensúlyi helyzetben, mind pedig a DDAVP adást követően. A Vicenza VWB esetében a clearance felgyorsítása önmagában is az UL-VWF multimer mintázat megjelenését, a betegekben észlelhetőnek megfelelő csökkent VWF szintet és a DDAVP utáni gyorsult VWF kiürülést eredményezte. Ezen túlmenően megfigyelhettük, hogy a transzfundált vad típusú VWF (Haemate P) clearance-e normális volt valamennyi vizsgált Vicenza VWB betegben. Tehát a megfigyelt UL-VWF multimerek magyarázata kizárólag a megnövekedett clearance. Ezt didaktikusan úgy értelmezhetjük, hogy megrövidül az az idő, amely során az újonnan szekretált VWF ki van téve ADAMTS13 hasításnak, ami törvényszerűen a kezdeti nagyobb multimerek felé való eltolódáshoz vezet.

Továbbá a modell alapján azt várnánk, hogy az aleggységek proteolíziséből származó VWF multimer szatellita sávok kevésbé feltűnőek lesznek a Vicenza betegekben. A szatellita sávok csökkenését már korábban is leírták,<sup>219</sup> s ezt mi magunk is megfigyeltük (**30. ábra**). Kvantitatív számolásokat, illetve méréseket is végeztünk, melyek azt mutatták, hogy az E-II-III beteg dimer körüli szatellita/fő sáv aránya 20%-kal alacsonyabb volt a normál kontrollhoz viszonyítva. Ez az arány a matematikai modell szerint 38% csökkenést mutatott (itt nem közölt adatok). Ez a jelenség logikus következménye az R1205H-VWF gyors kiürülésének, ami kisebb esélyt ad a proteolitikus hasításra. Szem előtt kell azonban tartanunk, hogy a gyorsult clearance-re vonatkozó megfigyelés csak az egyensúlyi állapotra vonatkozik. A tárolt UL-VWF DDAVP által kiváltott keringésbe kerülésekor a nagyméretű multimerek ugyanannak a (méretüknél

fogva erőteljes) hasításnak vannak kitéve, mint a normál VWF hasonló méretű multimerjei, amíg az egyensúlyi állapot újra be nem áll (**30. ábra** korai időpontjai).

Az irodalom szerint nem minden p.R1205H mutációval rendelkező beteg mutatta az itt leírt UL-VWF multimer jelenlétét, még igen érzékeny multimer technika alkalmazása esetén sem. A genotípus és fenotípus közötti kapcsolat ezen ingadozására jelenleg nincs magyarázat. Legjobb tudomásunk szerint a mai napig nem rendelkezünk publikált információkkal e normál multimerrel rendelkező Vicenza betegek pontos VWF felezési idejét illetően. Bár az nyilvánvaló, hogy a p.R1205H csökkentette a VWF felezési idejét minden egyes betegben, akiben ezt vizsgálták, a VWF clearance-nek számos egyéb tényezője is van (például a jelenleg ismeretlen clearance receptorban fellépő eltérések), és a matematikai modellezés azt mutatja, hogy a felezési időben bekövetkező viszonylag csekély növekedés is elegendően eltolhatja a multimer eloszlást a normális felé. Ha a plazma VWF felezési idejét 1,2 (Vicenza VWB) és 12 (normál) óra között változtatjuk, egy igen szűk „multimer átcsapási zónát” figyelhetünk meg, amelyben a modellezett multimer mintázat az UL-VWF-től a normális felé mozdul el. Az igen rövid, 1,2 órás felezési idő UL-VWF multimeret eredményez, míg a közepesen csökkent, 4-6 órás felezési idő olyan multimer mintázatot szolgáltatott, amelyet igen nehéz lenne a normálistól elkülöníteni (**33. ábra**). Ezen kívül a multimer nagyságnak egyéb meghatározó tényezői is lehetnek (például az ADAMTS13). E fenti tényezők együttesen magyarázhatják a plazma VWF multimer eloszlásában észlelt variánsokat a különböző R1205H-VWF betegek esetében.

Az R1205H-VWF nem az egyetlen olyan VWB altípus, melyben rövidült VWF túlélést írtak le. A p.C1130F<sup>239</sup> és p.C1149R<sup>174</sup> mutációval bíró VWB betegek VWF:Ag felezési ideje 1,5 óra volt, míg a D3, illetve D4 doménben található p.W1144G és p.S2179F mutációk a 1-3,6 órás VWF antigén felezési időt mutattak.<sup>220,240</sup> Más, 1-es típusú VWB betegekben is leírták a gyorsult VWF clearance-t, amit vagy a VWF propeptid/VWF antigén arány felhasználásával,<sup>173,175</sup> vagy a DDAVP utáni VWF antigén szint csökkenésének sebességéből számoltak ki.<sup>241</sup> Többen megfigyelték azt is, hogy a VWF antigén felezési idő korrelálni látszik a VWF kiindulási szinttel.<sup>220,240</sup> A kérdés logikus: ezekben a betegekben miért nem látunk UL-VWF multimeret? Nem zárhatjuk ki teljesen azt a lehetőséget, hogy bizonyos mutációk a multimer eloszlásra és ezáltal a VWF biológiájára több, ellentétes irányú hatás erejéig hatnak. Például egy mutáció növelheti a clearance-t, és egyidejűleg gátolhatja a multimerizációt, amely hatások eredője egy közel normál multimer mintázat lehet.

Mindazonáltal, amint azt az előző bekezdésben is tárgyaltuk, a matematikai modell nem ezt a magyarázatot sugallja, legalábbis e mutációk legtöbbjében. Inkább arról lehet szó, hogy a felezési idő viszonylag szerény csökkenése ezekben a mutációkban egyszerűen nem elegendő ahhoz, hogy a multimer eloszlást kellő mértékben eltolja az UL-VWF irányába. A szűk multimer átcsapási zóna jelensége törvényszerűen következik a hasításnak a VWF multimer hosszától való exponenciális függéséből. Tehát a VWF clearance viszonylag széles tartományban növekedhet és okozhat csökkent plazma VWF szinteket, mielőtt eléri azt a szélső értéket, amelyik már jelenlegi multimer vizsgálatainkkal is érzékelhető eltolódást okoz a multimer eloszlásban. A betegeknél alkalmazott valódi multimer gélek minden bizonnyal még csekélyebb mértékben érzékenyek az ilyen finom eltérésekre, mint az általunk alkalmazott szimulált gélmintázatok.

A VWF clearance mechanizmusát jelenleg még nem ismerjük részleteiben. A VWF lebontás minden bizonnyal a májban jön létre,<sup>164</sup> melyet valószínűleg makrofágszerű sejteken lévő receptor közvetít,<sup>242</sup> melyet egyelőre még nem azonosítottak. A p.R1205H mutáció olyan funkciógyarapodást jelent, melynek következtében hipotézisünk szerint a R1205H-VWF a clearance receptorhoz fokozott aviditással kötődik. Ebből a szempontból érdemes megjegyeznünk, hogy valamennyi mutáció, amelyről eddig leírták, hogy a VWF clearance gyorsulásával jár, a D3 és D4 doménben található.

Eddig egyetlen betegről tudunk az irodalomban, aki a Vicenza VWB fenotípussal rendelkezik, de *VWF* génjében nem található mutáció.<sup>243</sup> Ebben a betegben a Haemate P is igen gyorsan kiürült. A VWF-GPIb interakció és a 2B típusú VWB és pszeudo-VWB elnevezés analógiájára ezt a variánst pszeudo-Vicenza VWB-nek vagy C típusú pszeudo-VWB-nek kellene neveznünk. Ilyen fenotípust okozhat a VWF májban lévő clearance receptorának funkciógyarapodást okozó mutációja.

Jelenleg nem világos, hogy a rövid VWF felezési idő milyen terápiás konzekvenciával jár, erre a kérdésre csak jövőbeli klinikai vizsgálatok adhatnak választ. Amíg több információ nem válik elérhetővé, mi azt a stratégiát vezettük be, hogy a DDAVP-t 4 óránként adjuk ezeknek a betegeknek beavatkozás előtt és alatt, mely stratégia jó eredményre vezetett az eddig észlelt néhány alkalommal. Nyilván gondos figyelmet kell fordítani a folyadék- és elektrolit-háztartás egyensúlyára, és a fenti protokoll biztonságosságát és hatékonyságát csakis helyesen tervezett klinikai vizsgálatokkal lehet majd bizonyítani. Amennyiben a DDAVP kezelés eredménye a fenti módon nem kielégítő, a betegeknek természetesen faktorpótlásra lesz szükségük.

**Összefoglalva**, adataink alapján bebizonyosodott, hogy a R1205H-VWF a plazmából igen rövid felezési idővel tűnik el, mely felezési idő a vad típusú transzfundált VWF felezési idejének kb. tizedrésze *ugyanabban a betegben*. Matematikai modellezés segítségével sikerült kialakítani azt a koncepciót, amely megmagyarázza ezt a biológiai viselkedést. Szimulációs kísérleteink jól alátámasztják, hogy a VWF felezési idejét a normál tizedrészére csökkentve a Vicenza VWB fenotípus minden aspektusa reprodukálható (alacsony VWF szint, UL-VWF multimerek, csökkent intenzitású szatellita sávok) akkor is, ha más paramétert nem változtatunk. Mindezek a kísérletek és szimulációk egy újfajta dinamikus szemlélet kialakulásához vezettek, mely figyelembe veszi a VWF szintézis, hasítás és clearance bonyolult összjátékát a VWB patogenezisében.



## Tegyük rendet a mérési módszerek között: a von Willebrand faktor trombocita-függő aktivitási tesztjeinek nomenklatúrája<sup>244</sup>

A von Willebrand betegség helyes diagnosztikájához elengedhetetlen a VWF aktivitásának és elsősorban trombocita-függő aktivitásának megbízható mérése. A VWF aktivitás mérése hagyományosan a risztocetin kofaktor aktivitás méréssel történt (VWF:RCo), amelyet a risztocetin okozta trombocita-aggregáció felfedezése révén fejlesztettek ki.<sup>245-249</sup> A VWF:RCo assay pontatlansága és inszenzitivitása számos új tesztmódszer kidolgozásához vezetett (21. táblázat).

21. TÁBLÁZAT. A különféle mérési elveken alapuló VWF aktivitások nevezéktana

Rövidített nevezéktan	Leírás
VWF:RCo	Risztocetin kofaktor aktivitás: a risztocetint és trombocitákat használó összes mérési eljárás neve
VWF:GPIbR	Glikoprotein Ib kötés: azon mérési eljárások neve, melyek a VWF és egy rekombináns WT GPIb szakasz risztocetin-indukálta kötődésén alapulnak
VWF:GPIbM	Mutáns glikoprotein Ib kötés: azon mérési eljárások neve, melyek a VWF és egy túlműködő ( <i>gain of function</i> ) mutáns rekombináns GPIb szakasz egymáshoz való spontán kötődésén alapulnak
VWF:Ab	Antitest kötés: azon mérési eljárások neve, melyek a VWF AI doménjének egy monoklonális antitesthez való spontán kötődésén alapulnak

Bár valamennyi teszt a VWF trombocita-kötő funkciójának mérésére irányul, köztük számos technikai részletkülönbség van. Ezek megértése és nyilvántartása fontos a VWB klasszifikáció során. Ezt szolgálja az elveket követő nevezéktan, melynek konszenzusos kialakítását munkacsoportunk szervezte és vezényelte a nemzetközi VWF közösség bevonásával,<sup>244</sup> és ezt szolgálja ez az alábbiakban következő rövid összefoglaló.

### Risztocetin kofaktor aktivitás (VWF:RCo) mérése

Valamennyi olyan assay-t ide soroljuk, amelyek risztocetint és trombocitákat használnak a VWF aktivitás mérésére. Az *elsőgenerációs VWF:RCo* tesztek esetében manuális rendszerben, üveglemezen zajlott a reakció.<sup>247</sup> Ez a módszer meglehetősen munkaigényes és szubjektív volt; jobbra kiment a használatból az egész világon. A *második generációs*, szemi-automata VWF:RCo tesztekben a VWF:RCo-t a hagyományos aggregométerekhez igazították, és már kereskedelmi reagensek is elérhetővé váltak. A reakciósebességet (az aggregációs görbe meredeksége) a kalibrátorhoz viszonyítjuk. Ezt a világszerte számos laboratóriumban használt félautomata VWF:RCo-tesztet továbbra is több technikai nehézség sújtja, mivel érzéketlen (kimutatási határérték, LOD: >10-20 IU dL<sup>-1</sup>) és pontatlan (szórás koefficiense [CV], akár 20-

30%).<sup>250</sup> *A harmadik generációs, teljesen automatizált* rendszerek a VWF:RCo-tesztet sikeresen adaptálták az automata koagulométerekhez, ami precízebb mérést és nagyobb átmenő teljesítményt tesz lehetővé. Jelenleg a legtöbb alvadási laboratóriumban a **22. táblázatban** közzétett protokollok valamelyikét használják. *A negyedik generációs (módosított, teljesen automatizált)* VWF:RCo tesztek korábbi tapasztalatokra építve<sup>251</sup> számos módosítás segítségével az eredeti automatizált teszthez képest lényegesen jobb érzékenységet (LOD, 3 NE dl<sup>-1</sup>) és pontosságot (6-9%-os CV) értek el.<sup>252,253</sup> Sajnos nagy hozzáértést igényelnek, ezért csak néhány specializált laboratórium tudja használni őket.

### ***A VWF:RCo assay előnyei és hátrányai***

Évtizedeken át a VWF:RCo vizsgálat jelentette az alapvető tájékozódási pontot (gold standard) a VWF aktivitás mérésére; ezért rengeteg tapasztalat halmozódott fel. Továbbá a dezmozpresszinnel vagy VWF koncentrátumokkal való kezelés hatékonyságát a VWF aktivitáshoz viszonyító adataink is mind VWF:RCo tesztre vonatkoznak.<sup>248,254,255</sup> Azonban a VWF:RCo assay hátrányai igen számosak: érzéketlensége nem teszi lehetővé a VWFaktivitás mérését éppen a súlyosabb, <10 IU dl<sup>-1</sup> esetekben,<sup>250</sup> ahol arra a legnagyobb szükség lenne, mivel a VWF:RCo/VWF:Ag arány kritikus a jelenlegi osztályozásban, ezért ez az alacsony érzékenység gyakran téves diagnózishoz vezethet. Az első- és második generációs tesztek időigényesek és rosszul standardizáltak voltak. A magas variációs koefficiens<sup>250</sup> gyakran hamis diagnózisokhoz vezetett a mérsékelten csökkent VWF tartományban is. Potenciális hibaforrások közé tartozik a risztocetin és a trombocita reagens labilis volta, az egyes „batch”-ek közötti változékonyság és a mérési rendszer belső instabilitása.

További hátrányt jelent az a tény, hogy VWF:RCo valójában két paramétert mér, *(i)* a risztocetin kötődését a VWF-hez és *(ii)* a risztocetin-aktivált VWF kötődését a vérlemezkékhez (azaz a mért aktivitást lényegében egy műtermék indítja, mert a risztocetin nem fiziológias aktivátora a VWFnek, még ha az előidézett konformáció hasonló is a fiziológiásan, a subendothelialis felülethez immobilizált kollagén kötődése és az így létrejövő nyírófeszültség által előidézett VWF konformáció változáshoz.<sup>256,257</sup> Ez a körülmény nem csak elméleti probléma. Ugyanis két, elsősorban az afrikai populációban gyakori VWF polimorfizmus (p.P1467S és p.D1472H) éppen az A1 domén risztocetin kötőhelyét érinti,<sup>24,258</sup> ezáltal hamisan csökkent VWF:RCo szinteket okozva. Ugyanis e szekvencia-variánsok a fiziológias aktivációra nincsenek hatással. Ennek megfelelően ezekben az (egészséges) egyéneknél a csökkent VWF:RCo/VWF:Ag arány nem jár vérzéses tünetekkel,<sup>258</sup> hanem egy vizsgálati artefaktumot

tükröz. Mindezen okok miatt az a régen berögződött bölcsesség, hogy a VWF:RCo nélkülözhetetlen, az elmúlt években érvényét veszítette.<sup>26,259-261</sup>

**Risztocetin-indukálta GPIb kötésen alapuló assay-k (VWF:GPIbR)**

Vanhoorelbeke, Deckmyn és munkatársai kifejlesztettek egy trombocita-mentes ELISA tesztet, mely ELISA lemezekre rögzített monoklonális antitesthez kötött rekombináns GPIb fragmentumhoz való, szintén risztocetin-kiváltott VWF kötődést mér.<sup>14</sup> Az új teszt lényegesen jobb LOD-t és CV-t eredményezett<sup>15-17</sup> (**22. táblázat**). Ugyanezt az elvet alkalmazták automatizált assay-k kifejlesztésére is, ahol az ELISA lemez szerepét latex vagy mágneses gyöngyök töltik be. A koncepció érvényességét mutatta a klasszikus VWF:RCo teszttel való kitűnő korreláció (**34. ábra**). Fontos azonban látni, hogy ezek a tesztek különböző reagenseket használnak a GPIb fragmentum kötésére, és a plazma eredetű, vagy különböző rekombináns GPIb fragmentum sem volt egységes (**22. táblázat**). A risztocetin származása és koncentrációja szintén változó volt. Végül kritikusnak bizonyult a GPIb-t rögzítő monoklonális antitest epitóp-specifitása is.<sup>16</sup> Mindazonáltal az assay elvének megfelelő automatizált alkalmazás pontos és érzékeny VWF-aktivitás mérést tesz lehetővé.<sup>26,34,37,262,263</sup>

**22. TÁBLÁZAT. Risztocetin-indukált GPIb-binding (VWF:GPIbR) assay-k: ELISA és automatizált (koagulométer) rendszerek**

Kereskedelmi elnevezés	Platform	Coat: mAb	GPIba	Risztocetin	Második reagensek	Detektálás	LOD IU/dl		Ref
Házi	ELISA	2D4	1-289	ABP, 760 µg/ml	nyúl anti-VWF polyclonal-HRP	abszorbancia, 492 nm	0.05	4-13	14,15
Házi	ELISA	24B3	glycocalicin	ABP, 1 mg/ml	nyúl anti-VWF polyclonal-HRP	abszorbancia, 492 nm	0.05	5-10	16
Házi	ELISA	LJ-P3	1-290-C65A	Sigma, 0.8 mg/ml	nyúl anti-VWF polyclonal-HRP	abszorbancia, 492 nm	0.1	9-10	17
Házi	ELISA	SZ-151	1-289-IgG1Fc fúziós protein	Sigma 760 µg/ml	nyúl anti-VWF polyclonal-HRP	abszorbancia, 450 nm	0.008	8-12	33
Házi	ELISA	MBC 142.16	His-1-290-C65A	ABP 1 mg/ml	2 mAbs: AVW-1 & AVW-15-biotin	Streptavidin AlkPhos abszorbancia @405nm	1.6	7-21	24,25
IL, Hemo-sIL VWF:RCo	Latex ACL TOP	24B3	Nincs megadva	IGEN, konc. nincs megadva	Nincs	turbidimetria (LIA)	3.5	3-4	34,35
IL, Hemo-sIL AcuStar VWF:RCo	Mágneses gyöngy AcuStar	2D4	1-289	IGEN, konc. nincs megadva	anti-VWF-Isoluminol	Kemilumineszcencia	0.5	2-7	34,36,37

### ***Funkcionyerő mutáns GPIb kötésén alapuló assay-k (VWF:GPIbM)***

A legújabb VWF aktivitás mérések rekombináns funkcionyerő (*gain of function*) mutáns GPIb fragmenseket használnak, melyek risztocetin nélkül is, spontán kötődnek a VWF-hez (**23. táblázat**). A kötődés akkor optimális, ha a pszeudo-VWB-t okozó három ismert GPIb mutáció közül bármelyik kettő jelen van a rekombináns fragmensben.<sup>25</sup> Az eddig publikált adatok alátámasztják azt az elképzelést, hogy a VWF:GPIbM tesztek következetesen korrelálnak a standard VWF:RCo assay-vel.<sup>26-28,31</sup> Az automatizált VWF:GPIbM pontos,<sup>27</sup> érzékeny,<sup>27,29,30</sup> és nem áll fönn a p.P1467S és p.D1472H polimorfizmusok esetében tapasztalt tévesen alacsony VWF aktivitás problematikája.<sup>25</sup> Bizonyos körülmények között a VWF:GPIbM elv ELISA-val történő mérése lehetővé tette a VWD 2A és 2B típus közötti különbségtételt.<sup>25,264,265</sup> A gyakorlatban leggyakrabban alkalmazott ilyen teszt „INNOVANCE VWF Ac” néven ismert, de az elvet leíró VWF:GPIbM a leghelyesebb elnevezés. Az automatizált teszt sajnos nem tud a 2A és 2B között különbséget tenni.

### **23. TÁBLÁZAT. Funkcionyerő GPIb-kötés (VWF:GPIbM) assay-k: ELISA és automatizált (koagulométer) rendszerek**

Kereskedelmi név	Platform	Coat: mAb	GPIba	Risztocet.	Második reagens	Detection	LOD IU/dl	CV (%)	Ref
házi	ELISA	mAb (NM)	1-289-G233V-M239V	NEM	NM	NM	NM	NM.	18
házi	ELISA	MBC 142.16	His-1-290-C65A+D235Y-M239V	NEM	2 mAbs: AVW-1 & AVW-15-biotin	Streptavidin alkPhos abszorbanca @ 405 nm	1.6	6-23	24,25
Siemens, INNOVANCE VWF Ac	Latex gyöngy	mAb (NM)	NM	NEM		Turbidimetria	2.2	2-5	26-32
Immucor-GTI Diagnostics, fejlesztés alatt	Latex gyöngy	mAb (NOS)	His-1-290-C65A+D235Y-M239V	NEM	NM	NM	NM	NM	Személyes közlés

NM.: Nincs megadva az irodalomban.

### ***Monoklonális antitest kötődésén alapuló VWF aktivitás (VWF:Ab)***

Az eredeti ELISA teszt a REF-VIII:R/2 monoklonális antitestet használta, amely a VWF-GPIb kötésben részt vevő VWF epitóp ellen irányul.<sup>266-268</sup> A kereskedelmi forgalomban kapható latex alapú automatizált immunoturbidimetriás (LIA) tesztváltozatot „VWF aktivitás” tesztként, rövidítve VWF:Act néven forgalmazzák. Mivel ez az elnevezés nem ad információt arról, hogy melyik VWF funkciót méri, ezért helyesebb a leíróbb VWF:Ab megnevezést használni. A LIA (HemosIL VWF-aktivitás) jobban teljesített a VWD altípusainak megkülönböztetésében, mint az ELISA,<sup>269,270</sup> és jó korrelációt mutatott a VWF:RCo aktivitással.<sup>271-275</sup> A HemosIL VWF:Ab tesztnek számos előnye van, többek között az, hogy

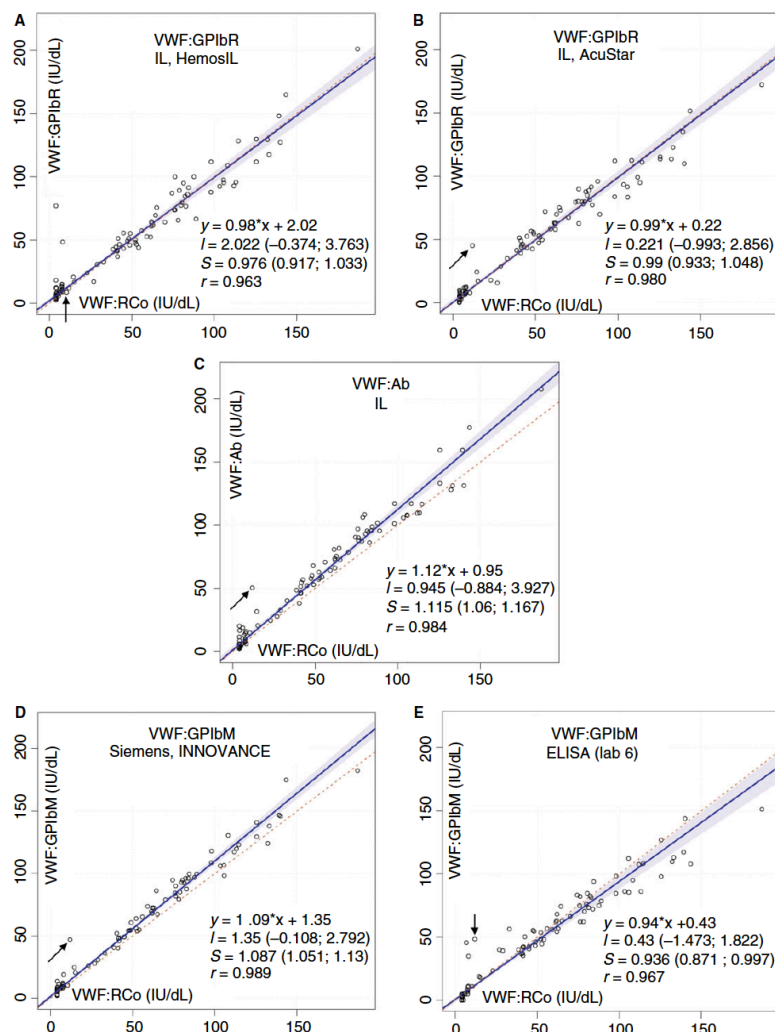
felhasználóbarát, több platformon is alkalmazható, és így a rutin laboratóriumok számára is elérhető.<sup>272,273</sup> Mivel azonban a VWF:Ab-teszt a VWF A1 doménjének kötődését nem a GPIb-hez, hanem egy monoklonális antitesthez méri, nem világos, hogy ez az antitest mennyire képes pontosan utánozni a GPIb kötőfelületét.<sup>274</sup> Egyes VWD 2M típusú mutációkat (pl. p.G1324A) nem mutat ki az assay,<sup>275</sup> és az sem világos, hogy milyen mértékben érzékeny a HMW multimerek elvesztésére.<sup>271,272</sup> Továbbá a VWF:Ab assay nem oldotta meg az alsó kimutatási határral kapcsolatos problémát, mivel a linearitást csak 12,5 IU dL<sup>-1</sup>. felett tartják elfogadhatónak.<sup>271</sup> Sőt, a jelenlegi laboratóriumi tájékoztató (*package insert*) szerint az LOD 19 IU dL<sup>-1</sup>. Összességében a VWF:RCo aktivitással való jó általános korreláció valószínűleg szerepet biztosít ennek az assay-nek a rutin szűrő laboratóriumi diagnosztikában, de a pontosabb diagnosztikához ki kell egészíteni más aktivitást mérő eljárásokkal. A VWF:Ab-teszt így nem ajánlható a VWF:RCo-teszt teljes helyettesítésére.

**Összefoglalva**, az elmúlt néhány évben a vérlemezke-függő VWF aktivitást mérő tesztek figyelemre méltó (r)evolúciója zajlott le. Az eredeti kézi és félautomata módszereket jobbra felváltották a nagyobb pontosságú automatizált technikák. Az itt ismertetett legújabb alkalmazásokban a vérlemezkéket ELISA tálcákra vagy latex gyöngyökre immobilizált rekombináns GPIb fragmentumokkal helyettesítették, ami lehetővé teszi a VWF aktivitás pontos mérését az egészen alacsony (<1-10 IU dL<sup>-1</sup>) tartományban is. További innováció vezetett a legújabb generációs, pontos és érzékeny, risztocetin-mentes tesztek kifejlesztéséhez, amelyek kiküszöbölik a risztocetin alapú teszteket sújtó problémákat, beleértve a bizonyos populációkban gyakran előforduló hamis pozitív eredményeket. Bár a VWB diagnosztizálására szolgáló tesztek arzenáljában igen örömdetes az új assay-k megjelenése, az egyes tesztek pontos viselkedése jelenleg nem egyértelműen tisztázott. Sürgős szükség van az egészséges kontrollok és a kóros plazmaminták (beleértve az 1-es, 2-es és 3-as típusú VWB betegeket is) egymás melletti összehasonlítására. A következő két fejezetben bemutatjuk azt (a jelen fejezetben bemutatott cikk megjelenésekor még folyamatban lévő) nemzetközi összehasonlító vizsgálatot,<sup>264</sup> mely azóta már megjelent,<sup>276,277</sup> és sokféle, igen hasznos információval szolgál a klinikusok és a laboratóriumi szakemberek számára egyaránt. Az új tesztek előnyei minden bizonnyal a régebbi VWF:RCo teszt fokozatos felváltásához vezetnek majd. A jelenleg rendelkezésre álló tesztek technikai részleteinek ismertetésén túlmenően ez a rövid áttekintés az ISTH VWF SSC által jóváhagyott új nomenklaturát is tartalmazza a különböző vizsgálati elvek egyértelmű megkülönböztetése érdekében, amelyet a terület szakemberei azóta is alkalmaznak.

## A GPIb kötő VWF aktivitási tesztek objektív összehasonlítása egy vakon mért mintákkal történő nemzetközi vizsgálatban: COMPASS-VWF – I. 276,277

### A különböző mérésekkel nyert VWF aktivitások korrelációja

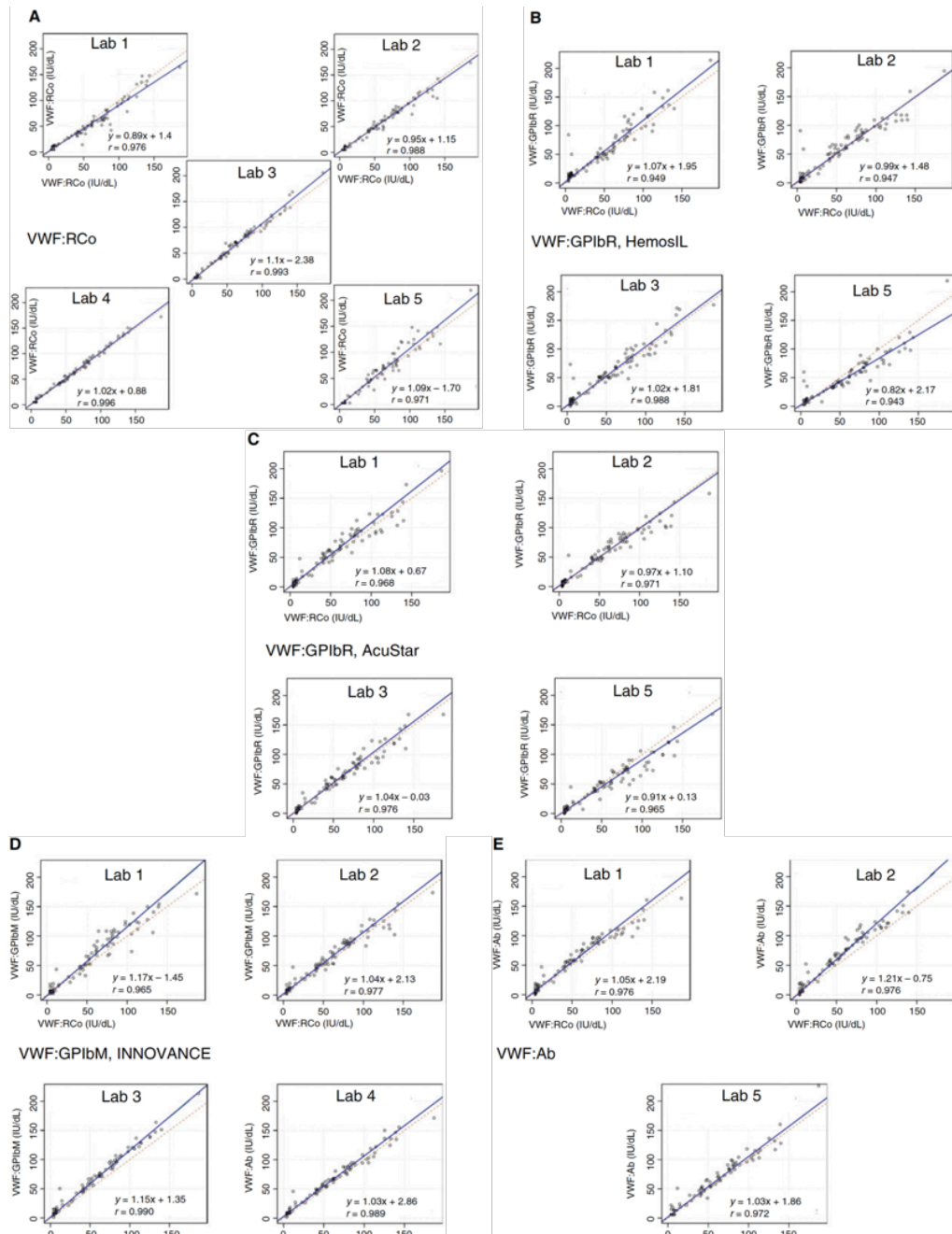
1. Minden teszt jól korrelált a VWF:RCo aktivitással (az  $r$ -értékek 0,963 és 0,989 között mozogtak;  $p < 0,001$  minden összehasonlításnál) (34. ábra). Azonban mind az IL VWF:Ab,



**34. ÁBRA. Valamennyi minta ( $n = 95$ ) Passing Bablok-regressziós elemzése.** Minden egyes pont az összes olyan laboratóriumban végzett mérés átlagának felel meg, amelyek a VWF VWF:GPIbR aktivitást a HemosIL latex agglutinációs teszttel (IL, **A panel**) vagy a HemosIL AcuStar teszttel (IL, **B panel**) mérték; a VWF:Ab aktivitást a megfelelő IL assay-vel vizsgálták (**C panel**); ill. a VWF:GPIbM aktivitást az INNOVANCE VWF Ac teszttel (Siemens, **D panel**) vagy egy „házon belüli” ELISA-val (**E panel**) határozták meg. Kék vonal: illesztett regressziós vonal. Szaggatott vonal: azonosság. Minden panelben fel van tüntetve a regressziós egyenes egyenlete, a metszéspont ( $I$ ), a meredekség ( $S$ ) a 95%-os konfidencia intervallummal és az  $r$  lineáris korrelációs együttható. Az A-E panelekben a nyílak a p.P1467S mutációval rendelkező rekombináns mintára mutatnak (l. következő fejezet).

mind a Siemens VWF:GPIbM tesztek kissé magasabb eredményeket adtak, míg a házi ELISA kissé alacsonyabb aktivitást mutatott. Ezek a különbségek statisztikailag szignifikánsak voltak (az azonossági vonal kívül esett a 95%-os CI-n), de klinikailag/biológiailag nem voltak relevánsak (34. ábra).

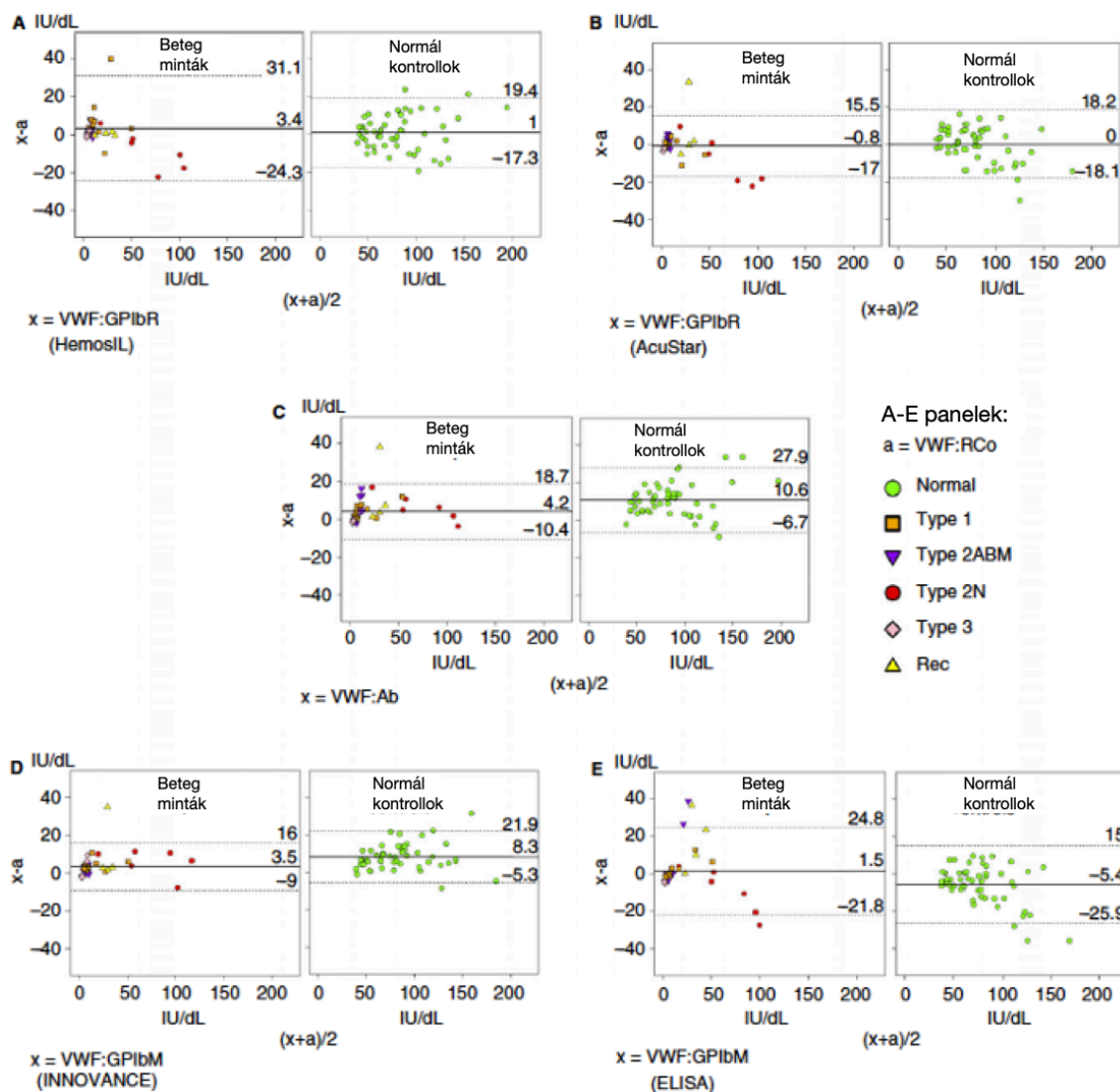
2. Laboratóriumonkénti összehasonlítás: Annak felmérésére, hogy ezek a kis különbségek a vizsgálatok között egy adott laboratóriummal kapcsolatos technikai problémából adódtak-e, a minták eredményeit minden egyes laboratórium esetében külön-külön elemeztük (**35. ábra**). Ez az eljárás mutatott néhány apró különbséget a laboratóriumok között, különösen a VWF:RCo összehasonlításban, de a VWF:Ab és a VWF:GPIbM esetében a kissé



**35. ÁBRA.** Az egyes laboratóriumok által külön-külön elemzett összes minta ( $n = 95$ ) *Passing Bablok regressziós elemzése*. Az **A panel** a VWF:RCo értékét mutatja az egyes laboratóriumokban az összes résztvevő laboratórium VWF:RCo értékének átlagával szemben. A **B panel** a VWF:GPIbR-t mutatja a HemosIL latex agglutinációs teszttel (IL), a **C panel** a HemosIL AcuStar teszttel (IL). A **D panel** a VWF:GPIbM-et mutatja az INNOVANCE VWF Ac assay-vel (Siemens), az **E panel** a VWF:Ab assay-vel (IL). Kék vonal: illesztett regressziós vonal. Szaggatott vonal: azonosság. Minden panelben feltüntettük a regressziós egyenes egyenletét és az  $r$  lineáris korrelációs együtthatót.

meredekebb meredekség minden laboratóriumban konzisztens maradt. Mint már említettük, e kis különbségeknek várhatóan nincs hatása a klinikai értelmezésre.

3. Normál és klinikai minták: a normál kontroll és a VWD mintákat külön elemeztük (**36. ábra**). Az ábra egy Bland–Altman-diagram, amely az újabb vizsgálatok és a VWF:RCo közötti különbségeket mutatja a VWF aktivitás értékének függvényében. A kissé eltérő



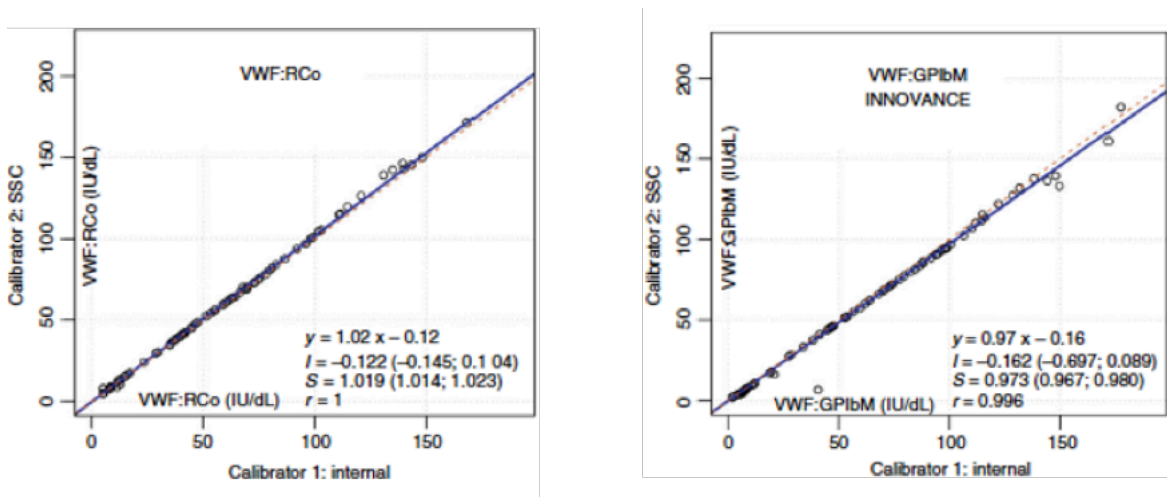
**36. ÁBRA. Alcsoport elemzés. A normál kontroll (n = 53) és a beteg minták (n = 42) Bland–Altman-diagramjai.** A Bland–Altman-analízis két vizsgálatot hasonlít össze úgy, hogy a két vizsgálat közötti különbséget ( $x - a$ ) minden egyes minta esetében a két mérés átlagával  $[(x + a)/2]$  szemben ábrázolja. A komparátor ( $a$ ) minden panel esetében a VWF:RCo. Minden egyes pont a vizsgálatot végző összes laboratórium mérései átlagának felel meg ( $x$  jelöli): VWF:GPIbR a HemosIL latex agglutinációs teszttel (IL, **A panel**) vagy a HemosIL AcuStar teszttel (IL, **B panel**); a VWF:Ab teszttel (IL, **C panel**); és a VWF:GPIbM az INNOVANCE VWF Ac teszttel (Siemens, **D panel**) vagy egy házi ELISA-val (**E panel**). A zöld körök normál kontrollokat, a piros körök VWD 2N betegmintákat jelölnek. Az 1-es típusú VWB betegek mintáit négyzetekkel, a 3-as típusú betegek mintáit rombuszokkal ábrázoltuk. A lila és sárga háromszögek a 2A, 2B és 2M típusú, illetve rekombináns VWF-mintákat jelölik. A rekombináns minták vad típusú VWF-et, p.P1467S és p.D1472H VWF-et tartalmaznak, amelyet 3-as típusú VWD plazmában vettünk föl.

meredekség itt is tükröződik a különbségben, amely a VWF:Ab és a VWF:GPIbM assay alacsony és normál tartományain keresztül konzisztens, de a különbség nagysága a normál VWF aktivitás értékeknél kissé nagyobb. A **36. ábra** a különböző VWB típusokat mutatja.



A várakozásoknak megfelelően a VWB minták többsége az alapvonal köré csoportosul. A 2N minták némelyike jobban eltér a VWF:GPIbR esetében. Ez azonban nem befolyásolja a diagnózist, mivel a VWB 2N diagnózisa az FVIII szinteken és a VWF:FVIII kötődésen, nem pedig a VWF aktivitás értékén alapul.

4. A különböző kalibrátorok hatása: a különböző kalibrátorok hatásának tanulmányozása érdekében két részt vevő laboratórium (1. és 4. laboratórium) a VWF:RCo és VWF:GPIbM tesztet a laboratórium által rutinszerűen használt kalibrátor plazmán (mindkét laboratórium esetében a Siemens standard humán plazma) kívül az SSC kalibrátor plazmával is elvégezte. A kétféle kalibrátorral kapott értékek lényegében azonosak voltak, amint az a **37. ábrán** látható.



**37. ÁBRA. Két kalibrátor összehasonlítása VWF:RCo és VWF:GPIbM mérésére.** Két laboratórium két vizsgálatot végzett párhuzamosan két különböző kalibrátorral: a laboratórium által rutinszerűen használt vizsgálat kalibrátorával és a Scientific and Standardization Committee (Tudományos és Szabványügyi Bizottság, SSC) kalibrátorával. Minden egyes pont a két laboratórium átlaga. Kék vonal: illesztett regressziós vonal. Szaggatott vonal: azonosság. Mindkét panelen feltüntettem a regressziós egyenes egyenletét, a metszéspont ( $I$ ), meredekséget ( $S$ ) a 95%-os konfidencia intervallumokkal és az  $r$  lineáris korrelációs együtthatót.

### Szenzitivitás

Az **24. táblázat** mutatja a detektálás alsó határát (LLMI), ahogyan az egyes laboratóriumok feltüntették. Az LLMI alatt az eredményeket < LLMI-ként tüntették fel). A táblázat mutatja a

#### 24. TÁBLÁZAT. A tesztek szenzitivitása

	VWF:RCo	VWF:GPIbR HemosIL	VWF:GPIbR AcuStar	VWF:Ab	VWF:GPIbM INNOVANCE	VWF:GPIbM ELISA
<b>Label</b>	10	7	0.5	19	4	NA
<b>Lab1</b>	10	3	0.5	1	4	ND
<b>Lab2</b>	9.9	1	0.5	0	4	ND
<b>Lab3</b>	4	4.4	0.5	ND	3	ND
<b>Lab4</b>	10.11	ND	ND	ND	4	ND
<b>Lab5</b>	6	6	0.5	12	ND	ND
<b>Lab6</b>	ND	ND	ND	ND	ND	0

A táblázat a detektálás alsó határát (*lower limit of measuring interval*, LLMI) mutatja.

ND: a labor nem végezte. NA: nem releváns. Minden adat NE/dl egységben van megadva. Label: a gyártó hivatalos címkéje. Lab1-6: a hat résztvevő laboratórium.

gyártó címkéjén feltüntetett LLMI-t is. A belső validálás<sup>278</sup> alapján több laboratórium ennél alacsonyabb határértékeket használt. A legérzékenyebb vizsgálat a házi ELISA volt, amelyet az AcuStar VWF:GPIbR mérése követett.

### Pontosság

Ez a tanulmány a laboratóriumok közötti szórást vizsgálta (különböző országokban több laboratórium különböző időpontokban mérte ugyanazokat a mintákat), szemben a szokásos laboratóriumon belüli szórással, amelyet egyetlen laboratóriumban, standardizált körülmények között ismételt mérésekből számolnak ki. A vizsgált új tesztek többsége a VWF:RCo-nál jobb teljesítményt mutatott (**25. táblázat**). A várakozásoknak megfelelően az alacsony tartományban (azaz a VWB beteg minták esetében) a variabilitás nagyobb volt, mint a normál kontroll minták esetében.

#### 25. TÁBLÁZAT. A tesztek pontossága a laboratóriumok közötti százalékos variációs együttható (CV) alapján.

CV (%)	VWF:RCo	VWF:GPIbR HemosIL	VWF:GPIbR AcuStar	VWF:Ab	VWF:GPIbM INNOVANCE
<b>Összes</b>	15.8	20.4	12.1	12.2	13.1
<b>NP</b>	12.8	14.2	11.4	9.1	9.3
<b>VWB minták</b>	25.8	29.0	13.1	17.0	19.5
<b>Mérések száma</b>	5	4	4	3	4

CV: coefficient of variation; VWB: von Willebrand betegség. NP: normál plazma.

### Következtetések 1

A VWF aktivitás mérésére szolgáló új tesztek bevezetése a VWD diagnózisában rendkívül üdvözlendő fejlemény, mivel egyszerűsíti a diagnózist, és lehetővé teszi a VWF aktivitás specifikusabb és pontosabb laboratóriumi értékelését. A különböző mérési elveket alkalmazó különböző tesztek elérhetősége azonban zavart okozott a klinikusok és a laboratóriumi orvosok

körében egyaránt. A COMPASS-VWF vizsgálat egy a gyártó cégektől független nemzetközi összehasonlítás, amelyet az ISTH SSC VWF albizottságának égisze alatt munkacsoportunk szervezett, és amely összehasonlította a különböző tesztek, méghozzá nemzetközileg kiemelkedő szakértői laboratóriumokban végzett mérések felhasználásával. A várakozásoknak és néhány korábbi, általában cégek által szponzorált vizsgálatból született irodalmi beszámolóknak megfelelően az összes új teszt (a VWF:GPIbR HemosIL latex agglutinációs<sup>34,35,272</sup> teszttel vagy HemosIL AcuStar<sup>26,34,37,262,263</sup> teszttel; a VWF:GPIbM a Siemens teszttel<sup>26-30,32</sup> és a VWF:Ab teszt<sup>270,271,273-275</sup>) jól teljesített, és a régi referencia standard VWF:RCo-hoz közeli eredményeket adott.

Bár minden részt vevő laboratóriumban egységesen jelentkezett és statisztikailag is szignifikáns, a VWF:Ab és a VWF:GPIbM kissé meredekebb regressziós egyenesei klinikailag nem voltak jelentősek. Például egy olyan minta, amely 20 NE/dl VWF:RCo-t eredményez, 23 NE/dl VWF:GPIbM aktivitással rendelkezne, míg a 100 NE/dl VWF:RCo 110 NE/dl VWF:GPIbM-nek felelne meg (**34. ábra, D panel** egyenlete), ami ugyanahhoz a klinikai következtetéshez vezet. A VWF:Ab vizsgálat esetében az összehasonlítás 20 NE/dl vs. 23 NE/dl és 100 NE/dl vs. 113 NE/dl lenne (**34. ábra, egyenlet a C panelben**).

Annak ellenőrzésére, hogy az észlelt különbség nem valamelyik részt vevő laboratórium technikai problémájának eredménye-e, minden egyes laboratóriumban külön-külön elemeztük a mintákat (**35. ábra**). Ez az elemzés azt mutatta, hogy a kis különbségek mindegyik laboratóriumban konzisztensen jelen voltak, ami arra utal, hogy a különbség magyarázata a vizsgálatok belső tulajdonságával, és nem technikai hibával függ össze. Hasonlóképpen, a regressziós meredekségben mutatkozó csekély különbség mind az alacsony (VWB), mind a normál tartományban jelen volt (**36. ábra**). Megjegyzendő, hogy hasonló kis különbséget mutatott ki néhány,<sup>31,252,279</sup> de nem minden<sup>27</sup> korábbi vizsgálat a GPIbM esetében. Az eltérés oka nem világos; a kis különbségeknek azonban a klinikai gyakorlatra nincs hatásuk. Ezzel szemben a VWF aktivitás vizsgálatára irányuló külső minőségbiztosítási programokban ezek az információk igen fontosak, ha a különböző laboratóriumok különböző vizsgálatokkal jelentik a VWF aktivitást. Azt is meg kell jegyezni, hogy bizonyos betegminták a különböző teszteknel eltérően viselkedtek. Úgy tűnik, hogy ez a minták és az illető tesztek kölcsönhatásának függvénye. Például a p.P1467S mutációval rendelkező rekombináns minta alacsonyabb aktivitást mutatott a legtöbb risztocetin-függő (közismerten tévesen alacsony, ál-

pozitív<sup>24,258</sup>) teszteknel, mint a VWF:GPIbM vagy VWF:Ab értékek (**34. ábra**). Más minták esetében az eltérés mechanizmusára a következő fejezetben térünk ki.

A legtöbb új teszt a VWF:RCo-nál jobb érzékenységet mutatott. A VWF:RCo LLMI-je általában 10 NE/dl körüli. Egyes szakértői laboratóriumok képesek ennél alacsonyabb értéket is meghatározni speciális protokoll segítségével,<sup>278</sup> de ez a legtöbb klinikai laboratóriumban nem áll rendelkezésre. A legérzékenyebb vizsgálat a VWF:GPIbM és a VWF:GPIbR mérésekre szolgáló házi ELISA és az AcuStar vizsgálat volt, ez utóbbi kemilumineszcens kimutatási rendszert használ. Mindkét teszt megbízhatóan mérte a VWF aktivitást 1 NE/dl alatt (**24. táblázat**). Az automatizált VWF:GPIbM és a latex agglutinációt detektáló VWF:GPIbR tesztek LLMI értékei a 3-4 NE/dl, illetve a 3-6 NE/dl tartományban voltak, míg a VWF:Ab teszt kevésbé érzékeny (LLMI: 19 NE/dl). Az érzékenység javulása az egyik legfontosabb előrelépés ezen új tesztek bevezetésével, hiszen a mérsékelt és súlyos VWB besorolása csak akkor lehetséges, ha a VWF aktivitást megbízhatóan lehet mérni az alacsony tartományban is.

Ebben a vizsgálatban a laboratóriumi eltéréseket vizsgáltuk, szemben a laboratóriumban belüli eltérésekkel, amelyekről a tesztekéről írott cikkek általában beszámolnak. A laboratóriumban belüli CV-eket általában úgy számítják ki, hogy egyetlen mintát 10 vagy több ismétlésben, több napon, ugyanazon a platformon mérnek, ami egy minta nagyszámú mérését eredményezi (a CV meghatározásához általában egy kóros és egy normál kontroll mintát használnak). A mi vizsgálatunkban azonban, bár a minták száma jóval magasabb volt (95), az egyes mintákra vonatkozó mérések száma alacsony (három-öt, **25. táblázat**), és minden mérési pontot más-más laboratóriumban végeztek. Ez a protokoll természetesen magasabb CV-t eredményez. Ezért a CV eredmények nem hasonlíthatók össze a szakirodalomban közöltekkel, de azért hasznosnak tűnnek, mert a „valós élet” változékonyságát mutatják, és összehasonlíthatók egymással. Ahogy mások is megállapították, a CV-k magasabbak voltak a kóros (alacsony) tartományban, mint a normál tartományban. A HemosIL-tesztet használó VWF:GPIbR kivételével minden új teszt jobb reprodukálhatóságot mutatott, mint az eredeti VWF:RCo teszt, annak ellenére, hogy a VWF:RCo esetében a mérések száma magasabb volt (öt vs. három-négy, **25. táblázat**). A HemosIL-teszt kissé magasabb CV-jének oka nem világos; ilyen különbséget nem találtak korábbi vizsgálatokban. Elvileg a különböző laboratóriumokban alkalmazott különböző kalibrátorok használata magyarázhatná az eltérést. Egységes kalibrátor bevezetése érdekében minden labornak juttattunk az SSC VWF kalibrátor plazmából. A minták korlátozott térfogata miatt azonban csak két laboratórium tudott két vizsgálatot végezni a

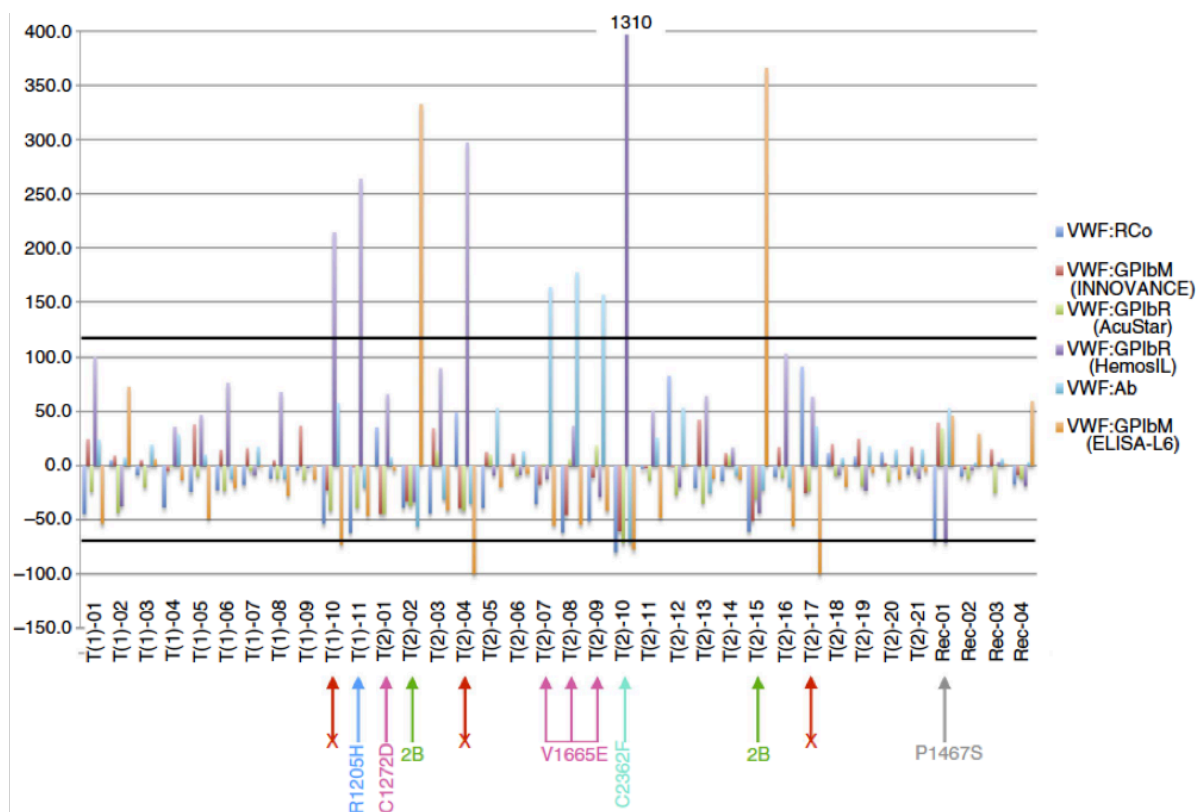
kiegészítő kalibrátorral (**37. ábra**). A két kalibrátor lényegében azonos eredményeket adott, ezért nem gondoljuk, hogy a kalibrátorok okozták a megfigyelt variabilitást.

Összefoglalva, az összes vizsgált VWF aktivitási mérés jól korrelált egymással és a VWF:Rco teszttel is. A COMPASS VWF vizsgálat enyhe különbségeket talált az egyes tesztek viselkedésében, amely ismeretek segíteni fogják a VWF közösséget az aktivitási eredmények értelmezésében és összehasonlításában.

## Bizonyos típusú minták esetében a GPIb kötő VWF aktivitási tesztek egymástól eltérő eredményeket adnak: COMPASS-VWF – II.<sup>276,277</sup>

Már az előző fejezetben részletezett összehasonlítás is mutatta, hogy van egy-két mérési pont, mely az azonossági egyenestől távolabb áll. Megvizsgáltuk, hogy ez vajon egyszerű mérési hiba, vagy az egyes tesztek szisztematikus viselkedési különbségeiből fakad-e.

A Módszerek című fejezetben leírt súlyozott százalékos távolsági teszt segítségével 11 olyan mintát azonosítottunk, amelyeknél egy vagy több vizsgálat a többihez képest jelentősen eltérő VWF aktivitást mutatott (38. ábra és 26. táblázat). Ezek közül háromról kiderült, hogy a következő okok miatt tévesen azonosította a teszt:



**38. ÁBRA.** Az egyes mérés típusok (tesztek) közötti súlyozott százalékos távolság. Az egyes betegminták minden egyes mérési eredménye esetében a vizsgálatok közötti súlyozott százalékos távolságot a  $100 \times (\text{assay átlag} - \text{többi átlag}) / \text{többi átlag}$  képlet segítségével számítottuk ki, ahol a *assay átlag* a különböző laboratóriumokban a kérdéses VWF-aktivitás vizsgálattal végzett mérések átlaga, a *többi átlag* pedig a kérdéses vizsgálaton kívüli összes vizsgálat során végzett összes VWF-aktivitás átlaga (a véletlenül felolvasott, az L8 laborba küldött minták eredményeit nem vettük figyelembe ennél a számításnál). Amint az a képletből látható, a százalékos távolság 0% a többi vizsgálat átlagával megegyező értékek esetén, és -100% 0 NE/dl értékek esetén, függetlenül a többi vizsgálat tényleges értékétől. A határértékeket önkényesen 120%-ra helyeztük a többi vizsgálat átlagánál magasabb, és -70%-ra az alacsonyabb értékeknél. Az ezzel a szűrővel azonosított betegmintákat az ábrán nyilakkal jelöltük, és feltüntettük a vonatkozó mutációkat. A piros X és nyilak jelzik a tévesen azonosított eltéréseket (lásd a szöveget). A T(2)-01 betegnél nem szűrünk ki diszkrét mérést, de nyilal jelöltük, mivel ennek a betegnek a multimer mintázatát hasonlítottuk össze a kiszűrt három V1665E mutációt hordozó beteggel (39. táblázat).

(1) Bár a GPIbR (HemosIL latex agglutináció) magasabb volt a T(1)-10 minta esetében, mint bármely más teszttel mérve, ez az 5. laboratóriumban végzett egyetlen magas mérésnek volt köszönhető (27. táblázat), és nem a tesztek szisztematikus eltérő viselkedésének. A kiugró

értéket a kezdeti statisztikai *outlier* szűrésünk nem detektálta, mivel az egyes mérések száma túl alacsony volt.

(2) A T(2)-04 minta esetében klinikailag jelentéktelen, csekély különbségek voltak a különböző vizsgálatokkal mért VWF aktivitás között. A súlyozott százalékos távolsági szűrési teszt azért választotta ki, mert a GPIbM-ELISA (L6) teszttel mért nulla érték és a VWF:GPIbR teszttel mért kissé magasabb érték kombinációja túlértékelte a különbségeket. A **26. táblázat** T(2)-04 oszlopa világosan mutatja, hogy az enyhe különbségek nem tükröznek fontos assay viselkedésbeli eltérést.

**26. TÁBLÁZAT. A szisztematikus eltérést mutató minták VWF aktivitása**

Beteg <sup>a</sup>	XT1-10	T1-11	T2-2	XT2-4	T2-7	T2-8	T2-9	T2-10	T2-15	XT2-17	R-1	R-4
VWB típus & mutáció	1 R1205H	1 R1205H	2B R1341Q	2M Y1312D	2A V1665E	2A V1665E	2A V1665E	2M C2362F	2B R1308C	2M C2362F	P1467S	D1472H
VWF:RCo	4,0	8,0	8,1	4,0	6,2	4,0	4,3	4,0	6,8	4,0	11,9	32,9
VWF:GPIbM INNOVANCE	6,3	19,0	8,8	1,9	7,6	5,6	7,3	7,6	8,4	1,9	46,7	32,6
VWF:GPIbR AcuStar	4,9	12,4	8,3	1,8	9,1	9,9	9,2	5,6	11,5	1,9	45,3	34,8
VWF:GPIbR HemosIL	18,3	48,2	8,8	7,7	8,0	12,1	6,0	77,0	9,6	3,6	11,6	18,7
VWF:Ab	11,4	15,7	6,0	2,0	18,6	20,1	16,3	5,6	12,7	3,1	50,1	40,0
VWF:GPIbM ELISA (L6)	2,4	11,1	34,6	0,0	4,4	4,7	5,0	4,5	45,6	0,0	48,3	36,1
VWF:GPIbR ELISA (L8) <sup>b</sup>	3,9	7,9	31,8	4,5	13,1	2,2	14,1	1,6	36,1	<1,6	5,1	56,3
VWF:GPIbM ELISA (L8) <sup>b</sup>	3,5	10,2	56,2	<1,6	6,8	10,5	5,9	7,0	69,0	<1,6	80,4	38,9
Átlag	6,8	16,6	20,3	2,7	9,2	8,1	8,5	14,1	25,0	2,0	37,4	36,3
Non-diszkrep. átlag <sup>c</sup>	5,2	12,0	8,0	2,5	7,9	7,0	7,4	5,1	9,8	2,3	54,2	N/A

A „ $100 \times (\text{átlag} - \text{többiek átlaga}) / \text{többiek átlaga}$ ” képlet alapján szisztematikus eltérést mutató 11 minta (10 beteg + 1 rekombináns – R-1) VWF-aktivitási eredményei. Valamennyi érték NE/dL egységben van megadva. *Megjegyzés:* A táblázat az adott vizsgálatot végző összes laboratórium méréseinek átlagát mutatja. A három ELISA tesztet csak egy-egy laboratórium végezte el, ezért az ELISA sorok egyetlen mérési eredményt mutatnak. A 120%-os és -70%-os önkényes határértékek alatti vagy feletti értékek félkövérrel vannak jelölve. Néhány magas érték azt eredményezte, hogy más, a többiek átlagától nem messze álló érték technikailag kissé 70% alatt vagy 120% felett voltak a súlyozott százalékos különbség elemzésében; ezeket kékkel jelöltük (lásd még a **38. ábrát**). Az összehasonlítás megkönnyítése érdekében a sorok sorrendje megegyezik a **38. ábra** vizsgálati sorrendjével. Megjegyzendő, hogy az utolsó két oszlop ELISA értékei nem szerepelnek a **38. ábrán**. Az utolsó oszlop (R-4) csak összehasonlítás céljából szerepel. Egy korábbi cikkel ellentétben<sup>22</sup>, a jelen vizsgálatban nem észleltünk jelentős eltérést a rekombináns D1472H VWF esetében.

<sup>a</sup>A betegazonosítók a könnyebb megértés érdekében a kód feltörése után (miután minden mérés befejeződött és a laborok eredményeit központilag rögzítettük) készültek. A laboroknak kezdetben kiküldött betegazonosítókat véletlenszerűen generáltuk.

<sup>b</sup>A 8. laboratóriumba küldött minták véletlenül felolvadtak a szállítás során. A 8. laboratórium kétféle házi ELISA rendszerben mérte a VWF:GPIbR és a VWF:GPIbM aktivitásokat. Mivel az összes eredmény analízise során megállapítottuk, hogy a felolvasztás nem vezetett a VWF aktivitás általános növekedéséhez, a két ELISA mérési eredményeit felvettük a **26. táblázatba**, mivel nyilvánvaló volt, hogy a két 2B beteg feltűnően és diszkrepánsan magas VWF aktivitása nem vezethető vissza a felolvasztás hatására. Egyébként ezt a két mérési eredményt nem vettük figyelembe a súlyozott százalékos elemzésben (**38. ábra**).

Piros X: Ezt a három beteg tévesen választotta ki szűrési stratégiánk (lásd a szöveget és a **27. táblázatot**).

<sup>c</sup>Ez a sor az eltérést nem mutató értékekkel számított átlagokat tartalmazza. A különbség kiemelése érdekében az egynél több eltérést mutató betegek esetében az összes eltérést kihagytuk (ellentétben a százalékos súlyozott távolság számításával).

(3) Végül a T(2)-17 minta csak azért került kiválasztásra, mert a százalékkal súlyozott különbség képlet technikai jellemzője, hogy bármely nullás mérés esetén 100%-os értéket ad.

A **26. táblázat** T(2)-17 sora egyértelműen azt mutatja, hogy egyáltalán nincs különbség a különböző VWF aktivitási eredmények között. Ezért a három „tévesen” kiválasztott T(1)-10,

**27. TÁBLÁZAT. Szisztematikus eltérést mutató minták**

Beteg	XT1-10	T1-11	XT2-4	T2-7	T2-8	T2-9	T2-10	R-1	R-1
Assay	GPIbR HemosIL	GPIbR HemosIL	GPIbR HemosIL	Ab	Ab	Ab	GPIbR HemosIL	RCo	GPIbR HemosIL
Lab 1	10,1	50,0	12,2	17,6	18,9	15,8	84,1	11,7	13,0
Lab 2	6,5	58,8	5,7	20,2	19,5	18,0	90,6	10,4	16,2
Lab 3	12,4	48,8	7,0	ND	ND	ND	73,3	2,0	4,2
Lab 4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	18,2	ND
Lab 5	44,0	35,0	6,0	18	22,0	15,5	60,0	17,0	13,0
Átlag	18,3	48,2	7,7	18,6	20,1	16,3	77,0	11,9	11,6

Az egyes laboratóriumokban a szisztematikus eltérés („ $100 \times (\text{átlag} - \text{többiek átlaga}) / \text{többiek átlaga}$ ”) alapján kiválasztott minták mérési eredményei és a mérések átlaga (lásd a szöveget és a **26. táblázatot**).

*Megjegyzés:* A jelen táblázat oszlopai a **26. táblázatban** pirossal jelölt cellák kibontását képviselik. A **26. táblázat** minden egyes cellájában az adott betegmintának az adott módszerrel több laboratóriumban mért átlaga van megadva (kivéve az utolsó három sort, amelyek egyetlen mérés eredményét mutatják – ez a három sor jelen táblázatban nem szerepel). Jelen táblázat mutatja az egyes laboratóriumi értékeket, amelyek az átlag kiszámításához szolgáltak (az átlag az utolsó sorban található). A legtöbb beteg esetében a laboratóriumok között kevés eltérés volt, kivéve a T1-10-es beteg esetében, az első oszlopban az 5. laboratórium adatát, amelyet piros színnel jelöltünk, és ennek alapján nem tekintjük szisztematikus eltérésnek.

Piros X: Ezt a két beteget tévesen választotta ki a szűrési stratégiánk. ND: az adott laboratóriumban nem végezték.

T(2)-04 és T(2)-17 mintát kizártuk a további elemzésből, és a fennmaradó nyolc mintára összpontosítottunk (**38. ábra**, **26. és 27. táblázat**). A következő szisztematikus teszt viselkedés különbségbeli mintázatokat észleltük:

**1. Az ELISA tesztek hamisan magas VWF aktivitás értéket mérnek 2B típusú VWB-ben**

A **2B** típusú VWB esetében az összes ELISA teszttel szembeötlően magasabb VWF aktivitást mértünk, mint a többi teszttel. A COMPASS-VWF vizsgálatba két beteg került be 2B típusú VWB-vel: T(2)-02 (p.R1341Q heterozigóta mutáció) és T(2)-15 (p.R1308C heterozigóta mutáció). A VWF aktivitásuk 6-9, illetve 7-13 NE/dl között volt a standard VWF:RCo teszttel, valamint az összes kereskedelmi forgalomban kapható új teszttel mérve, beleértve a Siemens VWF:GPIbM tesztjét (INNOVANCE) is, amely rekombináns funkcionyerő mutáns GPIb konstruktumot használ (még hozzá két ismert trombocita típusú VWB-t okozó mutációt is kombináltak). Ezen tesztekkel éles ellentétben mindhárom ELISA teszttel – kettő VWF:GPIbM, egy pedig VWF:GPIbR aktivitást mért – sokkal magasabb szinteket mértünk (**26. táblázat**). Úgy tűnik tehát, hogy a különbség inkább az ELISA mérés elvében rejlik, semmint a GPIb konstruktum funkcionyerő mutációjának jelenlétében vagy hiányában. Bár az L8 laborban a VWF:GPIbR ELISA és a VWF:GPIbM ELISA tesztek olyan mintákon végeztük, amelyek a szállítás során véletlenül felolvadtak, a jelenség nem tulajdonítható a felolvasásnak, mivel a felolvasás nem vezetett a VWF aktivitás általános növekedéséhez (nem közölt adatok). A VWF:GPIbM ELISA (L6) teszt, amely nem felolvaszott mintákat



használt, szintén ugyanilyen magas eredményeket mutatott a 2B típusú minták esetében. Ezen eredmények további pontosítása és megerősítése érdekében további 15, 2B típusú VWB beteg mintáit vizsgáltunk mikrogyöngy, illetve ELISA alapú VWF aktivitást mérő tesztekkel (**28. táblázat**). Ezek a betegek nem szerepeltek az eredeti COMPASS-VWF vizsgálatban, hanem kifejezetten azért vettük be őket, hogy nagyobb számú mintán megerősítsük, illetve finomítsuk a megfigyelt eltéréseket. Az első két 2B beteghez hasonlóan a 15 beteg közül kilencnél a VWF:GPIbR vagy a VWF:GPIbM ELISA-val mért értékek szembeötlően magasabbak voltak, mint a gyöngyalapú aktivitás tesztek mérésének bármelyike. Ez a kilenc beteg különböző 2B mutációkkal rendelkezett, de mindannyinak hiányoztak a nagy molekulatömegű (HMW) multimerjei (amint ez a szokványos 2B altípusnál várható). Ezzel szemben a másik hat betegnél, akiknél megmaradtak a HMW multimerok, alig volt különbség a gyöngy és ELISA alapú VWF aktivitás között. E betegek a 2B altípus speciális esetei – amit 2B New York/Malmö altípusnak szokás nevezni. Így arra a következtetésre jutottunk, hogy az ELISA módszerek diszkrepiánsan magasabb értékeket adnak a 2B típusú VWF aktivitásra; ez a jelenség csak a típusos 2B betegeknél fordul elő, akiknek hiányoznak a HMW multimerjei, míg a jelenség nem tapasztalható a 2B New York/Malmö altípusnál, ahol a HMW multimerok megtartottak.

### ***2. A VWF:Ab teszt magasabb értéket mér a p.V1665E mutációval rendelkező betegeknél***

A COMPASS-VWF vizsgálatba három egymással nem rokon 2A típusú VWB beteg került be a p.V1665E pontmutációval: T(2)-07, T(2)-08 és T(2)-09; és a VWF:Ab teszt mérés eredménye mindhármuknál következetesen magasabb VWF aktivitást mutatott, mint bármelyik más teszt mérési értéke (**26. és 27. táblázat**). Ebből az látszik, hogy a VWF:Ab rendszer kevésbé érzékeny a p.V1665E által okozott VWF aktivitási defektus kimutatására.

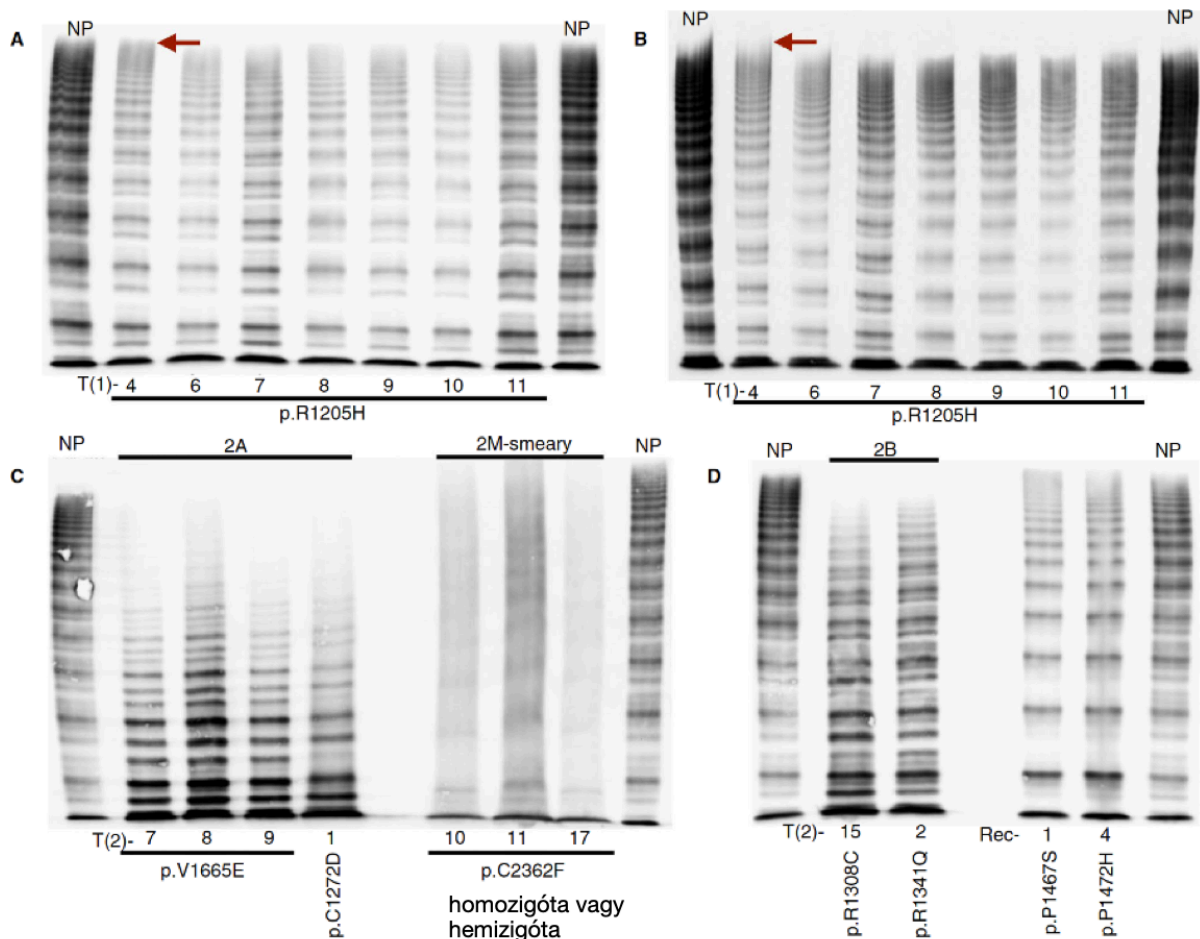
### ***3. A p.P1467S mutációt hordozó minták VWF aktivitását egy kivétellel (AcuStar) valamennyi risztocetint alkalmazó teszt tévesen alacsonyra méri***

A VWF:RCo teszt egyik fontos kritikája az, hogy a p.P1467S polimorfizmussal rendelkező (nem vérzékeny) egyének VWF:RCo aktivitását tévesen alacsonyra méri, mivel ez a genetikai variáns a VWF risztocetin kötőhelyét érinti, de nem befolyásolja a VWF fiziológias hemosztatis funkcióit. Ezzel teljes összhangban minden, nem risztocetint használó teszt helyesen mérte a homozigóta p.P1467S mutációt hordozó Rec-01 minta (egy 3-as típusú plazmában felvett mutáns rekombináns VWF fehérjét tartalmazó plazma) VWF aktivitását, míg a VWF:RCo és a VWF:GPIbR (mind a házi ELISA, mind a HemosIL latex agglutinációs

tesztek esetében) tévesen alacsony szintet mért. Meglepő módon azonban az AcuStar teszt, amely szintén risztocetin-aktiválással működik (mágneses gyöngyökön történő kemilumineszcens detektálással), nem esett bele ebbe a hibába. Megjegyezzük, hogy bizonyos irodalmi adatokkal szemben a homozigóta p.D1472H mutációval rendelkező rekombináns minta különböző VWF aktivitási szintjei között nem volt érdemi eltérés (26. táblázat, utolsó oszlop).

**4. A GPIbR latex agglutinációs teszt (HemosIL) a többinél magasabb VWF aktivitást mér két izolált beteg esetében: T(2)-10 és T(1)-11 betegek 2M (homozigóta p.C2362F) és VWB Vicenza (p.R1205H) eseteiben**

Az eltérő magas értékek egyértelműen a tesztrendszer viselkedéséből adódtak, mivel a HemosIL tesztet végzett VWF:GPIbR vizsgálatot végző valamennyi laboratórium azonos



**39. ÁBRA. Beteg minták multimer analízise.** (A) Közepes felbontású és (B) alacsony felbontású multimer gélek a COMPASS-VWF vizsgálatba bevont összes Vicenza fenotípusú betegről. A vízszintes piros nyíl az ultranagy molsúlyú multimereket hordozó betegre mutat. (C) 2A és 2M „smeary” fenotípusú VWD betegek közepes felbontású multimer analízise. A vonatkozó mutációk a gélek alatt fel vannak tüntetve. (D) Közepes felbontású multimer gélek: két 2B típusú VWD beteg (két bal oldali sáv) és egy 3-as típusú VWD beteg (VWF mentes) plazmájában felvett rekombináns minta). Minden gél tartalmaz normál plazma (NP) sávokat az összehasonlításához.

módon eltérő mérési értékeket talált a két beteg, T(2)-10 (homozigóta p.C2362F) és T(1)-11 (heterozigóta p.R1205H) mintáinak esetében (**27. táblázat**). Megjegyezzük azonban, hogy ezeket az eltérő értékeket csak egy-egy izolált betegnél észleltük, azonos mutációjú és multimer mintázatú társaiknál nem (**38. és 39. ábra**), így általános szabályszerűség e két esetből nehezen állapítható meg.

### ***Multimer analízis***

A minták további jellemzése érdekében valamennyi mintán multimer elemzést végeztünk. A **39. ábra** mutatja az összes eltérő aktivitást mutató minta multimer szerkezetét, valamint a normál plazma és az összes hasonló VWB altípusú betegek mintáit. Különösen érdekelt bennünket, hogy a T(1)-11 és a T(2)-10 minták esetében rendellenes multimer mintázatot találunk-e, amely esetleg megvilágítaná, hogy a VWF:GPIbR latex agglutinációs teszt (HemosIL) miért mért eltérő VWF aktivitást, mivel erre más plauzibilis magyarázatot nem kaptunk. A multimer mintázatok azonban hasonlóak voltak a többi Vicenza és 2M „smeary” betegek mintáihoz, mindenféle érzékelhető eltérések nélkül.

### ***Következtetések 2 (Megbeszélés)***

A VWF aktivitás mérésére szolgáló új tesztek bevezetése forradalmasította a VWB laboratóriumi diagnózist. Az új tesztek ugyanis egyszerűbb és megbízhatóbb méréseket tesznek lehetővé a régi, nagyon sokáig standardnak számító VWF:RCo méréshez viszonyítva. Bár az új tesztek eltérő mérési elveket alkalmaznak, általánosságban jó korrelációt tapasztaltunk az új tesztek és a VWF:RCo mérés között.<sup>26-32,34,35,37,262,263,271-275</sup> A COMPASS-VWF study<sup>276</sup> az ISTH SSC VWF albizottsága által szervezett, független, nemzetközi összehasonlító vizsgálat, amely több nemzetközi szaktekintélynek számító laboratórium VWF aktivitás méréseit hasonlította össze. Az adatok első elemzése csak kisebb különbségeket talált a vizsgálatok általános teljesítményében. Azonban mélyebben elemezve a COMPASS-VWF adatbázisának adatait, megkíséreltük elemezni a szisztematikus assay viselkedésbeli különbségeket. Nem könnyű a random assay mérési kilengéseket a tényleges assay viselkedésbeli különbségektől elkülöníteni. Először is eltávolítottuk a kiugrónak tekinthető (*outlier*) méréseket, más szóval a hibákat. Ezek lehetnek pipettázási hibák, adminisztrációs elírások vagy akár mintatévesztések. A Grubbs-tesztet használtuk az ilyen kiugró értékek objektív, statisztikai kiválogatására, és az összes adatpont 0,7%-át távolítottuk így el.

A nem-véletlenszerű eltérések azonosítására egy „százalékos távolság” szűrési stratégiát dolgoztunk ki (lásd Módszerek). Az ezzel a stratégiával azonosított VWF aktivitási

eredményeket azután manuálisan tekintettük át annak ellenőrzésére, hogy az eltérések valóban a) szisztematikusak (azaz egy adott teszt típus összes mérése, az összes ilyen mérést végző laborban eltérő, és nem egy véletlenszerűen magas vagy alacsony érték vezérli őket), és b) a különbség klinikailag releváns. A szűrési küszöbértéket önkényesen 120% és -70%-ra állítottuk be, mivel e küszöbértékek csökkentése csak a hamisan pozitív minták számát növelte anélkül, hogy valódi szisztematikus különbségeket detektált volna (itt nem közölt adatok). Ezzel a küszöbértékkel nyolc olyan mintát azonosítottunk, amelyekben valódi szisztematikus mérési eltérések voltak, míg három minta hamis pozitívnak bizonyult. A valódi eltérések elemzése a következő megállapításokat eredményezte:

1. A **normál kontrollokon** belül nem volt szisztematikus különbség a tesztek viselkedésben. Ez a megfigyelés az egyik leglényegesebb eredménye ennek a vizsgálatnak, és alátámasztja azt a hipotézist, hogy az új tesztek alapvetően megbízhatóan mérik a VWF aktivitást,<sup>276</sup> és az itt kimutatott assay viselkedésben mutatkozó különbségek a különböző mérési elvek miatt néhány specifikus VWF defektus esetére szorítkoznak csupán. Azonban ezek az információk éppen e betegek diagnózisának megbízhatósága szempontjából létfontosságúak.
2. A **VWB 2B betegek VWF aktivitását az összes ELISA alapú teszt hamisan magasnak mérte**. Mivel a VWF:GPIbM<sup>25</sup> kialakítása során a GPIb konstruktum létrehozásakor olyan mutációkat használtak, amelyek a trombocita-típusú VWB-t jellemzik, ahol a funkcionyerő (*gain of function*) mutáció spontán (azaz risztocetin-aktiválás nélküli) kötődést eredményez a VWF és a GPIb között, már korábbi szerzők is azt figyelték meg, hogy a 2B típusú betegeknél a VWF:GPIbM/VWF:Ag arányok emelkedettek a VWF:RCo/VWF:Ag arányokhoz képest.<sup>25</sup> Ugyanezen a vonalon egy másik, harminckét 2B típusú betegen végzett vizsgálat azt találta, hogy az emelkedett VWF:GPIbM/VWF:VWFRCo arány akár alkalmas is lehet a 2B típusú betegek azonosítására.<sup>280</sup> Megjegyzendő, hogy mindkét vizsgálatban ELISA rendszert használtak a VWF:GPIbM mérésére; mindenesetre arra a következtetésre jutottak, hogy a GPIbM magasabb értékeket mutat a 2B típusú VWF aktivitás mérésekor. Talán, úgy gondolták, azért, mert a funkcionyerő mutációval rendelkező GPIb konstruktum túlságosan is erősen kötődik a 2B típusú VWF szintén funkcionyerő mutációjához. A jelenlegi vizsgálat azonban egyértelművé teszi, hogy a megfigyelésnek nem ez az oka. A váratlanul magas értékeket valószínűleg nem a funkcionyerő mutáció jelenléte vagy hiánya okozta a korábbi vizsgálatokban sem, hanem maga az ELISA technika. Valóban, mindhárom ELISA alapú teszt (kettő közülük funkcionyerő mutációt alkalmazó GPIbM, és egy a mutáció nélküli GPIbR) szignifikánsan magasabb értékeket mért, mint az összes többi teszt.

Másrészt az automatizált, latexgyöngy alapú GPIbM nem mutatta ugyanezt a jelenséget az ebben a tesztben is alkalmazott funkcionyerő mutáció jelenléte ellenére sem.

3. E váratlan eredmény további megerősítése érdekében 15 újabb 2B típusú beteget vizsgáltunk egyetlen laboratóriumban (**28. táblázat**). A kezdeti megállapításunkkal összhangban a HMW multimerek elvesztésével jellemezhető valamennyi betegnél feltűnően magasabb ELISA értékek voltak mind a VWF:GPIbR, mind a VWF:GPIbM esetében, összehasonlítva az összes többi gyöngyalapú vizsgálattal, ami alátámasztja azt a következtetést, hogy az ELISA módszertan felelős az eltérő magas értékekért (**28. táblázat**).

**28. TÁBLÁZAT. 15 újabb 2B típusú beteg különböző VWF aktivitása**

Beteg #	Mutáció	GPIbR HemosIL	GPIbR AcuStar	GPIbM INNOVANCE	GPIbR ELISA (L5)	GPIbM ELISA (L5)
1	p.V1316M/WT	5,10	10,35	8,15	<b>33,5</b>	<b>39,00</b>
2	p.V1316M/WT	8,00	6,25	5,40	<b>18,50</b>	<b>28,00</b>
3	p.R1341Q/WT	13,93	13,25	11,40	<b>26,00</b>	<b>49,50</b>
4	p.R1341Q/WT	23,65	29,80	18,65	<b>49,00</b>	<b>59,50</b>
5	p.R1306W/WT	5,95	9,80	9,5	<b>28,50</b>	<b>40,00</b>
6	p.R1306W/WT	6,97	4,80	5,85	<b>11,00</b>	<b>18,00</b>
7	p.R1308C/WT	18,90	27,45	10,5	<b>95,50</b>	<b>101,00</b>
8	p.R1308C/WT	14,75	11,40	11,30	<b>39,50</b>	<b>39,00</b>
9	p.H1268D/WT	21,30	23,90	17,00	<b>49,00</b>	<b>60,00</b>
10	p.R1308L/WT	21,20	16,10	23,20	20,50	37,00
11 <sup>a</sup>	S1263S-P1266L/WT	63,20	52,60	66,65	65,00	61,00
12	p.S1263S-P1266L/WT	42,00	53,10	63,80	65,00	56,00
13	p.S1263S-P1266L/WT	42,90	49,80	61,50	75,00	59,00
14	p.V1245V-P1266L/WT	24,80	23,05	26,40	33,00	26,50
15	p.V1245V-P1266L/WT	67,50	60,45	70,15	44,50	69,00

*Megjegyzés:* Az 1.–9. betegnek klasszikus 2B típusú betegsége van a HMW multimerek elvesztésével, míg a 10.–15. betegnél a HMW multimerek megtartottak (2B New York/Malmö). A piros és vastagon szedett számok azok az ELISA aktivitások, amelyek átlaga legalább 100%-kal magasabb, mint az összes gyöngyalapú mérésé. Minden eredmény két vagy három különálló mérés átlaga.

<sup>a</sup>A 11. beteg három további szubsztitúciót is hordozott: p.V1229G, p.N1231T és p.V1245V.

4. Érdekes módon ez a különbség csak a HMW multimereket elvesztett 2B betegeknél volt jelen, és nem volt megfigyelhető a 2B New York/Malmö altípusnál, ahol a HMW multimerek megtartottak. Megjegyezzük, hogy egy korábbi közleményben<sup>17</sup> tizenhárom VWB 2B típusú beteg VWF:GPIbR (ELISA) értéke nem különbözött a VWF:RCo értékétől. Az aktivitásokat összesítve hasonlították össze, és a multimerek szerkezetéről nem számoltak be.<sup>17</sup> A mi eredményeinktől való eltérés oka nem világos. A latex és az ELISA alapú VWF aktivitás közötti különbség a HMW multimerek elvesztésével járó 2B típusú VWB betegek esetében egyelőre megmagyarázatlan, de úgy tűnik, hogy a két rendszer fizikai-kémiai jellemzőinek különbségeivel függ össze.

5. A **p.V1665E mutációnál mért diszkrepánsan magas VWF:Ab teszt eredmények.** A VWF:Ab assay olyan antitestet használ a méréséhez, amely a VWF A1 doménjének a GPIb-kötő felszínéhez kapcsolódva mintegy reprodukálja az A1 domén-GPIb kötődést. Ez úgy értelmezhető, hogy a vizsgálatban használt REF-VIII:R/2 monoklonális antitest a trombociták GPIb kötőhelyét utánozó (molekuláris mimikri) kötőfelületet biztosít. A hasonlóság mértéke azonban jelenleg nem ismert. Így lehetséges, hogy az A1 domén bizonyos szerkezeti változásai eltérően befolyásolják a VWF GPIb-hez és a REF-VIII:R/2 monoklonális antitesthez való kötődését. Ezért tanulságos ilyen VWF defektusokat találni a valós életből vett betegeknél. A p.V1665E mutáció az A2 doménben található, és 2A típusú VWB-t okoz a nagy és közepes méretű multimerek elvesztésének révén.<sup>281</sup> Hogy ez a konkrét mutáció hogyan fokozza az antitesthez való kötődést, nem világos, bár jól ismert, hogy bizonyos mutációk távoli tercier szerkezetek torzulását is okozhatják. A p.C1272D mutációt, amely hasonló HMW multimer veszteséggel jár (**39. ábra**), a VWF:Ab teszt helyesen detektálta (VWF:Ab: 3,3; az összes többi átlaga: 3,1); így nem valószínű, hogy a HMW multimerek hiánya önmagában lenne a jelenség oka. Az irodalomból is ismerünk olyan VWB 2M típusú mutációt amelyet a VWF:Ab assay nem kellően detektált.<sup>275</sup> Konkrétan három betegnél a p.G1324A (G561A az eredeti cikkben használt régi nomenklatura szerint) mutáció, amely az A1 domén GPIb kötőhelyét érinti, úgy tűnik, szintén eltérően módosítja a VWF GPIb-hez és REF-VIII:R/2 monoklonális antitesthez való kötődését.<sup>275</sup> Végül meg kell jegyeznünk, hogy bár a VWF:Ab mérés szignifikánsan magasabb volt a p.V1665E mutációt hordozó 2A betegeknél, mint az összes többi teszttel mért érték, de a VWF:Ab így is kórosnak minősítette e három beteg VWF-aktivitását (16,3-20,1 IU-dL; **26. táblázat**), így ezek a betegek helyes diagnózist kapnának a szűrővizsgálatnál, ha a VWF:Ab-t egyfajta szűrési stratégia részeként használjuk.
6. A **p.P1467S-t tartalmazó minták tévesen alacsony VWF aktivitása** jellemezte egy kivételével (AcuStar) valamennyi risztocetint alkalmazó assay típust. A VWF:RCo egyik hátránya, hogy tévesen alacsony VWF aktivitást jelez a p.P1467S polimorfizmus esetében,<sup>24,258</sup> amely bizonyos populációkban gyakori VWF változat, és amely nem eredményez funkcionális defektust, és nem jár vérzékeny fenotípussal. A hamis értékek oka abban rejlik, hogy a p.P1467S polimorfizmus zavarja magának a risztocetinnak a kötődését, és így csak az in vitro vizsgálati eredményeket befolyásolja, a fiziológiás, nagy nyíróerőkkel történő VWF aktiválást nem. Ezért a risztocetint használó tesztek tévesen alacsony értékeire a korábbi cikkek alapján számítottunk, és eredményeink megerősítették ezen ismereteket ebben a multicentrikus és vakon végzett vizsgálatban. Meglepetés viszont, hogy az egyik

risztocetinnel kiváltott tesztet, az AcuStar VWF:GPIbR assayt nem érintette ez a jelenség. Ennek oka nem világos. Lehet, hogy a tesztben használt risztocetin koncentrációval függ össze, de sajnos a tesztben használt tényleges koncentráció nem nyilvános információ, és az IL-től nem tudtuk a kit specifikációit megszerezni. Továbbá nem tapasztaltuk ugyanezt az eltérést a D1472H polimorfizmus esetében (ahogyan arra korábbi eredmények alapján számítottunk<sup>22</sup>). Nincs egyértelmű magyarázatunk az eltérés hiányára a mi vizsgálatunkban, de valószínűsítjük, hogy ez a natív és a rekombináns VWF közötti poszttranszlációs módosítások enyhe különbségeinek tudható be.

7. **Diszkrétisan magas VWF aktivitás a GPIbR latex agglutinációs tesztel (HemosIL)** két beteg esetében: egyikük homozigóta p.C2362F mutáció miatti 2M típusú VWB-ben, másikuk heterozigóta p.R1205H miatti Vicenza típusú VWB-ben szenvedett. Bár egyértelmű, hogy a vizsgálómódszer viselkedésbeli különbségének köszönhető a diszkrétancia, mivel a HemosIL vizsgálatot végző valamennyi laboratórium egyöntetűen eltérő értékeket mutatott ki a két betegnél – a T(2)-10 betegnél (homozigóta p.C2362F) és a T(1)-11 betegnél (heterozigóta p. R1205H) –, ezeket az eltérő értékeket csak egyetlen betegnél észleltük, és nem voltak jelen azonos mutációkkal rendelkező társaiknál – (T(2)-11 és T(2)-17 a p.C2362F esetében; T(1)-04, T(1)-06-10 a p.R1205H esetében – **(38. ábra)**), sem pedig az azonos multimer mintázattal jellemezhető többi betegnél (**39. ábra**). Így ebben a két esetben nem valószínű, hogy maguk a mutációk magyarázzák az eltérő assay viselkedést. A korlátozott mintamennyiség sajnos nem tette lehetővé a probléma további vizsgálatát; ezért csak feltételezhetjük, hogy a lehetséges magyarázat valamilyen zavaró anyag (pl. heterofil antitestek), amelyre a HemosIL VWF:GPIbR érzékenyebb, mint a többi teszt. Ez egyelőre spekulatív magyarázat marad.

Összefoglalva, eredményeink azt mutatják, hogy az új VWF aktivitási tesztek általában jól korrelálnak egymással és a VWF:RCo tesztel, ám bizonyos mutációk esetében jelentős viselkedésbeli különbségeket mutatnak, és ezeket a különbségeket figyelembe kell venni az eredmények értelmezésénél. Munkánk egyik erőssége, hogy csak molekulárisan jellemzett betegeket vontunk be, és számos ismétlődő mutációt vizsgáltunk mind az 1-es, mind a 2-es típusú VWB betegek esetében. Ez a felépítés megkönnyítette az egy adott hibára (pl. p.V1665E) vagy altípusra (pl. VWB 2B típus) vonatkozó következtetések levonását. Viszont a VWB mutációknak csak egy szűk spektrumát lehetett ilyen módon vizsgálni, ezért eredményeink csak korlátozottan általánosíthatók a többi VWB mutációra. Nyilvánvaló, hogy

több információra van szükség ahhoz, hogy az új tesztek megbízhatóan felcserélhetők legyenek minden beteg esetében.



## **A von Willebrand betegség kezelési elvei<sup>282-284</sup>**

Az előző két fejezetben a VWB diagnosztika fejlesztésében kifejtett kutatásokat mutattam be. A VWB kezelésének módozatairól számos szakértői csoport tollából több irányelv született.<sup>4,248,285-297</sup> Ezek hasonló elveket tükröznek a betegek kezelését illetően, csekély hangsúlybeli különbségekkel. Minthogy e *guideline*-ok egy részének összeállításában személyesen is részt vettem,<sup>282-284</sup> ebben a fejezetben röviden összefoglalom a VWB kezelésének alapelveit. Bár a kezelési elvek konszenzusos kialakítása magas szintű szellemi munka, ez nem tartozik szoros értelemben a kutatási tevékenységhez. Ezért ebben a fejezetben csak a kezelési elvek lényegét foglaltam össze. Általánosságban elmondhatjuk, hogy a VWB-ben szenvedő betegek vérzésének megállítására három fő módszer áll rendelkezésre terápiás eszköztárunkban: a VWF plazmaszintjének korrekciója *(i)* DDAVP-vel vagy *(ii)* faktorpótlással, és *(iii)* a vérzési hajlam csökkentése alternatív útvonalak manipulálásával antifibrinolitikus szerek vagy ösztrogén-progeszteron gyógyszerek révén. Ez a három megközelítés természetesen nem zárja ki egymást, hanem inkább kiegészíti.

### ***Dezmopresszin (DDAVP)***

A dezmopresszin (1-deamino-8-d-arginin-vasopresszin) a vasopresszin szintetikus analógja.<sup>286,288</sup> A DDAVP [Emosint (Kedrion, Pascoti Barga, Italia), Minirin (Ferring AB, Malmö, Svédország), Octostim (FerringAB, Malmö, Svédország)] olcsó és mentes a vér útján terjedő fertőzések átvitelének kockázatától. Lehetőség szerint a dezmopresszint kell előnyben részesíteni a kezelésben. A szokásos adagolás intravénás úton történik, 0,3 µg/kg egy dózisban, infúzió formájában, 20-30 perc alatt. A diagnózis felállításakor egy tesztinfúzió ajánlott a jövőbeli válasz előrejelzésére.<sup>241,298</sup> A dezmopresszin infúzió általában jól tolerálható, a tahikardia, a fejfájás és a kipirulás a fő mellékhatások, amelyek általában az infúzió lassításával javulnak. Az ismételt DDAVP adagok gyakran fokozatosan hatástalanná válnak (ez az úgynevezett tahifilaxis jelensége), amit az endotél Weibel–Palade-testjeiben tárolt VWF raktárak kimerülése okoz.

Ezt figyelembe kell venni, ha hosszabb ideig tartó használatot tervezünk (pl. nagyobb műtétek esetén).<sup>299</sup> A DDAVP ritkán volumentúlterhelést és hiponatrémiát okozhat, különösen kisgyermeknél, ismételt adagok után.<sup>300</sup> Óvatosságot kell tanúsítani (vagy az alkalmazást kerülni kell) a kardiovaszkuláris betegségben szenvedő idős betegek kezelésének tervezésekor.<sup>301,302</sup> Végül a DDAVP ellenjavalltnak tekinthető 2B típusú vagy trombocita típusú VWB-ben szenvedő betegek esetében.<sup>303,304</sup> Ennek az az oka, hogy a mutáns VWF

szintjének megemelkedése fokozhatja a trombocitopéniát, és ezáltal súlyosbodhat a vérzékenység. Meg kell jegyezni, hogy nem mindenki ért egyet ezzel a kontraindikációval, de az óvatosság mégis azt diktálja, hogy az irányelvek ne javasolják a DDAVP-t ezeknek a betegeknek.

### **VWF faktorpótló kezelés**

Jelenleg többféle faktorkoncentrátum is forgalomban van VWB betegek kezelésére. E faktorkészítményeket a **29. táblázat** mutatja.<sup>305,306</sup> A kezelés célja a plazma VWF:RCo

### **29. TÁBLÁZAT. Az Európában a VWB kezelésére gyakran használt faktorkészítmények.**

Termék	Alphanate	Biostate	Fandhi	Veyvondi*	Haemate P	Wilate	Wilfactin
Gyártó	Grifols	CSL Behring	Grifols	Takeda Shire	CSL Behring	Octapharma	LFB
Tisztítási módszer	Heparin CTG	Precipitáció + heparin CTG	Heparin CTG	mAT affinitás CTG	Multiplex elektrolit precipitáció	Ioncsere + gélszűrés	Ioncsere + affinitás CTG
Vírus inaktiváció	S/D + szárazlég (80°C 72 ó)	S/D + szárazlég (80°C 72 ó)	S/D + szárazlég (80°C 72 ó)	NF	Pasteurizálás (60°C 10 ó)	S/D + szárazlég (100°C 2 ó)	S/D + 35 nm NF + szárazlég (80°C 72 ó)
FVIII NE/mg	>100	50	>100	nyomokban	40	>80	>50 <sup>†</sup>
VWF:RCo/Ag	0,94	0,8	0,83	110 VWF:RCo/mg	0,96	0,7	0,95
VWF:RCo/FVIII	1,21	2,0	1,48	>100	2,54	0,8-1,0	>10

A Magyarországon 2023-ban forgalomban lévő **vastagon** szedve.

CTG: kromatográfia; S/D solvens/detergens kezelés; NF: nanofiltráció. mAT: monoklonális antitest.

<sup>†</sup>VWF:RCo/mg mértékegységben megadva. \*Rekombináns termék (Az USA-ban Vonvendi néven).

aktivitás >50 NE/dL (kritikus vérzés vagy nagykockázatú műtét esetén (>80-100 NE/dL) szintre emelése nagyobb műtétek esetén 7-14 napig, kisebb beavatkozásokhoz 1-5 napig. Az ennek eléréséhez szükséges tipikus telítő dózis 50 VWF:RCo NE/kg, amit nagy műtétek esetén 8-12 óránként, kisebb beavatkozásokhoz 12-18 óránként 20-40 NE/kg fenntartó adagolás követ. A VWF:RCo és FVIII napi meghatározása kötelező a megfelelő VWF szintek fenntartása és az ultra-magas (azaz >200 NE/dl) FVIII szintek elkerülése érdekében.<sup>286,296</sup> Ne felejtsük el, hogy a VWF szintek normalizálódását követően az illető műtétnél szokásos tromboprofilaxist kell alkalmazni a betegeknek.

*Hosszú távú másodlagos profilaxis.* Az elmúlt évtizedben világossá vált, hogy a VWB súlyos formáiban a hosszú távú faktor pótló profilaxis előnyös és javasolt.<sup>307-309</sup>

### **Kiegészítő kezelési eljárások a hemosztázis alternatív befolyásolására**

*Antifibrinolitikus szerek.* Mivel a nyálkahártyák felszíne gazdag fibrinolitikus aktivitásban,<sup>286</sup> a fibrinolízis blokkolása hasznos kiegészítő kezelés a vérzés megállítására. Epsilon-

aminokapronsav (50-60 mg/kg dózisban, 4-6 óránként) vagy tranexámsav (10-15 mg/kg dózisban, 8-12 óránként) adható szájon át, intravénásan vagy helyileg.<sup>286</sup>

*Ösztrogén-progeszteron készítmények.* A hormonális manipuláció csökkenti az endometrium vérzékenységét, így ezek a szerek nagyon hasznosak lehetnek a menorrhagia kezelésében a VWB betegeknél.<sup>286,288</sup>

## Az autoimmun szerzett hemofília A kezelése: hatékony immunszuppresszív kezelési protokoll kidolgozása – CyDRi<sup>310</sup>

Tekintettel a szerzett hemofília (AHA) immunszuppressziós kezelésével kapcsolatos bizonytalan ajánlásokra és a szekvenciális kezelésekhez kapcsolódó negatív tapasztalatra, újszerű megközelítésre volt szükség. Az azonnal első vonalban kombináltan adott („*hit it hard at the beginning*”) kezelések potenciális előnye a rövidebb szteroidexpozíció és ezzel járó toxicitás, valamint a fokozott hatékonyság. Ezért 2009 szeptemberétől a Dél-pesti Centrumkórház Szent László Kampuszán kidolgoztunk egy CyDRi elnevezésű intézményi

### 30. TÁBLÁZAT. A 32 beteg részletes adatai

ID	Kor	Nem	FVIII	BU	Alap- betegség	Ko- morb	ECOG	T-Dg	# CyDRi	# Relab	T- Bypas	Szöv.	F/U	Túlél.
3B1	56	N	5	1.3	-	2	1	30	1	0	4	-	1305	I
3B2	85	F	0	1.5	-	3	2	31	1	0	0	-	652	N
3B3	84	N	0	3165	-	0	3	30	9	0	159	-	968	I
3B4	77	N	0	121	BP RA	2	2	15	1	0	0	-	748	I
3B5	78	F	0		Hashimoto	1	4	29	1	0	0	-	642	I
3B6	75	N	0	34	RA	0	2	15	1	0	0	-	811	I
3B7	82	F	0	115	-	0	3	35	3	0	15	-	602	I
3B8	65	N	0	106	-	0	2	30	2	0	0	-	531	I
3B9	85	N	4	16	-	0	2	14	2	0	21	-	442	I
LA1	77	F	0	15.5	Basedow	1	3	0.5	1	0	0	-	1989	I
LA2	68	F	3	17	-	1	1	1	1	0	15	-	1828	I
LA3	75	N	2	9.2	Basedow Cervix CA	2	1	8	2	0	0	-	981	I
LA4	74	N	5	3.8	Hashimoto	0	2	38	2	0	0	-	3241	I
LA5	66	N	0.9	5.5	-	1	1	14	2	0	16	-	3199	I
LA6	80	N	12	5.9	-	0	3	2	1	0	32	-	78	I
LA7	73	F	5	8.5	Prostata CA	4	4	2	3	2	45	PNA	3319	I
LA8	78	F	0	500	Prostata CA	2	2	14	1	0	28	-	2317	I
LA9	64	F	14	3.8	SLE	5	1	120	1	0	0	-	460	N
LA10	78	N	1	14.2	-	2	1	12	1	0	27	-	2625	I
LA11	79	N	8	3.8	BP Basalioma Melanoma	2	3	11	1	0	0	-	1556	I
LA12	78	N	0	211	-	0	1	0	3	0	0	-	3092	I
LA13	81	N	1	140	Endometrialis CA	4	2	17	3	1	3	Cisztitisz	416	I
LA14	86	N	2	2	-	3	1	7	1	0	0	-	68	I
LA15	82	N	4	3.1	-	1	4	14	1	0	0	PNA*	27	N
LA16	53	F	3	13.8	-	1	3	9	1	0	20	Tályog	262	I
LA17	64	N	1	175	-	1	2	N/A	1	0	14	-	2632	I
LA18	74	N	17	19	Adrenalis Incidentaloma	4	2	7	1	0	0	-	844	I
LA19	65	F	7	73.9	-	1	2	75	1	0	16	C.diff	372	I
LA20	63	F	0	500	Adrenalis Incidentaloma	3	1	1	1	0	0	-	679	I
LA21	60	F	1	110	-	1	1	19	1	0	0	-	1009	I
LA22	78	F	0	31.4	-	1	2	28	1	0	21	-	165	I
LA23	87	F	0	90	-	2	2	270	1	0	0	-	496	I
	ÁTL (SD)	%N	ÁTL (SD)	ÁTL (SD)		ÁTL (SD)	ÁTL (SD)	ÁTL (SD)	%≥1	%≥1	%≥1	%AE	ÁTL (SD)	%I
	74.1 (9.1)	56.3	3 (4.4)	177.9 (552.2)		1.6 (1.4)	2.1 (0.9)	29 (49.1)	100	6.3	46.9	15.6	1198.6 (1044.3)	90.6

N: nő, F: férfi. FVIII NE/dl egységben. BU: Bethesda inhibitor titer. BP: bullózus pemphigoid. CA: carcinoma (valamennyi beteg remisszióban volt), Hashimoto: Hashimoto thyreoiditis. RA: reumatoid artritisz. ÁTL: átlag. Komorb: komorbiditási index (lásd Charlson és mtsai<sup>21</sup>). T-Dg: Az első tünettől a diagnózisig eltelt idő (*time to diagnosis*); #CyDRi: hány ciklus CyDRi-t kapott a beteg a CR eléréséig; #Relab: a relapszusok száma; T-Bypass: a bypass szerrel való kezelés időtartama, napokban; PNA: pneumonia. Tályog, mely műtét után gyógyult. C.diff: Clostridium difficile colitis. I: igen; N: nem. Szöv. szövődemény (*adverse event*). F/U: Az utánkövetés (*follow-up*) napokban. Túlél.: Életben volt-e a beteg az utánkövetés utolsó napján. \*Az idős rossz állapotú beteg, akinél inoperabilis combnyaktörés kapcsán derült ki az AHA, hypostatikus pneumonia miatt halt meg – így az immunszuppresszió hozzájáruló szerepét nem lehet kizárni.

kezelési protokollt, amely intravénás **cyclofoszfamid**, **dexamethason** és kisdózisú **rituximab** lökészerűen adott dózisait alkalmazza. Ezt követően minden beteget ezzel a protokollal kezeltünk. 2017 szeptemberétől a CyDRi-t a Semmelweis Egyetemen is bevezettük. Az itt bemutatott retrospektív elemzés a két részt vevő intézményben CyDRi-vel kezelt első 32 beteg részletekbe menő áttekintése. A betegek klinikai adatainak részleteit a **30. táblázat** mutatja.

### ***A CyDRi protokoll részletezése***

A CyDRi kombinált immunszuppressziós kezelés (IST), amely a következő elemekből áll: *1000 mg cyclofoszfamid* iv. az 1. és 22. napon; *40 mg dexamethason* iv. vagy per os az 1., 8., 15. és 22. napon; *100 mg rituximab* iv. az 1., 8., 15. és 22. napon (**31. táblázat**). Szükség esetén a CyDRi-t legkorábban az előző ciklus 43. napján ismételtük meg. A CyDRi második vagy

Kezelés hete:	1.	2.	3.	4.	5.	6.
<b>Cyclophosphamide</b> 1000 mg, i.v.	↑			↑		
<b>Dexamethasone</b> 40 mg i.v. / p.o.	↑	↑	↑	↑		
<b>Rituximab</b> 100 mg, i.v.	↑	↑	↑	↑		

**31. TÁBLÁZAT. A CyDRi protokoll** (6 hetes kezelési ciklusok).

további ciklusának adásáról a következő kritériumok valamelyikének teljesülése esetén döntöttünk: (1) az előző ciklus 42. napjáig nem volt kielégítő emelkedés a FVIII szintjében (ún. „lassú válasz”); vagy (2) a Bethesda-titer emelkedését észleltük remisszió elérése után (ún. „laboratóriumi relapszus”) bármely időpontban. A „lassú válasz” a kezelőorvos némileg szubjektív döntése (ez általában 1-3 héten át <50 NE/dl-es FVIII szintet jelentett); amennyiben a FVIII tovább emelkedett, a várakozás („*watch-and-wait*”) stratégiát alkalmaztuk, kivéve ha vérzéses tünetek jelentkeztek. A kimutatható anti-FVIII antitestek nem voltak előfeltételként formálisan előírva a következő CyDRi ciklushoz (de 8 betegből 7-nél >0 volt a BU titer a CyDRi ismétlésének időpontjában). Mivel a Bethesda-teszt közismerten érzéketlen, a <50 NE/dl FVIII szintet a perzisztens anti-FVIII antitest bizonyítékának tekintettük, akár ki lehetett mutatni őket a Bethesda-teszttel, akár nem.

A betegek kezelését minden esetben fekvőbetegként kezdtük meg. A „*bypass*” szerek adásáról a kezelőorvos döntött a felvételkor a súlyos aktív vérzés jelenléte vagy hiánya alapján. Minden beteg legalább egy ciklus CyDRi-t kapott. Minden betegnél Acyclovir (napi egyszer

400 mg) vírusprofilaxist alkalmaztunk a kezelés teljes időtartama alatt és az utolsó ciklus utolsó napját követő 6 hónapon át.

### ***A 32 betegből álló kohorsz jellemzői***

A vizsgált kohorsz jellemzőit a **32. táblázat** foglalja össze. A betegek életkora 53 és 87 év között változott. A FVIII aktivitás mediánja a diagnózis felállításakor 1 NE/dl volt (tartomány: 0-17 NE/dl; interkvartilis tartomány [IQR]: 0-4,3 NE/dl), és a medián kezdeti inhibitor titer 17 BU volt (tartomány: 1,3-3165 BU; IQR: 5,7-112,5 BU). Tizennégy (43,8%) beteg kezdeti Bethesda-titerének értéke volt >20 BU. 13 betegnél (40,6%) azonosítottunk valamilyen alapbetegséget; a fennmaradó 19 esetet idiopátiásnak tekintettük. Az egyes betegek fontosabb klinikai és laboratóriumi adatait az **30.** és **32. táblázat** tartalmazza. A medián utánkövetés 779,5 nap volt (tartomány: 27-3319 nap; IQR: 455,5-1868,2 nap). Az első tünet megjelenése és a

**32. TÁBLÁZAT. A kohorsz demográfiai és klinikai jellemzői**

Jellemző	Érték (%)
<b>Minden beteg, n</b>	<b>32</b>
Férfi	14 (43,7)
Nő	18 (56,3)
<b>Életkor, év, teljes tartomány</b>	53-87
Átlag ± SD	74,1 ± 9,1
Medián (IQR)	77 (65,8-80,3)
> 80 é	9 (28,1)
> 85 é	4 (12,5)
<b>Alapbetegségek és társbetegségek</b>	
Komorbiditási index, átlag ± SD	1,6 ± 1,4
ECOG teljesítmény score, átlag ± SD	2,1 ± 0,9
4	3
3	6
2	13
1	10
<i>Alapbetegségek*</i>	
Nem volt (idiopátiás)	19 (59,4)
Autoimmun	8 (25)
Bullózus pemphigoid (BP)	2
Hipertireózis (Basedow-kór)	2
Hashimoto hipotireózis	2
Rheumatoid arthritis (RA)	2
SLE	1
Neoplázia	7 (21,9)
<i>Gyakoribb társbetegségek*</i>	
Hipertónia	18 (56,3)
Cardiovascularis betegségek	10 (31,3)
Cukorbetegség, 2-es típus	6 (18,8)
COPD	6 (18,8)

**32. TÁBLÁZAT (folytatás).**

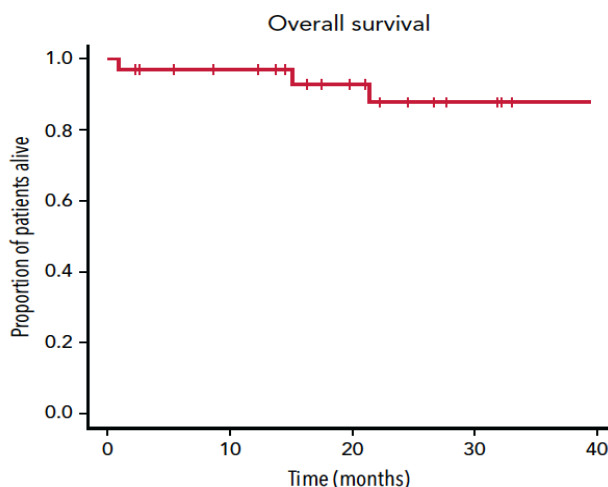
Jellemző	Érték (%)
<b>Az AHA súlyossága diagnóziskor</b>	
Kiindulási FVIII, átlag $\pm$ SD, NE/dL	3 $\pm$ 4,4
Medián (IQR)	1 (0-4,3)
Kiindulási inhibitor szint, átlag $\pm$ SD, BU	177,9 $\pm$ 552,2
Medián (IQR)	17 (5,7-112,5)
>20 BU	14 (43,8)
>100 BU	10 (31,3)
>1000 BU	1 (3,1)
<b>CR-hez szükséges CyDRi ciklusok száma</b>	
Valamennyi beteg, átlag $\pm$ SD	1,66 $\pm$ 1,52
Valamennyi beteg, medián (IQR)	1 (1-2)
Egyetlen ciklus	22
2 ciklus	5
3 ciklus	4
9 ciklus	1

A kohorsz demográfiai és klinikai jellemzői. \*A számok nem additívak, mert vannak átfedések (pl. az egyik betegnek RA és pemphigoid betegsége is volt).

diagnózis felállítása között eltelt medián idő 14 nap volt (tartomány: 0-270 nap; IQR: 7,5-30 nap).

**A kezelés hatékonysága**

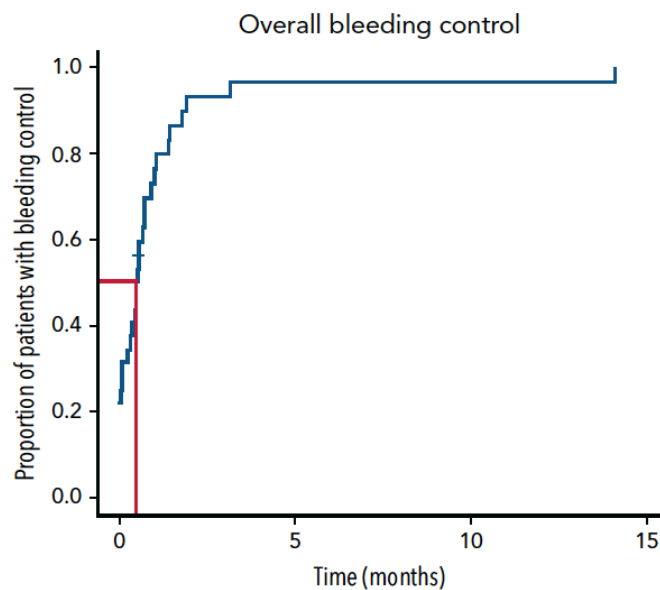
(1) **Túlélés (40. ábra):** Az utolsó vizitkor 29 (90,6%) beteg volt életben a 32-ből, mindegyikük tartós CR-ben (követési idő medián: 779,5 nap; tartomány: 27-3319 nap; IQR: 455,5-1868,2 nap). Három beteg halt meg a megfigyelési időszak alatt. Egy idősebb, nagyon gyenge, inoperábilis combnyaktörés miatt kezelt beteg (LA15) 27 nappal a diagnózis felállítása után hiposztatikus pneumóniában halt meg – ebben az esetben nem tudtuk kizárni az immunszuppresszív kezelés (IST) szerepét. Bethesda-titere meredeken csökkent,



**40. ÁBRA. A CyDRi-vel kezelt kohorsz teljes túlélése.** A Kaplan-Meier-görbe a teljes kohorszot (n = 32) ábrázolja. A medián követési idő 779,5 (tartomány: 27–3319; IQR: 455,5–1868,2) nap. Az 1. nap a diagnózis napja, ami általában a CyDRi első ciklusának 1. napja is volt.

de a CR-t még nem érte el halálakor. Egy másik beteg, aki addigra >1 éve volt CR-ben, szeptikus epizódban halt meg, amely alapbetegségei szövődménye volt (szisztémás lupus erythematosus, lupus nefritisz, dialízist igénylő veseelégtelenség és rosszul szabályozott diabetes mellitus). A harmadik beteg független társbetegségben (hipertóniás kardiomiopátia és súlyos szívelégtelenség) halt meg >1,5 évvel a tartós CR elérése után. Az utolsó hónapokban több kórházi kezelés kapcsán szorosán figyelemmel kísértük, mindvégig remisszióban maradt, és az antikoagulációs kezelés ellenére (pitvarfibrilláció és dilatatív kardiomiopátia miatt) nem volt vérzéses szövődménye. Az általános túlélés nem mutatott összefüggést a következőkkel: (1) a kezdeti inhibitor titerrel ( $p=0,1$ ); (2) a kezdeti FVIII aktivitással ( $p=0,3$ ); (3) az Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) státusszal ( $p=0,7$ ); sem (4) a komorbiditási indexszel ( $p=0,055$ ).

- (2) **Vérzéskontroll (41. ábra):** A 32 beteg közül 12-nél (37,5%) jelentkeztek olyan aktív vérzéses tünetek, amelyek a felvétel időpontjától a vérzéskontroll eléréséig (a CyDRi kezeléssel párhuzamosan) bypass szereket igényeltek. A fennmaradó 20 betegnek a



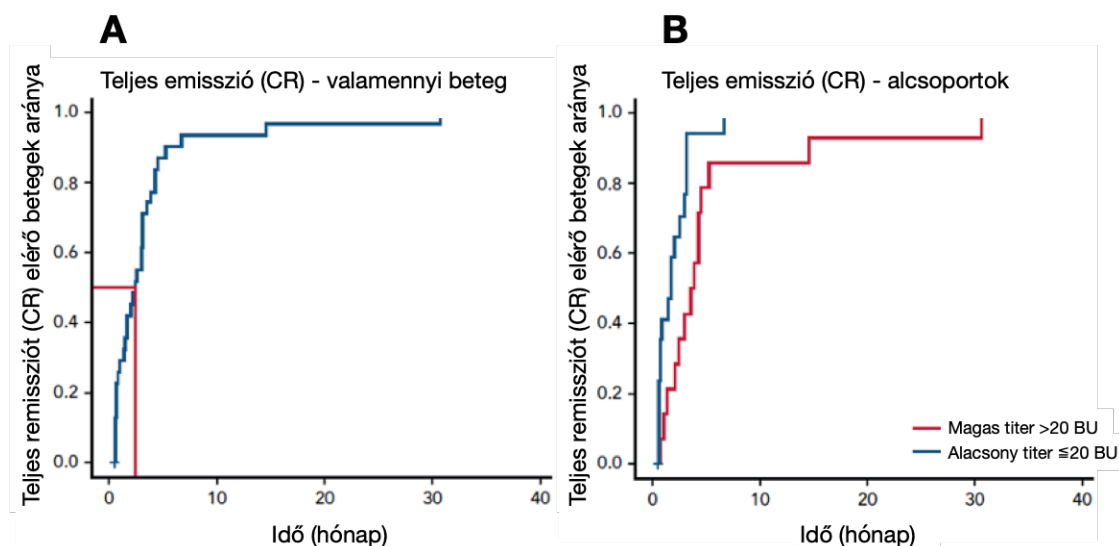
**41. ÁBRA. Vérzéskontroll a CyDRi-vel kezelt kohorszban.** A Kaplan-Meier-görbe a teljes kohorszra ( $n = 32$ ) vonatkozik. A vérzéscsillapításig eltelt idő mediánja 15,5 (tartomány: 0–429; IQR: 2,5–29,5) nap volt. A kohorsz medián követési ideje 779,5 (tartomány: 27–3319; IQR: 455,5–1868,2) nap volt.

felvétel előtt volt vérzése, de a felvételnél nem véreztek aktívan, és a CyDRi-t bypass szerek nélkül kapták; közülük három betegnél később bekövetkezett olyan vérzéses epizód, amely valamelyik bypass szer alkalmazását igényelte. Bár 17 betegnél a felvételt követően már nem jelentkezett vérzés, a vérzéskontroll szigorú definíciója miatt (bypass szer nélkül sincs klinikai vérzés + stabil hemoglobinszint) a vérzéskontroll eléréséig eltelt idő csak 7 betegben adódott 0 napnak. A fennmaradó 10 beteg vagy elővigyázatosságból kapott



bypass szert egy, a felvétel előtt nemrég bekövetkezett vérzés miatt, vagy a stabil hemoglobinszintet nem lehetett azonnal megállapítani tényleges esés vagy adathiány miatt. A vérzéskontroll eléréséhez szükséges átlagos idő az egész kohorszban 15,5 nap volt (tartomány: 0–429 nap; IQR: 2,5–29,5 nap). A második hónap végére a betegek többsége (32-ből 29) vérzésmentes volt. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a vérzéskontroll eléréséhez szükséges idő és a kezdeti inhibitor titer ( $p=1$ ), az FVIII aktivitás ( $p=0,6$ ), az ECOG státusz ( $p=0,2$ ) vagy a komorbiditási index ( $p=0,3$ ) között. Bypass szereken töltött napok: Vérzés esetén a betegek a kezelőorvos belátása szerint kaptak bypass szereket. Tizenöt beteg (46,9%) kapott legalább egyszer valamilyen bypass szert a megfigyelési időszak alatt. A bypass szerrel töltött napok mediánja 18 nap volt (tartomány: 3–159 nap; IQR: 15–27,3 nap). Nyolc beteg kapott rekombináns FVIIa-t, öt beteg kapott anti-inhibitor koaguláns komplexet (APCC), és két beteg, aki kezdetben rekombináns FVIIa-t kapott, később APCC-re váltott. A váltás oka a kényelmesebb ambulánsan is adható adagolás volt.

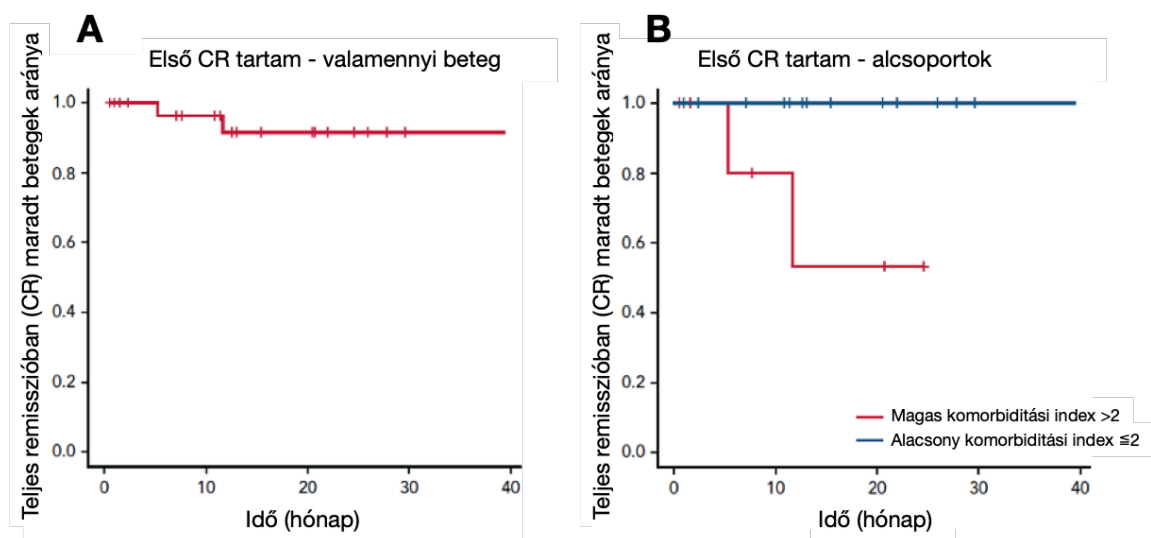
- (3) **CR (42. A ábra):** A 32 beteg közül 31-nél (96,9%) sikerült CR-t elérni az utolsó követésig. A CR-t egy idős betegnél nem értük el, akinek inhibitor titere ugyan gyorsan csökkent, de hiposztatikus pneumóniában meghalt, mielőtt a CR-t elérte volna. A CR eléréséig eltelt idő (TTCR) 77 nap volt (tartomány: 19-939 nap; IQR: 31-115 nap). Az egyik betegnél a kiindulási Bethesda-titer kivételesen magas volt (3165 BU). Neki 939 napra volt szüksége a CR eléréséhez. Statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk a TTCR és a kezdeti inhibitor koncentráció között ( $p=0,009$ ) (42. B ábra). Nem volt viszont összefüggés a



**42. ÁBRA. Első CR.** (A) A Kaplan-Meier-görbék a teljes kohorszt ( $n = 32$ ) ábrázolják. A TTCR medián 77 (tartomány: 19-939; IQR: 31-115) nap volt. A kohorszban 31 remissziós eseményt regisztráltunk (96,9%). (B) A CR Kaplan-Meier-görbéket két alcsoportra ábráztuk: magas titerű (>20 BU, 14 beteg) és alacsony titerű (≤20 BU, 18 beteg) anti-FVIII antitestekkel rendelkező betegek ( $p = 0,009$ ). A kohorsz medián követési ideje 779,5 (tartomány: 27–3319; IQR: 455,5–1868,2) nap volt.

TTCR és a kezdeti FVIII aktivitás ( $p=0,09$ ), az ECOG-státusz ( $p=0,4$ ) vagy a komorbiditási index ( $p=0,6$ ) között.

- (4) **Az első CR időtartama (43. A ábra):** Az első CR medián időtartama ebben a kohorszban 630 nap volt (tartomány: 17–3178 nap; IQR: 280,5–1577,0 nap). Összefüggést találtunk a CR időtartama és a komorbiditási index között ( $p=0,002$ ) (43. B ábra). Ez főként a magasabb komorbiditási indexű betegek magasabb visszaesési hajlamának volt köszönhető. Nem találtunk azonban szignifikáns korrelációt a CR időtartama és a kezdeti inhibitor titer ( $p=0,9$ ), a kezdeti FVIII-aktivitás ( $p=0,7$ ) vagy az ECOG-státusz ( $p=0,4$ ) között.



**43. ÁBRA. Első CR időtartama.** Ehhez az elemzéshez a Kaplan-Meier-görbékét a 0. időponttól, vagyis attól az időponttól kezdve ábrázoltuk, amikor a betegek elérték az első CR-t. A visszaeséseket nem vettük figyelembe különálló eseményként ebben az elemzésben ( $n = 31$  CR esemény). (A) A teljes kohorsz CR időtartama ( $n = 31$ ). (B) A két alcsoport (magas [ $>2$ ] és alacsony [ $\leq 2$ ] komorbiditási indexű<sup>21</sup> betegek) összehasonlításában 8, illetve 23 remissziós esemény volt ( $p = 0,002$ ). Az első CR utáni medián megfigyelési idő medián 630 (tartomány: 17–3178; IQR: 280,5–1577,0) nap volt. A három visszaesés esetében a további CR-ek időtartama 161 és 1385 nap között volt (medián: 1372 nap).

- (5) **Relapszusok és a második vagy további CR időtartama:** A 31 CR-ben lévő beteg közül csak két betegnél fordult elő relapszus (a relapszus ráta 6,5%). Ennek a két betegnek (LA7 és LA13) összesen három relapszusos epizódja volt. A két beteg öt AHA epizódját a **33. táblázat** mutatja. A CyDRi kezelés ugyanolyan hatásosnak bizonyult a relapszusok kezelésében, mint az első vonalban. A második CR eléréséhez szükséges idő 22, 91, illetve 28 nap volt. A három relapszus esetében az ezt követő CR időtartama 161 és 1385 nap között volt (medián 1372 nap).

**33. TÁBLÁZAT. Két beteg relapszusai**

Beteg	Line	Kiind. FVIII	Kiind. BU	# CyDRi ciklus	TTBC (nap)	Bypass (nap)	TTCR (nap)	CR időtartam
LA7	1	5	8.5	1	45	45	92	357
LA7	2	11	NA	1	0	0	22	1385
LA7	3	10	0.9	1	0	0	99	1372
LA13	1	1	140	2	8	3	67	160
LA13	2	19	0	1	0	0	28	161

(LA7 és LA13). TTBC: a vérzéskontrollig eltelt idő. TTCR: a CR-ig eltelt idő.

- (6) A CR eléréséhez szükséges CyDRi ciklusok száma: A 32 beteg közül tíz (31,3%) betegnek volt szüksége >1 CyDRi ciklusra a tartós CR eléréséhez, vagy lassú válasz (nyolc beteg), vagy laboratóriumi visszaesés (két beteg) miatt. Négy betegnek három ciklusra volt szüksége, és egy beteg, akinek Bethesda-titere a kezdetekkor kivételesen magas volt (3165 BU), kilenc CyDRi ciklust kapott. A fennmaradó öt beteg két ciklust kapott. A CyDRi ugyanolyan hatásosnak bizonyult a relapszusok kezelésében. A 31 CR-ben lévő beteg közül kettő relabált, míg 29 beteg (93,5%) esetében a CR tartósnak bizonyult. A két visszaeső beteg közül LA13-nak egy laboratóriumi visszaesése volt (amely után a TTCR 28 nap volt), LA7-nek pedig kettő. Az első visszaesés után a TTCR 22 nap volt, a második epizód után pedig 91 nap. A laboratóriumi visszaesések során nem észleltünk vézést, és mindhárom relapszusos epizódban csak egy ciklus CyDRi volt szükséges a CR újbóli eléréséhez. 3B3 betegnél rendkívül magas (>3000 BU) Bethesda-titerű anti-FVIII antitest jelentkezett egy csípőprotézis-műtét után (**30. és 32. táblázat**). CyDRi-t kezdtünk, és a következő 14 hónap alatt adott nyolc CyDRi ciklus mindegyikével fokozatosan csökkentek a titerek, de jelentős reziduális (1-4 BU) gátlótest maradt fenn, <1% FVIII szinttel. Ekkor a COVID-19 járvány miatt a páciens nem tudott kontroll vizsgálatra jönni, és 16 hónapig nem kapott semmilyen kezelést. Miután visszatért a klinikára, <1 BU inhibitor titer találtunk nála, és FVIII szintje ekkor emelkedett első alkalommal mérhető szintre (23 IU/dl). Ekkor a beteg megkapta a kilencedik CyDRi ciklust, és négy héten belül CR-be került (FVIII 64 NE/dl). A CyDRi nem okozott nála jelentős toxicitást.

**A kezelés toxicitása**

A mellékhatások nem voltak súlyosak, és feltétlenül kevesebbnek tűntek a gyakran alkalmazott hosszan tartó szteroidterápiához képest: egy beteg három héttel a kórházból való elbocsátás után tüdőgyulladást kapott, egy másik idős, törékeny beteg, akinek a combnyaktörése inoperábilis volt, pedig hiposztitikus tüdőgyulladásban halt meg. Egy betegnél Clostridium difficile colitis alakult ki a kórházi kezelés alatt, egy másik betegnél pedig Klebsiella cisztitisz

lépett fel (**30. táblázat**). Valamennyi fertőzés gyógyult antibiotikumokra. Az egyetlen súlyos fertőző szövődmény egy retroperitoneális tályog volt egy korábbi hematóma helyén, néhány héttel a vérzés megszűnése és a CR elérése után. Ez a szövődmény műtétet igényelt, amely sikeresnek bizonyult. Megjegyzendő, hogy a cyclofoszfamid csak rövid, enyhe citopéniával járt, és nem okozott szövődményeket. Lázás neutropénia egyik betegnél sem fordult elő. Egy idős beteg kapott granulocita kolónia-stimuláló faktort a neutropénia lerövidítésére. Sem szteroid-diabetes, sem pszichiátriai szövődmény nem fordult elő.

### Megbeszélés

Az AHA betegek két intézményben végzett CyDRi IST kezelésének retrospektív elemzése formálisan is alátámasztotta azt a tapasztalatot, hogy ez a kezelés hatékonyabb, és jobban tolerálható a korábban publikált szekvenciális kezelési sémákhoz képest. A különböző körülmények között született kohorszok összehasonlítása eleve nehéz. A mi kohorszunk összehasonlítását a nemzetközi EACH2,<sup>2,3,311</sup> a német GTH-AH 01/2010,<sup>7,8</sup> vagy a nagy-britanniai<sup>10</sup> adatokkal, továbbá két újabb, nemrégiben közzétett regiszter (a spanyol AHASR<sup>12</sup> és a kínai CARE [China Acquired Hemophilia Registry]<sup>13</sup>) adataival tovább nehezíti az a tény, hogy ezekben a tanulmányokban az adatgyűjtés nagymértékben eltérő volt. Az Egyesült Királyságban végzett vizsgálat egy kérdőíves felmérés, amelyet az összes brit hemofília központnak küldtek ki, az EACH2 egy önkéntes adatbevitellel működő nemzetközi regiszter, a spanyol és a kínai vizsgálat országosan szervezett regiszterekből nyert adatokat közölt, a német cikk pedig egy prospektív megfigyeléses vizsgálat, amely egységes kezelési protokollt

### 34. TÁBLÁZAT. A CyDRi kohorsz fő jellemzőinek összehasonlítása a szakirodalomban közzétett 5 kohorsz jellemzőivel

Jellemző	CyDRi	EACH2 <sup>2,3</sup>	Német <sup>7,8</sup>	Brit <sup>5,10</sup>	Spanyol <sup>12</sup>	Kínai <sup>5,13</sup>
Betegszám (n)	32	501	102	172	151	187
Kor, medián, év	77	73,9	74	78	74	52
>80	28,1	19,1(non-peripartum)	NA	NA	28,6	5,5 (non-peripartum)
>85	12,5	7,9 (non-peripartum)	NA	22,5 (non-peripartum)	NA	1,8 (non-peripartum)
% Nő	56,3	50,7   51,8	43	57,4	43,7	54,5
FVIII, medián	1,0	2	1,4	5   2	1,7	1,7
Inhib. medián	17	12,8	19	8   18	13	13
magas >20	14/32 (43,8%)	NA	40/102 (39,2%)	NA	NA	NA
>100	10/32 (31,3%)	62/501 (12,4%)	14/102 (13,7%)	16/172 (9,3%)	15/145 (10,3%)	18/187 (9,6%)
>1000	1/32 (3,1%)	0/501 (0%)	1/102 (1%)	0/172 (0%)	4/145 (2,8%)	1/187 (0,5%)
Idiopathiás	59,4	61   68	67	63,3	44,1	54,4
Autoimmun	25	16   17	20	16,7	31,7	12,5
Tumoros	21,9	11   10	13	14,7	10,3	6
Terhesség	0	12   2	5	2	6,2	12,5
Medián köv.	779,5	262	262	NA (kérdőív; 2 éves periódus)	360	205

**34. TÁBLÁZAT folytatás.**

Jellemző	CyDRi	EACH2 <sup>2,3</sup>		Német <sup>7,8</sup>	Brit <sup>4,10</sup>		Spanyol <sup>12</sup>				Kínai <sup>5,13</sup>			
Kezelés	CyDRi	P	P+Cy	P ± Cy ± R	P majd Cy	P+Cy	P	P+Cy	P+CNI	R±	P	P+Cy	R+	egyéb
Él, CR* (%)	29/32 (90,6)	90/142 (63,4)	43/83 (62,3)	49/102 (48)	78/172 (45,3)		100/151 (66,2)				115/155 (74,2)			
TTCR medián, nap	77	108	74	79	49	39	30	53	45	42	69	62	47	74
Él, CR nélkül*	0/32 (0)	5/142 (3,5)	1/83 (1,5)	19/102 (18,6)	8/172 (4,7)		15/151 (9,9)				29/155 (18,7)			
Elveszett (%)	0/32 (0)	7/142 (4,9)	14/83 (16,9)	0 (0)	16/172 (9,3)		0 (0)				22 (11,7)			
Relapszus (%)	2/31 (6,5)	15/83 (18,1)	8/66 (12,1)	15/62 (24,2)	18/90 (20)		8/112 (7,1)				13/155 (8,4)			
Teljes mortalitás (%)	3/32 (9,4)	40/142 (28,2)	25/83 (30,1)	34/102 (33,3)	55/127 (43,3)	18/48 (37,5)	36/151 (23,8)				11/165 (6,7)			
Vérzés miatti mortalitás (%)	0/32 (0)	1/142 (0,7)	0/83 (0)	3/102 (2,9)	13/175 (7,4)		5/151 (3,3)				6/165 (3,6)			
Kezelés miatti mortalitás (%)	1/32 (3,1)	5/142 (3,5)	4/83 (4,8)	16/102 (15,7)	12/175 (6,9)		15/151 (9,9)				2/165 (1,2)			
Alapbetegség miatti mort (%)	1/32 (3,1)	6/142 (4,2)	4/83 (4,8)	3/102 (2,9)	NA		16/151 (10,6)				2/165 (1,2)			
Toxicitás (AE, %)	5/32 (15,6)	36/142 (25)	34/83 (41)	67/102 (66)	57/112 (51)		NA				11/155 (7,1)			
Fertőzés (%)	5/32 (15,6)	23/142 (16)	22/83 (27)	37/102 (36)	37/112 (33)		NA				4/155 (2,6)			
Tünetes neutropenia	0/32 (0)	2/142 (1)	12/83 (14)	1/102 (1)	13/112 (12)		NA				1/155 (0,6)			
Diabetes mell.	0/32 (0)	11/142 (8)	5/83 (6)	12/102 (12)	9/112 (8)		NA				NA			
Pszichiátriai	0/32 (0)	6/142 (4)	3/83 (4)	3/102 (3)	2/112 (2)		NA				NA			
TE/Cardio	0/32 (0)	10/501 (2)		8/102 (7,8)	0/112 (0)		NA				3/155 (1,9)			
AE nélkül	27/32 (84)	106/142 (75)	49/83 (59)	35/102 (34)	55/112 (49)		NA				144/155 (92,9)			

Az adatokat a jelzett cikkekből nyertük. FVIII NE/dl egységben megadva. NA: az adat nem elérhető.

\*A CR-t, illetve a CR nélküli túlélést a követési idő végén néztük. A CR definíciója: FVIII: >50 IU/dL úgy, hogy az IST már el van hagyva. Vérzés nincs. P: prednisolon, Cy: orális cyclofoszfamid, R: rituximab. CNI: calcineurin inhibitor. TE tromboembóliás; AE szövődmény (*adverse event*)

alkalmaz. Saját adataink két intézményben 32 egymást követő beteg adatainak retrospektív elemzése, akik valamennyien a CyDRi IST kezelési sémát kapták. Ennek ellenére megpróbáltunk ezekből a cikkekből összehasonlítható adatokat nyerni (34. táblázat).

Először összehasonlítottuk a kohorszok jellemzőit, hogy megbizonyosodjunk róla, hogy az előnyös kimenetel nem alacsonyabb kockázatú betegpopuláció kiválasztásából adódik. A betegek medián életkora, nemi megoszlása és társbetegségei a mi kohorszunkban hasonló az öt irodalmi kohorszban közöltekhez. Az Egyesült Királyság idősebb betegpopulációja valószínűleg a magyarországi és az egyesült királyságbeli általános népesség korfáinak különbségét tükrözi. A magas (>20 BU) vagy nagyon magas (>100 BU) titerű gátlótesttel diagnosztizált betegek aránya a mi kohorszunkban valószínűleg magasabb a többi kohorshoz

képezt, ami alátámasztja, hogy a jobb kimenetelért nem az alacsonyabb kockázatú betegek beválasztása felelős. Kohorszunkban az utánkövetés hosszabb, ami lehetővé tette az esetleges késői szövődmények vagy relapszusok észlelését is.

A kezelés hatékonyságát a CR arány tükrözi, amely a mi kohorszunkban a publikált adatokhoz képest jelentősen magasabbnak tűnik: A 32 beteg közül 31 (96,9%) tartós CR-t ért el, és az utolsó követéskor a 32 beteg közül 29 (90,6%) élt, mindannyian CR-ben, szemben a publikált kohorszok 45-75%-ával (**34. táblázat**). A CyDRi több szempontból is újszerű megközelítése az IST-nek, amelyek elméletileg külön-külön vagy együttesen vezethettek a megfigyelt kedvezőbb kimenetelhez: (1) a kezelés szteroid komponenseként dexamethasont használtunk; (2) első vonalban három gyógyszert kombináltan adtunk; és (3) mindhárom gyógyszert lökésszerűen adagoltuk. Ezenkívül a CyDRi IST változatlan kezelési sémát alkalmaz rezisztens vagy visszaesett betegek esetén is. A mi kohorszunkban a medián TTCR 77 nap volt, ami hasonlóan vagy rövidebbnek tűnik, mint a mások által közöltek. A CR eléréséhez szükséges időt főként az befolyásolja, hogy milyen magas a kiindulási inhibitor titer (vagyis magasabb antitest-koncentráció eliminálásához hosszabb idő szükséges, **42. B ábra**). A CyDRi utáni relapszus ráta 6,3%-nak adódott, ami hasonló vagy alacsonyabb, mint amit más vizsgálatokban közöltek (7-24%) (**34. táblázat**). A CR időtartamát a mortalitás és a relapszusok befolyásolják. Váratlan összefüggést találtunk a CR időtartama és a komorbiditási index között: a magasabb komorbiditású betegeknél nagyobb volt a relapszusra való hajlam. Bár ez a különbség statisztikailag szignifikáns, a korrelációval kapcsolatosan szkeptikusak vagyunk, tekintettel a relapszusok alacsony számára (csak két beteg esett vissza).

Az AHA kezelésének kulcskérdése a vérzéskontroll, amely az immunszuppresszió és a hemosztatikus terápia együttes eredménye. Tapasztalatainknak a közölt adatokkal való összehasonlítását nehezíti, hogy a vérzéses események részletes időzítését csak a GTH-AH vizsgálatban adták meg, és a közölt paraméterek definíciói közötti különbségek lehetetlenné teszik a közvetlen összehasonlítást. Mindenesetre a vérzés a CyDRi megkezdése után a legtöbb betegnél gyorsan megállt. A vérzéskontroll medián ideje 15,5 nap volt, és bár volt néhány lassan reagáló beteg, a vérzések többsége (32-ből 28) két hónapon belül tartósan megszűnt (**41. ábra**). Ezenkívül a vérzéssel kapcsolatos halálozás a mi kohorszunkban 0% volt, míg az összes összehasonlított tanulmány beszámol halálos kimenetelű vérzéses eseményről (**34. táblázat**). Végül, összhangban az összes korábbi kutatóval, azt találtuk, hogy a vérzés fő kockázati

tényezője az FVIII <50 NE/dl, ám e szint alatt a vérzés kockázata jelentős, függetlenül a tényleges FVIII értéktől, az életkortól, az ECOG státusztól vagy a komorbiditási indextől.

Az AHA kezelésének másik kulcskérdése a kezelés toxicitása, mivel valamennyi kutatócsoport magasabb morbiditásról és mortalitásról számol be az IST-vel kapcsolatban, mint amit maga a vérzés okoz (természetesen bypass szerek alkalmazását feltételezve). Így a CyDRi előnyös toxicitási profilja a megfigyelt jobb kimenetel egyik fő meghatározója (**34. táblázat**), és ez végső soron eredményezheti az immunszuppressziót a toxicitásától való félelemben óvatosan ajánló szakmai irányelvek<sup>103,104</sup> elmozdulását az oki kezelést bátrabban javasló irányba.

A teljes túlélés (OS) olyan kemény végpont, amely a kezelés hatékonyságát és toxicitását egyaránt tükrözi. Bár AHA-ban a túlélést nagymértékben befolyásolja a betegek életkora és társbetegségei, a medián életkor és a >85 éves betegek aránya hasonló a többi publikált AHA populációhoz (**34. táblázat**), vagy általános populációs különbségeket tükröz, amint fentebb rámutattunk. A komorbiditást is nehéz összehasonlítani, de az irodalomban szereplőkhöz hasonlóknak tűnik. Az aktív rosszindulatú daganatos betegségben szenvedő betegek aránya nem szerepel az irodalomban, ezért az összehasonlítás lehetetlen. Aktív daganatos beteg nem volt a jelen kohorszunkban (valamennyi beteg, akinek anamnézisében malignitás szerepelt, CR-ben volt, és nem kapott anti-neoplasztikus kezelést a megfigyelés alatt). Mindezt egybevetve úgy tűnik, hogy az eltérő kimenetel fő oka a kezelési sémák közötti különbség.

A jelen tanulmánynak természetesen számos korlátja van. *Először* is ez egy retrospektív vizsgálat volt. A retrospektív adatelemzés hiányosságait azonban ellensúlyozza az a tény, hogy a betegeket egy egységes intézményi protokoll szerint kezeltük, amelyet 2009 szeptemberében prospektíven hoztunk létre és alkalmaztunk. Ezenkívül a vizsgálati időszak alatt az összes AHA diagnózissal felvett beteget bevettük a vizsgálatba, ami csökkenti a beválogatási hiba lehetőségét. *Másodszor*, a vizsgálatunkban szereplő betegek száma (n=32) alacsonyabb, mint az országos vagy nemzetközi tanulmányoké. Ez szükségszerűen adódik az AHA ritka előfordulásából. Úgy érezzük azonban, hogy a kohorszunkban egységesen észlelt kezelési hatékonyság mégis érvényes összehasonlítást tesz lehetővé. Emellett vizsgálatunk reprezentatívnak is tűnik Magyarországon. Ha figyelembe vesszük, hogy Magyarország 10 milliós ország, és az AHA valószínűsíthető előfordulása Európában 1,48/egymillió,<sup>10</sup> akkor a vizsgálati időszak alatt (12 év) 177-178 új AHA esetre lehetett számítani, amelyből a mi kohorszunk 32 beteget (18%) rögzít. Összehasonlításképpen, az EACH2 regiszterben<sup>2</sup>, az AHA-s betegek legnagyobb regiszterében az egyes országok medián beválasztási aránya 12,1%

volt. Kohorszunkban fennáll az intézményi betegfelvételi rendszer miatti potenciális torzítás (ún. *referral bias*) lehetősége is. Azonban mindkét intézmény vezető akadémiai intézménynek számít, és az ilyen torzítás valószínűleg inkább a súlyosabb esetek irányába tolná a spektrumot. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy néhány beteget más egyetemi intézményekből utaltak át kezelésre. Végezetül a *kimenetel definíciói* tanulmányról tanulmányra változnak, ami megnehezíti az összehasonlítást. Bizonyos kutatók például azzal küszködtek, hogy hogyan lehet a legjobban számszerűsíteni és mérni az AHA lokalizáció-specifikus vérzéses szövődményeit, és hogyan lehet mérni a vérzéscsillapító kezelés hatékonyságát.<sup>312</sup> Itt egy más, klinikailag inkább relevánsnak ítélt megközelítést alkalmaztunk: a vérzéskontrollig eltelt időt. Bár ez a paraméter fontos klinikai jellemzőt ragad meg, van egy szubjektív eleme (az a döntés, hogy mikor hagyják abba a haemosztatikus terápiát). Bár úgy véljük, hogy vizsgálatunkban a hemosztatikus terápia alkalmazásának gyakorlata következetesen restriktív volt, el kell ismernünk, hogy a gyakorlat jelentősen eltérhet az egyes országok között, amelyekben az erőforrások és a költségtérítési feltételek igen eltérőek.

A jelenlegi vizsgálatban részt vevő betegek viszonylag kis száma nem teszi lehetővé a kimenetelt befolyásoló rizikófaktorok független értékelését. Az életkor és a társbetegségek (leszámítva a terhességet) más populációkban következetesen összefüggésbe hozhatóak a kedvezőtlen kimenetellel. A szakirodalomban kialakuló képnek megfelelően az egyetlen betegünk, aki a teljes válasz elérése előtt meghalt, kohorszunk második legidősebb betege volt (84 éves), és a követési időszak alatt elhunyt másik két betegnek súlyos társbetegségei voltak. A jól ismert autoimmun betegségek mellett kohorszunkban két olyan esetet észleltünk, amelyek bullosus pemphigoidhoz (BP, **30. táblázat**) társultak. Az irodalomban ez a társulás kevésbé ismert.<sup>313</sup>

Eredményeinket összefoglalva azt mondhatjuk, hogy a CyDRi néven ismert kombinált kezelés igen hatékonynak bizonyult a vizsgált idős AHA betegpopulációban, figyelemreméltóan alacsony toxicitással és gyors vérzéskontrollal, valamint jó általános túléléssel. Hogy a kezelés valamennyi összetevője szükséges-e a kiváló eredményhez, azt csak egy jól megtervezett prospektív klinikai vizsgálatban lehetne megválaszolni. Mindazonáltal a CyDRi-t a jelenleg elérhető adatok alapján is vonzó lehetőségnek kell tekinteni az AHA-ban szenvedő idős betegek immunszuppresszív kezelésére.

#### *Megjegyzés*

Bár adataik nem álltak rendelkezésre részletes elemzéshez, további öt AHA-s beteget kezeltünk

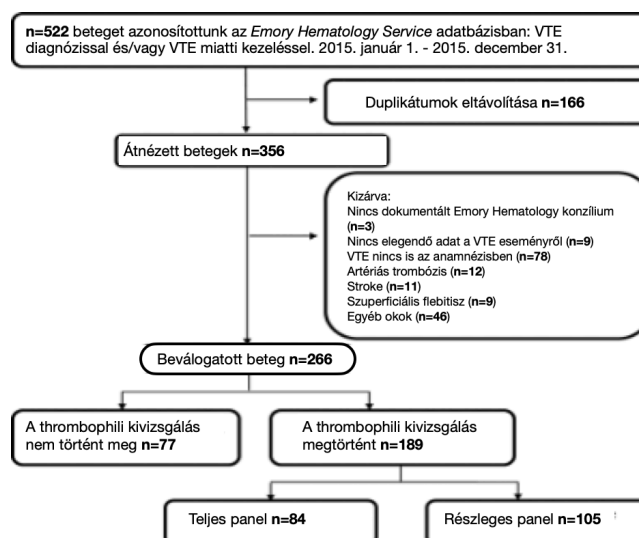


a CyDRi kezelési protokollal az Emory Egyetemen 2015 és 2017 között. Mind az öt beteg komplett remisszióba került, jelentősebb toxicitás nélkül.

## A trombofilia kivizsgálás klinikai haszna vénás tromboembóliában szenvedő betegekben<sup>314</sup>

A trombózisok egy részénél ki lehet mutatni valamely, a bevezetőben részletezett veleszületett vagy esetleg szerzett tényezőt, amely a VTE kockázatot ismertén növeli. Amióta ezen tényezők vizsgálata széles körben elérhetővé vált, e vizsgálatok igen népszerűvé váltak a klinikusok körében. Ennek ellenére igen ellentmondásos, illetve kérdéses, hogy a trombofilia vizsgálati eredmények valóban segítik-e a betegek kezelésében fontos klinikai döntések meghozatalát. Ilyen körülmények között a trombofilia vizsgálatok klinikai gyakorlatban való alkalmazására vonatkozó konkrét szakmai irányelvek hiánya jelentős eltérésekhez vezetett a tekintetben, hogy a gyakorló klinikusok milyen vizsgálatokat rendelnek el, mikor rendelik el, és hogyan értelmezik azokat. Bár az eredmények kérdéses vagy akár nem létező mértékben járulnak hozzá a betegek szakszerű kezeléséhez, a tesztek jelentősen növelik a vénás tromboembóliás betegségek kezelésének költségeit.<sup>315</sup> Ezt a tanulmányt azért végeztük, hogy egy nagy amerikai akadémiai tercier ellátó központban (Emory Egyetem, Atlanta) megismerjük a trombofilia vizsgálatok rendelésének, értékelésének mindennapi gyakorlatát, valamint a vizsgálati eredmények hatását a klinikai kezelési döntésekre. Vizsgáltuk továbbá e vizsgálatok közvetlen költségeit.

**A vizsgálatba beválasztott betegek:** A hematológiai szolgálat 2015. évi adatbázisában 522 olyan beteget találtunk, akiknél a végső diagnózis VTE vagy hiperkoagulábilis állapot volt. A duplikátumok és a beválasztási kritériumoknak nem megfelelő betegek kizárása után 266 vizsgálatra alkalmas beteget azonosítottunk (44. ábra).



44. ÁBRA. A betegbeválasztás folyamatábrája.

A betegek jellemzőit a **35. táblázat** mutatja. A 266 bevont beteg közül 189-nél (71,1%) történt trombofilia vizsgálat.

Jellemző	n=189 beteg, akiknél történt trombofilia vizsgálat	n=77 beteg, akiknél nem történt trombofilia vizsgálat	p érték
Életkor az index VTE idejében, medián (tartomány)	52 (19-88)	61 (20-85)	< <b>0,001</b>
Életkor az első VTE idejében, medián (tartomány)	50 (14-87)	59 (20-85)	< <b>0,001</b>
Férfi	86 (45,5)	43 (55,8)	0,126
BMI medián (tartomány)	29,7 (14,2-58,7)	28,7 (13,5-55,0)	0,213
Fehér	92 (48,7)	43 (55,8)	0,437
Afrikai	77 (40,7)	29 (37,7)	
Egyéb <sup>a</sup>	20 (10,6)	5 (6,5)	
Provokált VTE <sup>b</sup>	70 (37,0)	61 (79,2)	< <b>0,001</b>
Műtét, peri-OP	18 (9,5)	24 (31,2)	< <b>0,001</b>
Nem műtéti kórház; immobilizáció <sup>c</sup>	23 (12,2)	9 (11,7)	0,913
Ösztrogén expozíció	15 (7,9)	6 (7,8)	0,384
Terhesség, peripartum	6 (3,2)	1 (1,3)	0,254
Tartós vénás kanül <sup>d</sup>	14 (7,4)	14 (18,2)	<b>0,009</b>
Korábbi VTE esemény	62 (32,8)	21 (27,3)	0,377
Vetelés az anamnézisben	17 (9,0)	0 (0,0)	<b>0,003</b>
Nagy rizikóval járó alapbetegségek			
Aktív malignitás	11 (5,8)	32 (41,6)	< <b>0,001</b>
Krónikus gyulladáshoz vezető betegségek <sup>e</sup>	13 (6,9)	2 (2,6)	0,170
Nefrózis	3 (1,6)	0 (0,0)	0,266
Kongesztív szívelégtelenség	8 (4,2)	7 (9,1)	0,119
TIA vagy stroke	11 (5,8)	1 (1,3)	0,107
Családi anamnézisben trombofilia, VTE, fiatalkori stroke vagy MI	47 (24,9)	8 (10,4)	<b>0,008</b>
Index VTE lokalizáció: nem splanchnikus			
Csak alsó végtag	52 (27,5)	29 (37,7)	
Csak felső végtag	8 (4,2)	13 (16,9)	
Csak tüdőembólia	55 (29,1)	15 (19,5)	
> 1 vérrög	51 (27,0)	15 (19,5)	
Index VTE lokalizáció: splanchnikus trombózis	32 (16,9)	7 (9,1)	0,101 <sup>f</sup>

**35. TÁBLÁZAT. A VTE-ben szenvedő betegek jellemzése.** Rövidítések: DVT: mélyvénás trombózis; MI: szívinfarktus; TIA: átmeneti iszkémiás roham; VTE: vénás tromboembólia.

*Megjegyzés:* A kategorikus változókat n (%) formában adtuk meg. A vastag betűvel szedett értékek szignifikáns  $p < 0,05$  értéket tükröznek.

<sup>a</sup>Az egyéb rasszok közé tartoznak az ázsiaiak, a spanyolok és a nem elérhető/nem feltüntetett rasszok.

<sup>b</sup>Az átmeneti provokáló tényezők nem tartalmazzák az aktív rosszindulatú daganatos betegségeket, a krónikus gyulladáshoz vezető állapotokat vagy krónikus fertőzéseket.

<sup>c</sup>Ezek közé tartozónak tüntettük fel a legalább 3 napig tartó immobilizációhoz vezető töresek is.

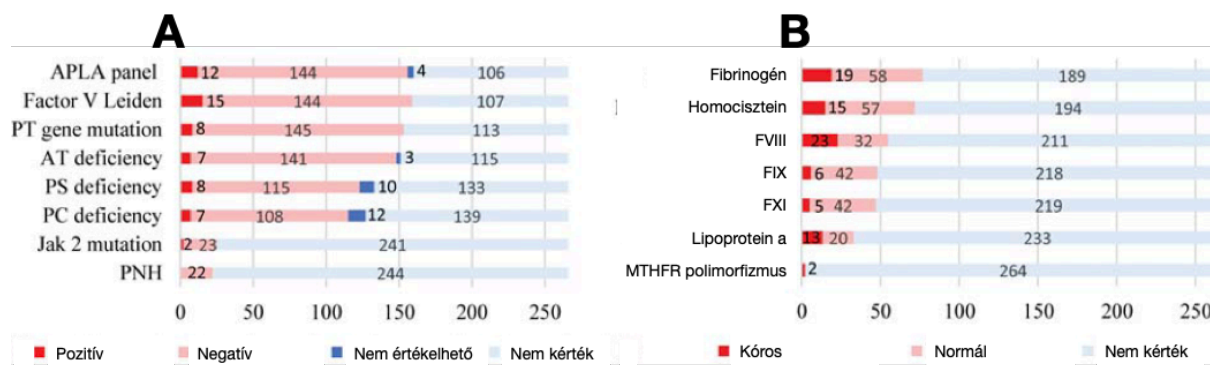
<sup>d</sup>A katéterrel kapcsolatos VTE esetek között a centrális véna kanülön kívül a bal kamrai asszisztáló eszközzel, pacemakerrel vagy beültethető kardioverter-defibrillátorral kapcsolatos VTE is fel van tüntetve.

<sup>e</sup>Krónikus gyulladáshoz vezető betegségek: gyulladáshoz vezető bélbetegség, szisztémás lupus erythematosus és vasculitisek.

<sup>f</sup>p érték a zsigeri (splanchnikus) versus nem zsigeri vérrögök elhelyezkedésére vonatkozik.

A trombofilia irányában vizsgált betegek csoportjában nagyobb valószínűséggel volt 40 évnél fiatalabb (30,9% vs. 18,2%), és nagyobb valószínűséggel volt korábbi vetelés (9,0% vs. 0%), vagy a családban ismert VTE/trombofilia/korai stroke/MI (24,9% vs. 10,4%). A vizsgált kohorszban kisebb volt a provokált VTE előfordulásának valószínűsége (37% vs. 79,2%), illetve a megelőző műtéthez (9,5% vs. 31,2%), tartós vénás kanülhöz (7,4% vs. 18,2%) vagy aktív rosszindulatú daganatos betegséghez (5,8% vs. 41,6%) kapcsolódó VTE. Nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a vizsgált és a nem vizsgált csoportok között a nem, faji hovatartozás, terhesség, hormonális kezelés, a trombózis lokalizációja (zsigeri vs. nem zsigeri), illetve a korábbi VTE előfordulása tekintetében. Összességében a provokált VTE-ben szenvedő betegek 53%-ánál végeztek trombofilia vizsgálatot.

A trombofília kivizsgálás gyakorlatának mintázatát, beleértve az eredmények részleteit is, a **45. ábra** mutatja be. A leggyakrabban vizsgált trombofília az anti-foszfolipid (APLA) panel volt



**45. ÁBRA. A trombofília vizsgálat eredményei** a vizsgálatba bevont 266 betegnél. **(A)** A VTE patogenezisében jelenleg széles körben elfogadottan szerepet játszó trombofiliák. Az értelmezhetetlen APLA vizsgálat olyan kóros APLA paneleket jelez, amelyeket nem ismételték meg. Az értelmezhetetlen AT-, PS- és PC-tesztek közé tartoznak azok a tesztek, amelyeket olyan körülmények között végeztek, amelyek mellett az eredmények pontos értelmezése nem lehetséges, mint például akut trombózis vagy egyidejű antikoaguláns kezelés. APLA: antifoszfolipid antitest; AT: antitrombin; MTHFR: metilén-tetrahidrofolát redukáz; PC, PS: protein C és S; PNH: paroxysmalis éjszakai hemoglobinuria; PT: protrombin. **(B)** Egyéb, kevésbé elfogadott trombofiliák.

160 (60,1%) betegnél, amelyet szorosan követett a Leiden mutáció (FVL) 159 (59,7%) és a protrombin gén mutáció (FIIM) 153 (57,5%) betegnél. A 189 vizsgált beteg közül 84 (44,4%) teljesítette a teljes körű trombofília vizsgálat kritériumát (definíciót lásd a Módszerek

**36. TÁBLÁZAT. A trombofília tesztek ismétlései**

Első teszt	n	Történt ismétlés?			Az ismétlések száma			
		Igen	Nem	p	2. teszt	Pozitív eredmény	3. teszt	Pozitív eredmény
		n (%)	n (%)		n	n (%)	n	n (%)
FVL	159	17 (10,7)	142 (89,3)		14	2/14 (14,3)	3	0/3 (0,0)
Pozitív	15	2 (13,3)	13 (86,7)	0,728	2		0	
Negatív	144	15 (10,4)	129 (89,6)		12		3	
FIIM	153	18 (11,8)	135 (88,2)		12	1/12 (8,3)	6	0/6 (0,0)
Pozitív	8	1 (12,5)	7 (87,5)	0,947	1		0	
Negatív	145	17 (11,7)	128 (88,3)		11		6	
AT	151	24 (15,9)	127 (84,1)		18	2/18 (11,1)	6	0/6 (0,0)
Kóros <sup>a</sup> vagy nem értékelhető	20	10 (50,0)	10 (50,0)	< 0,001	10		0	
Normál	131	14 (10,7)	117 (89,3)		8		6	
PC	127	20 (15,7)	107 (84,3)		15	1/15 (6,7)	5	2/5 (40,0)
Kóros <sup>b</sup> vagy nem értékelhető	38	15 (39,5)	23 (60,5)	< 0,001	11		4	
Normál	89	5 (5,6)	84 (94,4)		4		1	
PS	133	11 (8,3)	122 (91,7)		7	1/7 (14,3)	4	1/4 (25,0)
Kóros <sup>c</sup> vagy nem értékelhető	25	6 (24)	19 (76,0)	0,002	3		3	
Normál	108	5 (4,6)	103 (95,4)		4		1	
JAK2	25	0	25 (100,0)		0	N/A	0	N/A
Pozitív	2	0	2 (100,0)	N/A	0		0	
Negatív	23	0	23 (100,0)		0		0	
PNH	22	0	22 (100,0)		0	N/A	0	N/A
Pozitív	0	0	0	N/A	0		0	
Negatív	22	0	22 (100,0)		0		0	

Rövidítések: FVL: FV Leiden mutációja; FIIM: a prothrombin gén (FII) G20210A mutációja; AT: antitrombin; PC: protein C; PS: protein S; PNH: paroxysmalis nocturnal hemoglobinuria; N/A: nem alkalmazható;

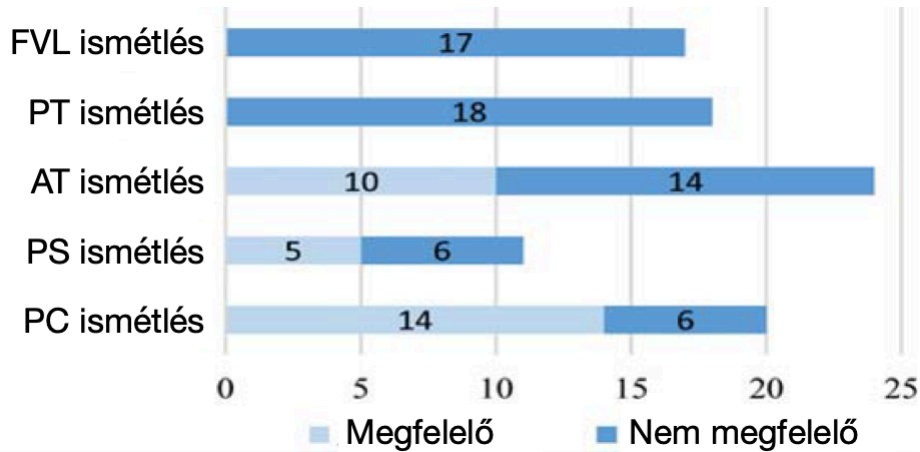
Megjegyzések: Az AT/PS/PC antigén és aktivitási szinteket „kórosnak” tekintettük, ha azok a referencia laboratóriumi tartomány alacsony normál értéke alatt voltak. Vastag betűvel a szignifikáns p < 0,05 értéket jelöltük.

<sup>a</sup>Az AT antigénszint normál tartománya 214-318 mg/l, az AT-aktivitás szintjének normál tartománya 83-128% volt.

<sup>b</sup>A PC antigénszint normál tartománya 70-140 mg/l, a PC aktivitási szint normál tartománya pedig 90-183% volt.

<sup>c</sup>A PS antigénszint normál tartománya 70-155 mg/l, a PS aktivitási szint normál tartománya pedig 64-149% volt.

leírásánál). A kóros funkcionális tesztekkel rendelkező betegek közül kilencet (a vizsgált betegek 4,8%-a) az akut trombozisz időszakában vizsgálták, 13-at (6,9%) pedig terápiás antikoaguláció mellett, ami értelmezhetetlenné tette eredményeiket. Négy pozitív APLA panellel rendelkező betegnél nem végeztek ismételt vizsgálatot a perzisztens antitest jelenlét



**46. ÁBRA. Megfelelő és hibás indikáció a trombofilia tesztek ismétlésénél.** FVL: Leiden mutáció; PT: protrombin gén mutáció; AT: antitrombin, PC, PS: protein C és S.

kimutatására. Ötvenegy (26,9%) betegnél lett a vizsgált trombofiliák közül egy vagy több teszt pozitív. A **36. táblázat** a „teljes körű trombofilia” panelben szereplő vizsgálatok ismétléseinek mintázatát mutatja be. A 159 FVL-re vizsgált és a 153 PT G20210 mutációra vizsgált beteg közül 17 (10,7%), illetve 18 betegnél (11,8%) ismételték meg a genetikai vizsgálatot. Kilenc beteget harmadszor is megvizsgáltak. Genetikai tesztekéről lévén szó, ezek az ismétlések nyilvánvalóan indokolatlanok. Így nem meglepő, hogy nem volt szignifikáns összefüggés az első genetikai vizsgálat eredménye és a vizsgálat megismétlésére vonatkozó döntés között. Ez is azt támasztja alá, hogy itt leginkább információáramlási vagy szervezési problémáról lehetett szó, vagyis az elrendelő orvos valószínűleg nem volt tudatában a korábbi vizsgálatnak. Másrészt az AT/PC/PS teszt megismétlésére gyakrabban került sor kóros (hiányos/értelmezhetlen), mint normális kezdeti teszteredményre válaszul. A 83 beteg közül, akiknél kóros AT/PC/PS tesztet találtak, 31 (37,3%) esetben ismételték meg a vizsgálatot megerősítés céljából. Hét betegnél háromszor is elvégezték a vizsgálatot. Az összes elvégzett vizsgálatból végül *22 esetben diagnosztizáltunk örökletes AT/PC/PS-hiányt*. A trombofilia vizsgálatok ismételt elvégzésének az általunk előre meghatározott kritériumok szerinti megfelelőségét a **46. ábra** szemlélteti. Az 55 megismételt AT/PC/PS tesztből 26-ot tekintettünk hibás indikációjúnak, mivel a kezdeti tesztek normálisak voltak, vagy a tesztek a „Módszerek” szakaszban leírt kritériumok szerint „rossz időzítéssel” ismételték meg.

A trombofilia vizsgálat befolyásolta a betegek kezelését a 189 vizsgált beteg közül 32-nél (16,9%) (**37. táblázat**). Ez a befolyás az antikoaguláns szer kiválasztását érintette hat esetben, az antikoaguláció időtartamát 25 esetben, és mind a gyógyszerválasztást, mind a kezelés időtartamát egy betegnél (a részleteket lásd az **37. táblázat** lábjegyzetében). A klinikai kezelést módosították vizsgálatunkban a 12 pozitív APLA-t mutató beteg közül hétnél; a warfarint négy betegnél választották a DOAC-ok helyett, és az antikoagulációt a másik három betegnél határozatlan időre hosszabbították meg. 19 betegnél érezték úgy az orvosok, hogy biztonságos megkísérelni az antikoaguláns kezelés legalábbis átmeneti felfüggesztését, mivel e betegek trombofilia kivizsgálása negatív volt, vagy pusztán alacsony kockázatú trombofiliát (pl. heterozigóta FVL) találtak. A felfüggesztési kísérlet kimenetelét az antikoaguláció elhagyása

### 37. TÁBLÁZAT. A trombofilia kivizsgálás kihatása a betegek kezelésére

Változott-e a kezelési terv? n (%)		Hogyan változott a kezelési terv?		
		AC szer n (%)	AC tartam n (%)	mindkettő
Igen	32/189 <sup>a</sup> (16,9)	6/32 <sup>b</sup> (18,8)	25/32 <sup>c</sup> (78,1)	1/32 <sup>d</sup> (3,1)
Nem	157/189 (83,1)	N/A	N/A	N/A

Rövidítések: AC: antikoaguláció; APLA: antifoszfolipid antitest panel; AT: antitrombin; FVL: V Leiden faktor; N/A: nem alkalmazható; PS: protein S.

<sup>a</sup>189 azoknak a betegeknek a száma, akiknél trombofilia vizsgálatot végeztek.

<sup>b</sup>Három negatív antifoszfolipid antitest (APLA) panellel rendelkező betegnél a warfarinról DOAC szerre váltottak. További három betegnél a warfarint pozitív APLA teszt miatt folytatták/kezdték el. Egy heterozigóta FVL-es beteget és 18 trombofilia negatív beteget eseménytelen AC elhagyási kísérlet (alacsony D-dimer) után levettek az antikoagulációról.

<sup>c</sup>Az antikoagulációt három pozitív APLA antitest paneles, egy AT-hiányos, egy PS-hiányos, egy emelkedett VIII-as és IX-es faktoros betegnél meghosszabbították.

<sup>d</sup>Egy háromszorosan pozitív APLA panellel rendelkező betegnél az antikoagulációt warfarinra váltották és hosszú távúra változtatták.

után egy hónappal mért a D-dimer szintek döntötték el. A fennmaradó betegek (83,1%) közül, akiknek a kezelését nem befolyásolta a trombofilia vizsgálat, hat beteg elveszett a nyomonkövetés során, két beteg pedig elutasította a további kezelési változtatásokat. Az emelkedett D-dimer értékek, elégtelen rekanalizáció vagy panaszos posztrombotikus szindróma, illetve permanensnek ítélt rizikótényezők miatt 12 betegnél hosszabbították meg az

### 38. TÁBLÁZAT. A trombofilia kivizsgálás költsége

	Egy betegre eső költség	Egy pozitív betegre eső költség
Teljes kohorsz (n=266)	2,364,32	12,331,55
Trombofilia vizsgálat történt (n=189)	3,308,43	12,260,55
Inkomplett kivizsgálás (n=105)	2,701,69	12,894,43
Komplett kivizsgálás (n=84)	4,066,84	11,779,81

(USD). Megjegyzés: Az egy betegre jutó költség = összköltség/az összes beteg száma. Egy pozitív betegre jutó költség = összköltség/az összes pozitív beteg száma.

antikoagulációs terápiát a negatív trombofilia vizsgálat ellenére.

Számításaink szerint 266 betegből álló kohorszunkban a trombofilia kivizsgálás közvetlen költsége egy betegre 2364,32 USD; egy pozitív eset diagnosztizálása 12 331,55 USD, míg

19 653,41 USD volt egy olyan beteg diagnosztizálása, akinek kezelési stratégiájára az eredmények valóban kihatással voltak. Mindez éves tekintetben összesen 628 909,12 USD közvetlen trombofilia vizsgálati kiadást jelentett. A **38. táblázat** a trombofilia vizsgálat részletes közvetlen költségeit mutatja be mind a teljes kohorszban, mind pedig a trombofilia vizsgálaton átesett betegek alcsoportjában.

### ***Megbeszélés***

Vizsgálatunk egy leíró vizsgálat: bemutattuk a trombofilia kivizsgálás gyakorlatát és az eredmények klinikai felhasználását, valamint az ilyen vizsgálati gyakorlathoz kapcsolódó közvetlen költségeket az Egyesült Államok egyik nagy akadémiai központjában. Jelentős heterogenitást tapasztaltunk a betegek trombofilia vizsgálatra való kiválasztásában, valamint az egyes betegeknél elrendelt vizsgálatok paneljében. *Ismétlem: ez a valós mindennapi élet gyakorlatának bemutatása 2020-ban, és távol álljon tőlünk, hogy ezt a gyakorlatot helyesnek tartsuk. Ellenkezőleg, az itt bemutatott adatok számos, nyilvánvalóan hibás gyakorlatra hívják fel a figyelmet. Meggyőződésem, hogy a valós élet megismerése, bemutatása és az elvekkel való összevetése előre viszi a betegek ellátását.*

Bár a tesztelés közvetlen költségei magasak voltak, az eredmények csak nagyon kevés betegnél befolyásolták a kezelési döntéseket. A szakemberek között továbbra is éles vita tárgyát képezi az a kérdés, hogy kit kell trombofiliára tesztelni. Sajnos nem állnak rendelkezésre olyan klinikai vizsgálatok, amelyek bizonyítékokon alapuló útmutatást adnának a kérdésben. A nemzeti és nemzetközi tudományos társaságok konszenzusos iránymutatásai egyöntetűen ellenzik a VTE-ben szenvedő betegek válogatás nélküli örökletes/szerzett trombofilia irányában történő vizsgálatát.<sup>108,316-318</sup> Ebből a szempontból öröndetes, hogy a vizsgált kohorszban valóban nem került trombofilia kivizsgálásra minden beteg. Viszont a betegek jelentős hányada vett részt trombofilia kivizsgáláson; az orvosok nagyobb valószínűséggel vizsgálták a fiatalabb, a nem-provokált és malignus alapbetegséggel nem magyarázható trombózisban szenvedő betegeket, illetve azokat, akik családi anamnézisében trombózis vagy trombofilia már előfordult. Úgy tűnik, hogy bizonyos tekintetben kohorszunkban a betegek kiválasztása követi az irányelvek által ajánlott „vizsgálati szelektivitást”. A Brit Hematológiai Társaság például olyan betegeknél ajánlja a vizsgálatot, akiknél a VTE korai életkorban (<40 éves korban) jelentkezik, akiknél a VTE ismétlődik, vagy akiknél a családban elsőfokú rokonoknál nem-provokált trombózis fordult elő.<sup>317</sup> Mindazonáltal a mi kohorszunkban jelentős volt azon betegek aránya, akik a fent említett indikációk egyikének sem feleltek meg, mégis trombofilia kivizsgálást rendeltek náluk.

Például vizsgálatunkban a provokált VTE-ben szenvedő betegek 53%-ánál rendeltek trombofilia vizsgálatot, ami az összes vizsgált beteg 37%-ának felel meg.

Az ebben a fejezetben összefoglalt kutatást néhány évvel követve az Amerikai Hematológus Társaság (American Society of Hematology, ASH) hosszas egyeztetést követően tett közzé irányelveket,<sup>318</sup> melyek határozottan leszögezik, hogy sem provokálatlan VTE, sem posztoperatív VTE esetén nincs értelme a trombofilia tesztek elvégzésének. Provokáló helyzet nélkül bekövetkezett VTE esetén ugyanis olyan magas a recidíva veszélye, hogy a huzamos antikoaguláns kezelés (különösen a biztonságosabbnak bizonyult DOAC szerekkel) kisebb kockázatot jelent, ezért ezeket a betegeket akkor is hosszú távon javasolt antikoagulálni, ha a trombofilia vizsgálat negatív, így a vizsgálat nincs befolyással a kezelésre. Erős provokáló helyzet (műtét miatti hospitalizáció) pedig újabb provokáció híján olyan alacsony recidíva veszélyt jelent, hogy három hónapon túl senkit sem javasolt antikoagulálni (még a DOAC szerek veszélye is felülmúlja a recidíva kockázatát), ami akkor is igaz, ha pl. valakinél heterozigóta Leiden mutációt találunk. Terhességhez/szüléshez, vagy egyéb „enyhébb” provokáló tényezőhöz (hormonális fogamzásgátlás, belgyógyászati fekvőbetegség, hosszabb repülőút stb.) társuló VTE esetén viszont elfogadták, hogy a trombofilia teszt járulékos hasznos információt hordozhat. Mindezek a javaslatok vélekedésre és hipotetikus modellezésekre támaszkodnak, mert sajnos a különféle stratégiákat vizsgáló pontos adatokat felfedő vizsgálatok nem állnak rendelkezésre, így a szakemberek közötti vitákat egyelőre nem lehet feloldani.

Jól ismert, hogy a különböző klinikai rizikótényezők igen eltérő mértékben fokozzák a VTE kockázatát. A műtéti beavatkozáshoz kapcsolódó kórházi kezelés például a VTE szignifikánsan magasabb kockázatával jár (esélyarány = 18,95, 95%-os konfidencia intervallum 9,22-38,97), míg pl. az ösztrogénhasználat csak 1,81-szorosára növeli ezt a kockázatot. Ez utóbbit ezért „gyenge” klinikai rizikófaktornak tekintik.<sup>110,319,320</sup> Ez részben magyarázatot adhat kohorszunkban a provokált VTE-vel rendelkező betegek körében hozott vizsgálati döntések egy részére (ugyanis ebben a vizsgálatban nem differenciáltunk a különböző erősségű kockázatok között). Hasonló mintázatról számoltak be Meyer és munkatársai egy 1314 VTE-s betegből álló nagy kohorszban; úgy tűnt, hogy a „gyenge” tromboembóliás rizikófaktorok (pl. terhesség vagy hormonhasználat) jelenléte nem befolyásolta a trombofilia vizsgálatra irányuló döntést, míg az aktív malignitás, a közelmúltbeli kórházi kezelés, a tüdőbetegség vagy a tartós vénás katéter szignifikánsan összefüggött a trombofilia vizsgálat mellőzésével.<sup>321</sup>



Szükségtelen vagy megbízhatatlan trombofília vizsgálatokról számos kutató számolt be, és ez a helytelen beteg- és időzítésválasztás folyamatosan fennálló problematikáját tükrözi.<sup>321-323</sup> Kohorszunkban az összes elrendelt vizsgálat 11,6%-a volt értelmezhetetlen, mert az akut trombozisz vagy az egyidejű antikoaguláció zavarta a vizsgálatot. Más kutatók még nagyobb arányban figyeltek meg megbízhatatlan vizsgálatokat. Az egyik tanulmányban a betegek 35,2%-ánál az index VTE-t követő hét napon belül végeztek vizsgálatot, egy másikban pedig a kóros PC és PS vizsgálati eredmények 63%-át egyidejű antikoagulációs kezelésnek lehetett tulajdonítani.<sup>135,321,322</sup> Ezek a megfigyelések aggasztóak, hiszen arra utalnak, hogy a mindennapi gyakorlatban nem ritkák a pontatlan eredmények, melyeknek nemcsak a betegellátás költségeire van kedvezőtlen hatása, hanem a VTE-s betegek kezelésével kapcsolatos döntéseket is helytelenül befolyásolhatják. *Hozzátehetjük: Magyarországon nem rendelkezünk hasonló gondosan összeszedett adatokkal a trombofília vizsgálatok mindennapi gyakorlatáról, de e sorok szerzőjének széleskörű tapasztalata azt sugallja, hogy nálunk még magasabb a helytelen indikációval elrendelt vizsgálatok száma. Tegyük rögtön azt is hozzá, hogy hazánkban az itt látható költségek egyáltalán nem érvényesek, így adatok nélkül a költségeket nem tudjuk megítélni. Azonban ezek a vizsgálatok nálunk is meglehetősen költségesek.*

A trombofília vizsgálat költséges, és számos tanulmány inkább költségekből fakadó terhet, mint a vizsgálat előnyét jelzi, az általános érvényű irányelvek hiánya és a nem megfelelő vizsgálati gyakorlat gyakorisága miatt.<sup>324-327</sup> Számításaink szerint e 266 betegből álló kohorszban a trombofília vizsgálat közvetlen költsége betegenként 2364,32 USD volt, ami ebben a kohorszban azt jelentette, hogy egy beteg kezelésének módosítását eredményező vizsgálat 19 653,41 USD-ba került. Ráadásul ezek az értékek nem veszik figyelembe a potenciálisan falszpozitív eredményekkel (pl. a megerősítő ismételt vizsgálat elmaradásával) feleslegesen meghosszabbított antikoaguláció költségeit és szövődményeit, sem egy örökletes betegség diagnosztizálásával járó szorongást.<sup>328</sup>

Közhelyszerű megállapítás, hogy az orvosi gondolkodás azt követeli, hogy a trombofília vizsgálat elvégzésére vonatkozó döntésnek a VTE-ben szenvedő betegek esetében azon kell alapulnia, hogy az eredmények befolyásolják-e a beteg kezelését. Kohorszunkban a trombofília vizsgálat a vizsgált betegeknek csak 16,9%-ánál befolyásolta az antikoaguláció időtartamát és/vagy a gyógyszer megválasztását. A jelentős átmeneti rizikófaktorok (pl. sebészeti kórházi kezelés) által kiváltott VTE esetében az irányelvek legfeljebb 3 hónapos terapiás

antikoagulációt javasolnak.<sup>111</sup> Az olyan nem-provokált VTE-s betegeknél, akiknél hosszú távú antikoaguláns kezelés a terv, a trombofilia vizsgálat értéke meglehetősen ellentmondásos. Itt fontos hangsúlyozni, hogy a negatív trombofilia vizsgálat nem csökkenti a VTE kiújulásának kockázatát a nem provokált VTE-ben szenvedő betegeknél.<sup>329</sup> Ezért az antikoaguláció időtartamának eldöntése ezekben az esetekben más releváns tényezők, például a beteg tünetei, a hosszú távú kezeléshez való hozzáállása, a D-dimer szint, esetleg a rekanalizáció mértéke, és – lényeges megfontolásként – a vérzésveszély értékelése alapján kell, hogy történjen.<sup>330</sup> A trombofilia vizsgálat egyik ésszerűnek tűnő és gyakran emlegetett haszna a nem-provokált VTE-ben szenvedő betegeinknél az volt, hogy az eredményekre támaszkodva döntöttek az orvosok abban a kérdésben, hogy az antikoaguláció megszakítása biztonságos lesz-e olyan betegeknél, akiknél valamely okból korlátozott tartamú antikoaguláns kezelés volt a terv (pl. a beteg idegenkedik a huzamos kezeléstől, vagy a vérzés kockázata nem elhanyagolható).

Ami az antikoaguláns kiválasztását illeti, az egyetlen trombofilia, amelynek jelentősége van, a nagy kockázatú APS (APS hármass antitest-pozitivitással és/vagy artériás trombózissal)<sup>109,116</sup>. A legújabb tanulmányok azt jelezték, hogy a DOAC-ok a nagy kockázatú APS-es betegek esetében kevésbé védenek a warfarinnál, mivel a DOAC-ok esetében nagyobb az artériás események kockázata<sup>331</sup>. Kohorszunkban hét beteg esetében az APLA eredmények alapján választották ki az antikoaguláns gyógyszert; négy beteg esetében a pozitív eredmények miatt a warfarint választották a DOAC-ok helyett, három betegnél pedig a warfarinról DOAC-ra váltottak, miután az APLA panel eredménye negatív lett. Ezért az APS korai vizsgálatának lehet klinikai haszna a provokálatlan VTE-ben, vagy „gyenge” klinikai rizikófaktorokkal társuló VTE-ben szenvedő betegeknél, amikor az adott betegek számára legmegfelelőbb típusú antikoaguláns szerről döntenek.

Tanulmányunkat korlátozza, hogy retrospektív jellegű, és a releváns adatok kórlapi dokumentációjára támaszkodik. Az Emory Egyetemi Kórházak hematológiáján bevett gyakorlatunk, hogy a trombózis miatt beutalt betegek esetében a kezdeti fekvőbeteg-konzultáció vagy ambuláns vizit dokumentációjában feltüntetünk minden releváns kórelőzményt, beleértve a korábbi vetélésekre vonatkozó információkat is. A beteginformációkat a kezdeti vizit dokumentációjából, valamint az Emory hematológiáján tett későbbi vizitek jegyzeteiből gyűjtöttük ki. Azokat a betegeket, akiknél nem volt elegendő információ az index VTE-re vonatkozóan, kizártuk a vizsgálatból (n=9, **44. ábra**). Ez lehetővé tette az adatok legjobb tudásunk szerint történő összegyűjtését. Azon betegek esetében, akik

trombózisuk kezelésének egy részét az Emory Healthcare rendszerén kívül kapták, nem tudtuk ellenőrizni, hogy ott mikor és milyen vizsgálatokat rendeltek el. Az Emory rendszerben minden beteg esetében áttekintettük az elektromos kórlapokat (Electronic Medical Records, EMR) így minden ott megjelent beteg információja rendelkezésre állt. Tudnivaló, hogy ebben a rendszerben papír alapú dokumentáció nincs, minden létező információ az EMR-ban található. Minthogy az index esetek 2015-ben voltak, az erre az évre érvényes átlagos díjakat használtuk fel a költségek számolásánál. Néhány esetben azonban a vizsgálatot megelőzően vagy azt követően végezték el, vagy az Emory Healthcare System-en kívül, amely körülmény csökkentheti a kiszámított valós költségek pontosságát. Mindazonáltal eredményeink megfelelő becslést nyújtanak a teljes éves trombofília vizsgálatokkal kapcsolatos kiadásokról, és közel állnak a más kortárs elemzésekben közöltekhez<sup>328</sup>. Bár tisztában vagyunk vele, hogy az orvosi ellátás költségei nem szorítkoznak a közvetlen költségekre, hiszen közvetett módon a döntések utólagos hatásaik révén sokféleképpen generálhatnak addicionális kiadásokat, ami nyilvánvalóan befolyásolja a trombofília általános költséghatékonyságát. Ilyen kiterjedt költséghatékonysági elemzés azonban nem tartozott jelen vizsgálatunk tárgykörébe.

### ***Összegzés***

Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a VTE-ben szenvedő betegek körében a trombofília kivizsgálás milyen jelentős heterogenitást mutat a mindennapi gyakorlatban egy nagy akadémiai centrumban is. A gyakorlat nem csak variábilis, de jelentősen eltér a szakmai irányelvekben lefektetett elvektől. Ez a retrospektív elemzés nem adott módot e variabilitás okainak vizsgálatára – csak feltételezhetjük, hogy ennek egy része szakmailag indokolt, de bizonyosak lehetünk benne, hogy egy jelentős része nem indokolható elfogadott érvekkel. A trombofília vizsgálatához kapcsolódó közvetlen költségek igen magasak voltak, bár az eredményeket csak nagyon kevés betegnél használták fel a klinikai döntéshozatalban. Kérdés, hogy mit is lehet tenni e helyzet javítása, a mindennapi gyakorlat jobbá tétele érdekében. Valószínű, hogy intézményi szintű intézkedésekre van szükség a trombofília vizsgálatok rendelési gyakorlatának javítása érdekében. Az ehhez szükséges stratégiák magukban foglalhatják helyi irányelvek kidolgozását, a folyamatos továbbképzést, de akár a klinikai döntéstámogató rendszerek bevezetését az elektronikus orvosi kartonokba is.

## **Trombózishajlam szisztémás lupus erythematosusban szenvedő betegekben<sup>332</sup>**

A fentiekben a VTE általános megközelítését láthattuk. Bizonyos alapbetegségek esetében azonban a trombózis veszélye jóval magasabb az átlagos kockázatnál. Az alábbiakban egy szisztémás lupus erythematosusban (SLE) szenvedő beteganyag vizsgálatán azt mutatom be, hogy a betegek körében az átlagosnál jóval magasabb tromboembóliás szövődmények háttérében milyen kockázati tényezők játszanak szerepet.

Az SLE autoimmun eredetű betegség, amely sokféle klinikai és laboratóriumi manifesztációval jár. Fő jellemzői közé tartozik a patogén autoantitestek széles skálájának jelenléte és a számos szervet érintő gyulladáshoz való válasz. A trombózishajlam szempontjából kiemelkedő fontosságú az anti-foszfolipid antitestek jelentősége (APLA; az anti-kardiolipin, anti-béta-2-glikoprotein-1 és lupus antikoaguláns összefoglaló neve, melyhez – kutatási körülmények között – hozzá számíthatjuk az anti-foszfátidil szerin, anti-annexin-V és anti-protrombin antitesteket is). A foszfolipidek és a hozzájuk kapcsolódó glikoproteinek gyakran az SLE-ben termelődő antitestek célpontjai.<sup>333</sup> Az APLA által kiváltott számos mechanizmus járulhat hozzá a vénás (VTE) és artériás tromboembólia (ATE), valamint a terhességi patológiás folyamatok kialakulásához.<sup>334-336</sup> A trombózis kialakulásának egyik fontos kezdeti lépése lehet, hogy a negatív töltésű foszfolipid-felülethez kötődő antitestek, illetve azok az autoantitestek, melyek e foszfolipidhez asszociált fehérjék ellen irányulnak, trombocita-aktivációt indukálhatnak, ami a trombóziskészség egyik fontos összetevője. A foszfolipid-felületet elfoglaló antitestek megakadályozzák bizonyos természetes antikoaguláns fehérjék, például a szöveti faktor útvonal inhibitora (TFPI) vagy a protein C-protein S komplex kötődését, ezáltal aláásva a szervezet trombózis ellen védekező természetes mechanizmusait és elősegítve a kezdődő trombus növekedését. Ezen kívül az antitesteknek az anionos foszfolipid-felülethez való kötődése megbontja az annexin V védőpajzsát, amely szintén fontos anti-trombotikus faktor, és e védelem elmaradása az anionos foszfolipidek expozíciójához és a véralvadási reakciók felgyorsulásához vezet. Ráadásul a foszfolipideket felismerő autoantitestek hatékonyan aktiválják az endotélsejteket is, ezáltal kiváltják az endoteliális szöveti faktor kifejeződést, valamint növelik a P-szelektin és különféle sejtadhéziós molekulák, pl. az ICAM-1 (intercelluláris sejtadhéziós molekula-1) és VCAM-1 (vaszkuláris sejtadhéziós molekula-1) expresszióját.

A lupus másik jellegzetes eleme a gyulladás. Jól ismert, hogy a gyulladási reakciók a véralvadással számos ponton kapcsolódnak és hogy a gyulladási folyamatok a trombózis rizikóját lényegesen növelik. A gyulladási mediátorok fokozzák a véralvadás beindítását, propagációját, és a szabályozásra is hatással vannak.<sup>337</sup> A gyulladási mediátorok növelik a vérben lévő szöveti faktor plazmaszintjét,<sup>338</sup> a negatív töltésű foszfolipid membránfelületek expozícióját, gátolják a protein C aktivációját. A szabad protein S szintjét csökkentheti a komplement szabályozó fehérje C4BP (C4b-kötő fehérje), amely a keringésben komplexet képez a protein S-sel. A C4BP plazmaszintje gyakran emelkedik a gyulladási válasz során. Így az SLE-ben szenvedő betegek hajlamosak a trombotikus eredetű szív- és érrendszeri betegségekre.<sup>339</sup> Ugyanakkor az SLE-től független örökletes tényezők is növelhetik a TE kockázatát,<sup>320,340</sup> és kutatásunk idején e tényezők relatív hozzájárulása az SLE-ben észlelhető trombóziskockázatra nem volt ismert.

A Leiden mutáció (FVL) és a protrombin gén G20210A mutációja (FIIM)<sup>341,342</sup> a vénás trombofilia leggyakoribb öröklött kockázati tényezői az általános népességben. E mutációk előfordulási gyakorisága Magyarországon nem szelektált, egészséges kontrollok között a FVL esetében megközelíti a 10%-ot; a FIIM esetében ez valamivel alacsonyabb: 2,7-4,8%.<sup>343-345</sup> A protein C (PC), protein S (PS) és antitrombin (AT) hiány<sup>106,346,347</sup> jóval ritkább, de a VTE nagyobb kockázatával jár.<sup>348,349</sup> A hiperkoagulabilitáshoz a megemelkedett véralvadási faktor szintek is hozzájárulhatnak. Számos alvadási faktor emelkedett szintjéről vannak irodalmi adatok, a teljesség igénye nélkül: VWF, FVIII, FIX, FXI, FII (protrombin) és FI (fibrinogén).<sup>348,350</sup> Ezek közül a FVIII és a VWF megnövekedett plazmaszintjéről számoltak be a leggyakrabban a vénás tromboembólia rizikótényezőjeként.<sup>351,352</sup> Jól ismert, hogy ezek a fehérjék akut fázis proteinként viselkednek, ezért nemcsak genetikai, hanem környezeti okokból is emelkedik a szintjük, így nagyon nehéz elkülöníteni, hogy pusztán markerei egy gyulladási folyamatnak, amely a trombóziskészséghez vezet, vagy maguk képezik a kockázatot. Mindez kutatásunk idejében még kevésbé tisztázott volt. (Ma a legtöbb szakember és szakmai irányelv nem tartja elegendően informatívnak a faktorszintek monitorozását ahhoz, hogy olyan klinikai döntésekben, mint a VTE kezelésének időtartama, támaszkodni lehessen rájuk).

A hiperhomociszteinémia, amely a legtöbb esetben szerzett állapot, statisztikailag szintén összefüggésbe hozható az artériás és vénás trombózisok kialakulásával.<sup>353</sup> Hogy ennek mi az oka, az nem világos – bizonyos feltételezések szerint elősegíti az oxidatív stressz által

közvetített endotélkárosodást, aktiválja a trombocitákat és gátolja az antikoaguláns fehérjék kofaktoraihoz való kötődését. Minthogy a homociszteinszint csökkentése – folsav és B-vitaminok adásával – nem vezet a trombózisrizikó csökkenéséhez,<sup>354</sup> a mai álláspont az, hogy a homociszteinszint-emelkedés egy eddig tisztázatlan rizikó markere csupán, és nem közvetlenül okoz tromboembóliát. Cikkünk írásának idejében ez még nem volt tisztázva. Megjegyzendő, hogy SLE-ben a homocisztein (HC) szintje gyakran emelkedett.<sup>355</sup>

Retrospektív vizsgálatunk célja az volt, hogy meghatározzuk a tromboembóliás események gyakoriságát egy magyarországi egyetemi centrumban ambulánsan követett SLE-s betegpopulációban, azonosítsuk a jelentős kockázati tényezőket, meghatározzuk az e tényezőkhöz kapcsolódó relatív kockázatot, és felmérjük a trombofilia szűrés klinikai értékét SLE-ben.

### ***Az SLE-s betegpopuláció tromboembóliás eseményeinek epidemiológiája***

A 105 SLE-beteg közül 22 (21%) betegnek volt TE a kórtörténetében (**39. táblázat**). Tizenhét betegnek volt vénás trombózis; a 17 vénás epizódból 14 mélyvénás trombózis (DVT) volt, egy kivételével mindegyik az alsó végtagban. Ezek közül öt betegnél később recidív események

#### ***39. TÁBLÁZAT. A 105 SLE-s beteg jellemzői***

	<b>TE-mentes csoport</b>	<b>TE-t szenvedett csoport</b>
n	83	22
Nők	78 (94,0)	21 (95,5)
Életkor (év)	40,6 ± 11,6 (18-98)	42,6 ± 12,2 (19-64)
Életkor a diagnóziskor (év)	26,2 ± 10,1 (3-64)	26,8 ± 10,8 (10-47)
Az SLE fennállása (év)	14,3 ± 9,2 (1-37)	15,9 ± 9,0 (4-31)
SLEDAI index mintavételkor	2,8 ± 3,0 (0-14)	3,3 ± 3,7 (0-16)
VTE	-	17
ATE	-	8
≥2 vetélés vagy pre-eclampsia	-	2
Anticoaguláns (AC) kezelés	1*	18
TE esemény AC mellett	-	1

SLE: szisztémás lupus erythematosus, TE: tromboembólia, SLEDAI: SLE betegség aktivitási index, VTE: vénás tromboembólia, ATE: artériás tromboembólia. \*műbillentyű miatt.

következtek be. Két betegnél felületes trombózis, egy fiatal betegnél pedig agyi vénás szinusztrombózis alakult ki. Nyolc betegnél volt artériás trombózis, mindegyikükénél a központi idegrendszerben. A nyolc beteg közül háromnak volt ATE és VTE eseménye is. Nem volt szignifikáns különbség a betegek életkora között az ATE és a VTE események bekövetkeztekor (40,1±14,9, illetve 33,1±10,8; p=0,26). Huszonkét első TE epizód következett be 1335 betegév alatt, így az első trombózis éves incidenciája SLE-s betegeink körében 16,5 volt 1000 betegre vetítve. Az első artériás események incidenciája 5,4 volt 1000 főre, míg az első vénás epizódok

incidenciája 12,4 volt. A mintavétel időpontjában nem volt különbség a SLEDAI indexszel jellemzett betegségaktivitásban a TE epizódokkal rendelkező és nem rendelkező csoport között ( $3,3 \pm 3,7$ , 0-16; és  $2,8 \pm 3,0$ , 0-14;  $p=0,52$ ).

### **Anti-foszfolipid antitestek (APLA)**

Megállapítottuk, hogy 27 beteg (25,7%) pozitív volt az  $\alpha$ - $\beta$ 2-GP1 ELISA tesztre, és 22 beteg (21%) volt pozitív az  $\alpha$ -CL ELISA tesztre. A 22 pozitív beteg közül tíznél IgG  $\alpha$ -CL, két betegnél IgM  $\alpha$ -CL, míg a fennmaradó tíz betegnél IgG és IgM  $\alpha$ -CL is pozitív volt. Az  $\alpha$ -Ph-Ser és az  $\alpha$ -FII prevalenciája 21%, illetve 17,1% volt (**40. táblázat**). A 105 SLE-s beteg 35,2%-ának volt kimutatható LA-a. A véralvadási vizsgálat és az ELISA tesztek eredményei jelentősen (de nem teljesen) átfedték egymást.

#### **40. TÁBLÁZAT. A különféle anti-foszfolipid antitestekkel járó trombólis rizikó**

	n	ATE	RR (ATE)*	VTE	RR (VTE)*	RR(TE)*
$\alpha$ -CL	22	3	4,09 (0,73–22,87)	9	8,18 <sup>†</sup> (2,44–27,49)	8,18 <sup>†</sup> (2,95–22,71)
$\alpha$ - $\beta$ 2-GP1	27	5	5,56 (1,15–26,86)	0	7,41 <sup>#</sup> (2,21–24,78)	7,78 <sup>†</sup> (2,82–21,44)
$\alpha$ -FII	18	2	3,33 (0,50–22,02)	4	4,44 (1,09–18,05)	5,00 <sup>#</sup> (1,58–15,80)
$\alpha$ -Ph-Ser	22	3	4,09 (0,73–22,87)	8	7,27 <sup>#</sup> (2,12–24,97)	6,82 <sup>†</sup> (2,38–19,52)
Nincs APLA	60	2	1	3	1	1
1 APLA (ELISA)	4	1	7,5 (0,85–66,13)	0	-	3,75 (0,54–26,19)
2 APLA (ELISA)	9	1	3,33 (0,34–33,11)		11,11 <sup>†</sup> (3,19–38,71)	8,33 <sup>†</sup> (2,74–25,35)
3 APLA (ELISA)	9	2	6,67 (1,07–41,58)	3	6,67 <sup>#</sup> (1,58–28,10)	6,67 <sup>#</sup> (2,02–22,04)
4 APLA (ELISA)	10	1	3,00 (0,30–30,08)	3	6,00 (1,40–25,67)	6,00 <sup>#</sup> (1,78–20,19)
Bármely AP ELISA	32	5	4,69 (0,96–22,82)	1	6,88 <sup>#</sup> (2,07–22,88)	7,03 <sup>†</sup> (2,55–19,42)
Pozitív LA	37	6	4,86 (0,63–37,28)	2	6,49 <sup>#</sup> (1,96–21,47)	6,49 <sup>†</sup> (2,35–17,92)
Poz. AP ELISA+LA	24	5	6,25 (0,79–49,37)	9	7,50 <sup>#</sup> (2,22–25,35)	8,13 <sup>†</sup> (2,94–22,44)
$\alpha$ -CL+ $\alpha$ - $\beta$ 2-GP1+LA	16	3	5,66 (1,03–30,86)	6	7,50 <sup>#</sup> (2,10–26,75)	8,44 <sup>†</sup> (2,98–23,89)

n: a pozitív betegek száma; ATE, VTE: artériás, illetve vénás események száma a pozitív betegek között; TE: össz trombólis (artériás vagy vénás) RR: relatív rizikó;  $\alpha$ -FII: anti-prothrombin;  $\alpha$ -Ph-Ser: anti-foszfatidil-szerin; CI: konfidencia-intervallum; APLA: anti-foszfolipid antitestek; LA: lupus antikoaguláns;  $\alpha$ -CL: anti-kardiolipin;  $\alpha$ - $\beta$ 2-GP1: anti-  $\beta$ 2-glikoprotein 1.

\*RR az APLA nélküli betegcsoporthoz képest. <sup>#</sup> $p < 0,01$ . <sup>†</sup> $p < 0,001$ .

Huszonegy beteg (az LA pozitív csoport 64,9%-a) mind  $\alpha$ -PL ELISA, mind LA-pozitív volt. Minél magasabb volt a pozitív ELISA tesztek száma, annál nagyobb volt a LA egyidejű jelenlétének valószínűsége. Azt találtuk, hogy az ELISA negatív betegek 17,8%-a volt LA pozitív, az egy és két pozitív  $\alpha$ -PL ELISA tesztet végző betegek 50%-a, illetve 66,7%-a, a három és négy pozitív  $\alpha$ -PL ELISA teszt pozitív betegcsoport 77,8%-a, illetve 80%-a LA pozitív is volt. Az ELISA tesztek vagy tesztkombinációk egyike sem mutatott kizárólagos összefüggést a LA-al (**41. táblázat**). Megjegyezzük azonban, hogy az egyszeri  $\alpha$ -CL ELISA pozitivitást mutató kilenc minta közül hét, míg az egyszeri  $\alpha$ -FII ELISA pozitivitást mutató öt minta közül csak egy mutatott LA aktivitást is.

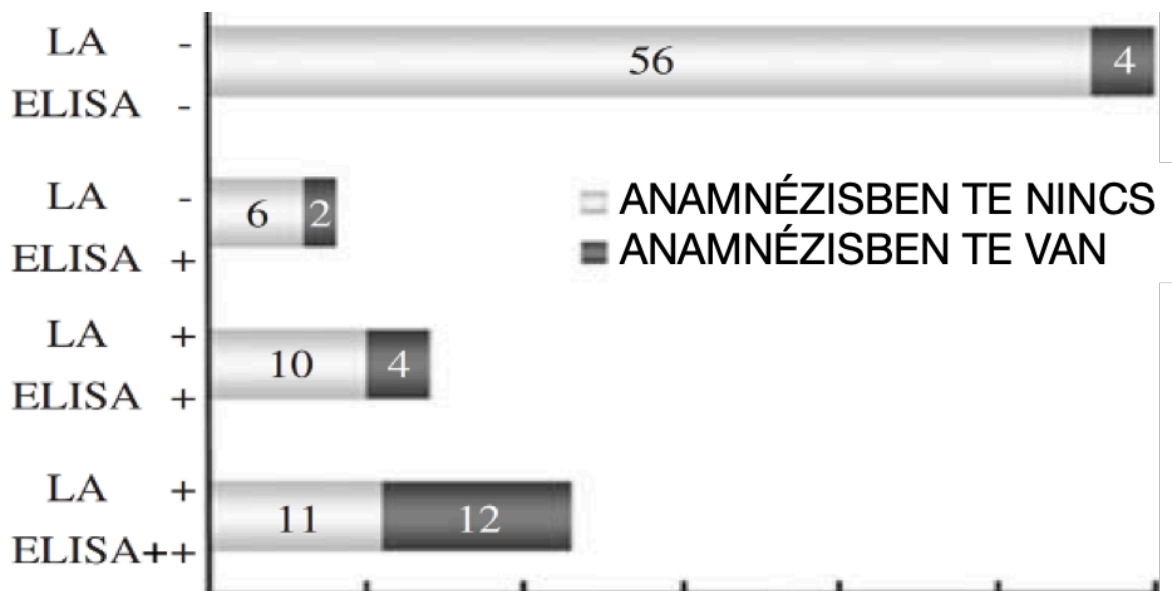
**41. TÁBLÁZAT. A különféle ELISA APLA tesztek összehasonlítása**

	RR (95%CI)*	RR (95% CI) össz**	LA %	RR (95% CI) ha LA is +**
$\alpha$ -CL	8,18 <sup>†</sup> (2,95–22,71)	4,53 <sup>†</sup> (2,26–9,07)	81,8	4,03 <sup>†</sup> (2,06–7,86)
$\alpha$ - $\beta$ 2-GP1	7,78 <sup>†</sup> (2,82–21,44)	5,06 <sup>†</sup> (2,39–10,71)	74,1	5,10 <sup>†</sup> (2,58–10,1)
$\alpha$ -FII	5,00 <sup>#</sup> (1,58–15,80)	1,81 <sup>#</sup> (0,82–3,99)	66,7	2,91 <sup>#</sup> (1,41–5,91)
$\alpha$ -Ph-Ser	6,82 <sup>†</sup> (2,38–19,52)	3,14 <sup>#</sup> (1,57–6,30)	77,3	4,31 <sup>†</sup> (2,23–8,34)

A pozitív tesztekkel rendelkező betegek relatív trombotikus kockázata a foszfolipid-ellenes antitest-negatív betegek kockázatához képest (első oszlop) és a teljes SLE populáción belül (második oszlop), valamint a lupus antikoagulánsra (LA) is pozitív betegek aránya és relatív trombotikus kockázata. ELISA: enzimhez kötött immunszorbens teszt; SLE: szisztémás lupusz erythematosus; RR: relatív kockázat; CI: konfidencia intervallum. \*RR a foszfolipid-ellenes antitestek nélküli betegcsoporthoz viszonyítva; \*\*RR a teljes SLE csoporton belül <sup>#</sup>p<0,01. <sup>†</sup>p<0,001. APLA: anti-foszfolipid antitestek; LA: lupus antikoaguláns;  $\alpha$ -CL: anti-kardiolipin;  $\alpha$ - $\beta$ 2-GP1: anti- $\beta$ 2-glikoprotein 1.  $\alpha$ -FII: prothrombin ellenes antitestek;  $\alpha$ -Ph-Ser: anti-phosphatidil szerin.

Ilyenformán az APLA valamilyen formáját 45 beteg mintáiban mutattuk ki. A 45 APLA pozitív beteg közül 18-nak (40%) volt TE (6 artériás és 14 vénás) eseménye, míg a 60 APLA negatív beteg közül csak négy (6,7%) szenvedett TE-t (2 artériás és 3 vénás esemény) (47. ábra).

Az  $\alpha$ -CL vagy az  $\alpha$ - $\beta$ 2-GP1 ELISA pozitivitása nagyobb trombóliskockázatot jelentett, mint az  $\alpha$ -FII vagy az  $\alpha$ -Ph-Ser (41. táblázat). A legmagasabb relatív trombóliskockázat a teljes



**47. ÁBRA. A pozitív és negatív tromboembóliás (TE) anamnézissel rendelkező betegek** száma négy betegcsoportban a lupus antikoaguláns (LA) és APLA (ELISA) antifoszfolipid antitestek jelenléte szerint. A LA és APLA egyidejű pozitívítása (különösen a hármass pozitív esetekben) jelenti a legnagyobb trombóliskockázatot, míg az ELISA-val vagy alvadási vizsgálattal APLA negatív betegeknek kisebb hányada szenvedett trombólizist.

SLE populáción belül az  $\alpha$ - $\beta$ 2-GP1 és a LA egyidejű pozitívításához kapcsolódott (RR 5,1, 95% CI 2,58-10,1).



***Egyéb kockázati tényezők hozzájárulása a tromboembólia létrejöttéhez SLE-s betegeinkben***

***Természetes alvadásgátló fehérjék.*** Egy betegnél észleltünk csökkent PC aktivitást (29%), egy másik betegnél pedig mérsékelten csökkent PS aktivitást (46%). Egyiküknek sem volt trombotikus eseménye. Tizenhat beteg kapott kumarin antikoaguláns kezelést a mintagyűjtés idejében, ezért kizártuk őket a PC és PS elemzésből. Egy trombózis nélküli betegnél találtunk mérsékelten csökkent AT aktivitást (48%). Nem találtunk szignifikáns különbséget a trombózisos és a trombózis nélküli betegek átlagos AT-szintjei között ( $114,0 \pm 24,9$  és  $105,1 \pm 33,2$ ;  $p=0,26$ ).

***FVL (Leiden) és FIIM (protrombin) mutációk.*** Tíz betegnél a Leiden mutáció miatt megnövekedett ***aktivált protein C rezisztenciát (APCR)*** találtunk. Egyikük homozigóta FVL mutáns, másikat pedig kettős heterozigóta FVL és FIIM volt. Végül egy beteg volt heterozigóta a FIIM mutációra. A tíz Leiden és a protrombin gén mutációval rendelkező (összesen 11) beteg közül négy Leidenes és az egy protrombin gén mutáns beteg szenvedett TE eseményt, minden esetben mélyvénás trombózist. A homozigóta FVL és a kettős heterozigóta két beteg egyike sem volt érintett TE eseménnyel, aláhúzva e tényezők marginális szerepét SLE-ben.

***Szerzett APCR.*** Egy betegnél, akinek a kórtörténetében visszatérő artériás trombózis szerepelt, szerzett APCR-t találtunk, azaz fokozott rezisztenciát mutatott az aktivált PC-vel szemben anélkül, hogy az FV-ben a 306, 506 vagy 679 arginin pozícióban mutáció lett volna jelen. E jelenség megértéséhez tudni kell, hogy az aktivált protein C rezisztencia (APCR) teszt volt az az újítás, amely annak idején a Leiden mutáció fölfedezéséhez vezetett. Észlelték ugyanis, hogy a rekombináns protein C megnyújtja a legtöbb beteg APTI-ját, ám ez a megnyúlás nem jön létre a trombózisos betegek (és az egészségesek) egy részénél. Kiderült, hogy a megnyúlás oka az, hogy az APC hasítja a FV-t (és a FVIII-t is), amely hasítás nem jön létre a FV mutációja (a Leiden mutáció) fennállása esetén, mert ez a mutáció éppen a hasítás helyén módosítja az aminosav szekvenciát. Ennek a betegnek az esetében azonban nem a FV mutációja, hanem a szerzett antitestek akadályozták az APC hatását: a beteg mintája magas titerű pozitívítást mutatott az összes ELISA-val vizsgált APLA-ra, valamint a LA-ra is. Az irodalomból is ismerünk LA-hoz kapcsolódó szerzett APCR-t SLE-s betegnél,<sup>356</sup> de ez nem gyakori hatásmechanizmusa az anti-fosfolipid antitesteknek. Ez a beteg egyedülálló abban a tekintetben, hogy a LA által befolyásolt APCR-t egy olyan rendszerben mutattuk ki, amely a teszt leírása szerint igen specifikus a Leiden mutációra. Annak tesztelésére, hogy esetleg más

betegek LA antitestje is befolyásolja-e az APCR kimutatási rendszerünket, a teljes SLE-s csoport adatait elemeztük. Nem találtunk szignifikáns különbséget a LA pozitív és a LA negatív betegek APCR arányai között ( $2,39 \pm 0,39$ , illetve  $2,46 \pm 0,28$ ;  $p=0,34$ ). A Leiden mutációval rendelkező betegeket ebből az elemzésből természetesen kizártuk. Mindez azt támasztja alá, hogy az anti-foszfolipid antitestek egy heterogén autoantitest csoport, különféle klinikai rizikóval és hatásmechanizmussal.

***FVIII és von Willebrand faktor (VWF).*** A 105 beteg közül tíznél volt emelkedett az FVIII és a VWF szintje. Négyüknél alakult ki trombózis; három vénás és két artériás esemény. További 11 betegnél (közülük háromnak volt TE a kórtörténetében) emelkedett FVIII szint volt emelkedett VWF nélkül, és két betegnél (közülük egynek volt TE a kórtörténetében) emelkedett VWF volt normális FVIII mellett. Ilyenformán az emelkedett FVIII szintek nem járnak statisztikailag szignifikáns TE kockázattal (RR=1,87, 95% CI 0,87-3,99). Hasonlóképpen, az FVIII és a VWF együttes emelkedése sem járt statisztikailag szignifikáns hatással (RR=2,11, 95% CI 0,89-5,02). Az anamnézisben TE-vel rendelkező betegek csoportjában a VWF szintek a TE nélküli csoporthoz hasonlóan bizonyultak ( $118,4 \pm 53,6$ , illetve  $98,1 \pm 41,9$ ;  $p=0,11$ ).

***Homocisztein (HC).*** A húsz, emelkedett HC értékkel rendelkező beteg közül hatnak a kórtörténetében volt TE. E betegek közül egynek artériás trombózisa, kettőnek artériás és vénás, további háromnak pedig csak vénás TE epizódja volt. Ez nem jelent szignifikánsan megnövekedett TE kockázatot (RR=1,59, 95% CI 0,71-3,55). A 20 beteg közül hatnak (három nőnek és három férfinak) 20 mM feletti HC szintje volt; közülük csak egynek volt artériás trombózisa. Nem találtunk különbséget a TE-vel rendelkező és a TE nélküli betegek HC szintjei között ( $12,2 \pm 4,3$ , illetve  $11,5 \pm 4,6$ ;  $p=0,53$ ).

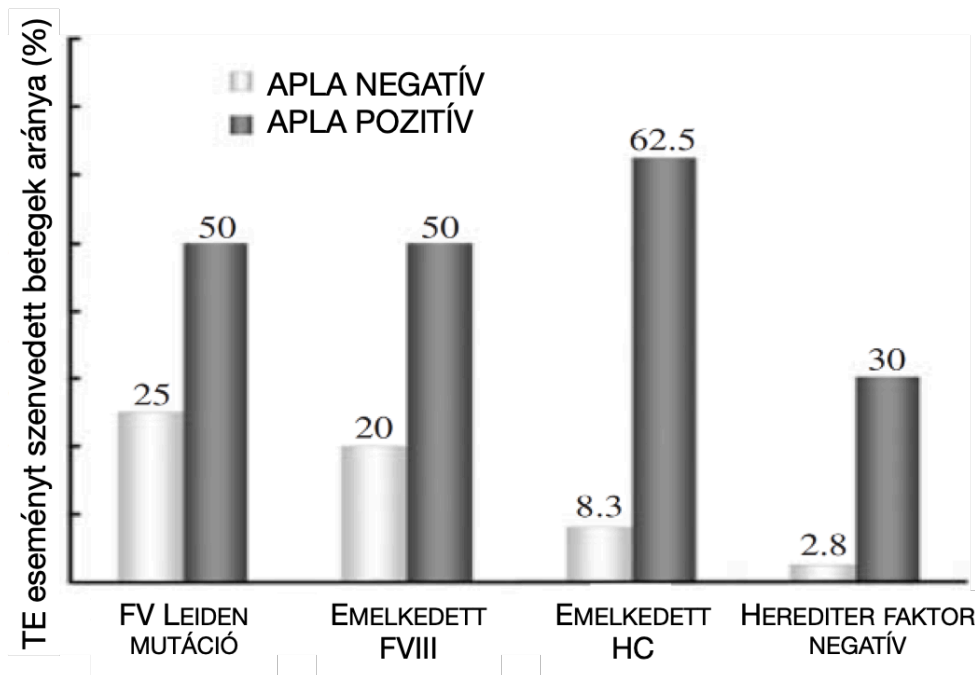
***Valamely öröklött kockázati tényező jelenléte jelent-e addicionális kockázatot az APLA jelenléte mellett?*** Bár jól ismert hogy a FVIII, VWF és HC szintek csak részben genetikailag meghatározottak, részben pedig környezeti hatásokra reagálnak, megvizsgáltuk, hogy az itt leírt SLE-s betegpopulációban a FVL, emelkedett FVIII vagy a HC jelenléte a pozitív APLA teszt mellett jelent-e mérhető TE kockázatonövekedést. (A két FIIM beteget az alacsony szám miatt nem tudtuk bevenni ebbe az elemzésbe). Azt találtuk, hogy e három tényező csak igen kismértékben (1,3-ról 1,4-re) növelte a trombózis relatív kockázatát, ami a 105 fős betegpopulációnkban nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét (az adatokat nem mutatjuk).

### **Megbeszélés**

A nyugati lakosság körében a szív- és érrendszeri betegségek a vezető halálozási okok, így nem meglepő, hogy az európai SLE-s betegek körében az aktív lupusz mellett a trombózisok és fertőzések bizonyultak a fő halálozási oknak.<sup>357</sup> A gyulladás és az APLA jelenléte az SLE-s betegeket a TE kialakulásának magas kockázati csoportjába sorolja. Az artériás és vénás trombózisok gyakrabban és fiatalabb korban fordulnak elő az SLE-ben szenvedőknél, mint az átlag populációban. Az új artériás és vénás TE epizódok előfordulása az itt bemutatott SLE-s populációkban 5,4/1000, illetve 12,4/1000 fő volt. Irodalmi adatok a vénás események hasonló gyakoriságáról (13/1000) és az artériás epizódok valamivel magasabb gyakoriságáról (16/1000) számoltak be egy három etnikai SLE-s csoportban (kínaiak, afroamerikaiak és kaukázusiak) végzett vizsgálatban.<sup>358</sup> A jelen vizsgálatban az SLE-betegek 21%-ának volt a kórtörténetében TE, ami messze meghaladja az átlag populációban a korhoz igazított TE előfordulást. Korábbi, ugyanilyen kormegoszlású SLE-s kaukázusi betegekről szóló irodalmi beszámolóknak ez az arány 20-37% volt,<sup>340,355</sup> míg egy 1000 európai SLE-s betegből álló kohorsz 9,2%-ánál fordult elő TE a 10 éves követés során.<sup>357</sup> Az artériás, illetve vénás TE események bekövetkeztek az életkor a mi SLE-s populációkban alacsonyabb volt (40,1, illetve 33,1 év), mint az átlag populációban.<sup>359,360</sup> A antifoszfolipid szindrómában (APS) szenvedő, válogatatlan betegeknél azonban hasonlóan fiatal életkorban alakul ki trombózis (35,0, illetve 34,5 évesen).<sup>361</sup>

Az egyes TE kockázati tényezők elemzése azt mutatta, hogy az APLA jelenléte jelenti a legnagyobb trombózikockázatot SLE-s populációkban. SLE-s betegeink körében a LA (35,2%) és az ELISA-val kimutatott különböző APLA típusok (17,1-25,7%) prevalenciája nem különbözött az  $\alpha$ -CL (12-60%),  $\alpha$ - $\beta$ 2-GP1 (20-30%),  $\alpha$ -FII (15-40) vagy  $\alpha$ -Ph-Ser antitestek (20-40%) esetében korábban közöltektől.<sup>340,355,362,363-369</sup> A LA vagy az ELISA-val kimutatott szerológiai APLA tesztek pozitívítása a TE kockázatának körülbelül négy-öttszörös növekedését jelenti. Az  $\alpha$ -CL, az  $\alpha$ - $\beta$ 2-GP1 antitestek vagy az LA jelenléte mutatta a legerősebb, míg az  $\alpha$ -FII antitestek jelenléte a leggyengébb hatást a TE kialakulására (**41. táblázat**). A TE és az  $\alpha$ -CL és az  $\alpha$ - $\beta$ 2-GP1 antitestek közepesen magas titerének erősebb összefüggését, valamint az  $\alpha$ -FII teszt alacsonyabb klinikai értékét már korábban is leírták.<sup>368,369</sup> Eredményeink megerősítik az APLA jelenléte és a TE kialakulása közötti ismert összefüggést. Az APLA-t mint egyetlen rizikófaktort tartalmazó SLE-s betegeink 30%-ánál alakult ki TE, amely arány 50% volt azoknál a betegeknél, akik további rizikófaktorokkal is rendelkeztek (**48. ábra**).

Az öröklött trombofilia kockázati tényezői és az APLA kooperatív jellegének értékeléséhez FVL mutációval, emelkedett FVIII vagy HC szinttel rendelkező betegeket vizsgáltunk, APLA



**48. ÁBRA.** Az antifoszfolipid antitestek (APLA) hozzájárulása a tromboembólia (TE) kialakulásához egyéb kockázati tényezők jelenlétében. Az APLA-negatív betegcsoportban az FVL mutációval rendelkező betegek 25%-ánál, míg az APLA-pozitív csoportban 50%-ánál alakult ki trombózis. Hasonló, vagy erősebb hatás figyelhető meg azokban a betegcsoportokban, amelyekben emelkedett a FVIII, vagy a plazma homocisztein szintje; illetve nem tudunk hereditár rizikófaktort kimutatni.

jelenlétével vagy anélkül. Amint a **48. ábra** mutatja, a kettős rizikófaktorral rendelkező betegeknél nagyobb volt a trombózis gyakorisága. Az öröklött trombofilia rizikófaktorok az

**42. TÁBLÁZAT.** Az egyes trombofilia kockázati tényezők prevalenciája és relatív kockázata

Rizikótényező	TE-t szenvedett csoport (n=22) n (%)	TE-t nem szenvedett csoport (n=83) n (%)	RR (95% CI)*
LA	16 (72,7)	21 (25,3)	4,90 (2,10–11,45)
APLA (ELISA)	15 (68,2)	17 (20,5)	4,89 (2,21–10,83)
FVL	4 (18,2)	6 (7,2)	2,11 (0,89–5,02), ns
FIIM	1 (4,5)	1 (1,2)	2,45 (0,58–10,33), ns
Emelkedett FVIII & VWF	4 (18,2)	6 (7,2)	2,11 (0,89–5,02), ns
Emelkedett HC	6 (27,3)	14 (16,9)	1,59 (0,71–3,55), ns
AT hiány	0	1 (1,2)	-
PC hiány	0	1 (1,2)	-
PS hiány	0	1 (1,2)	-
Nincs rizikótényező	1 (4,5)	35 (42,2)	0,09 (0,01–0,65)

RR: relatív kockázat; CI: konfidenciaintervallum; ns: nem szignifikáns; ELISA: enzimhez kötött immunszorbens teszt; LA: lupus antikoaguláns; APLA: anti-foszfolipid antitestek; FVL: Leiden mutáció; FIIM: protrombin gén mutáció; VWF: von Willebrand-faktor. HC: homocisztein; AT: antitrombin, PC, PS: protein C és S.

\*RR a teljes SLE csoporton belül.

APLA jelenlétének erős hatása miatt enyhébb hatást gyakoroltak a TE események kialakulására az SLE-s betegeknél (**42. táblázat**), mint az általános populációban. Megerősítettük például, hogy az FVL mutáció a trombózis fokozott relatív kockázatát hordozza (RR=5,17, 95% CI 1,18–22,61) a LA negatív betegek csoportjában. A pozitív LA-val rendelkező betegcsoportban

azonban ez a hatás statisztikailag elhanyagolható volt (RR=1,18, 95% CI 0,41-3,39) a LA markáns hatása miatt.

SLE-s betegpopulációkban az FVL mutáció és az FIIM mutáció gyakorisága (9,5%, illetve 1,9%) nem különbözött a korábban nem szelektált magyar betegek körében közöltektől.<sup>342-344</sup> Az FVL gyakorisága Magyarországon ismertén magasabb, mint a legtöbb más európai országban.<sup>370,371</sup>

A 150% feletti FVIII szintek gyakorisága az anamnézisben TE-vel rendelkező betegeink között 31,8%, míg a TE nélküliek között 16,9% volt. Ezek az arányok valamivel magasabbak, mint egy 301 általános VTE-s beteget és 301 egészséges személyt összehasonlító vizsgálatban mért értékek (25% vs. 11%).<sup>352</sup> Ez nem meglepő, ha figyelembe vesszük, hogy az SLE végső soron gyulladásos betegség, és a FVIII akut fázis fehérje. Korábban leírták, hogy mérsékelt hiperhomociszteinemia a kaukázusi DVT betegek 28,8%-ánál és a trombólízis nélküli betegek 11,5%-ánál volt jelen<sup>372</sup>. SLE-s populációkban ezek az arányok hasonlóak voltak: 27,3% és 16,9%.

Mivel a különböző deficienciák az alvadási rendszer különböző pontjain hatnak, a trombólízis klinikai jellege is változhat a defektus típusától függően. A tíz, Leiden mutációval rendelkező beteg közül négyenél volt a kórtörténetben már bekövetkezett TE. Mind a négyüknek mélyvénás trombólízisa volt. Ezzel szemben kilenc LA-val és emelkedett plazma HC-vel rendelkező betegből ötnél artériás és vénás esemény is történt (három artériás, négy vénás). E betegek körében az artériás trombólízis kockázata magasabb volt, mint a vénás trombólízisé (RR=6,4, 95% CI 1,82-22,51 vs. RR=3,28, 95% CI 1,35-7,98). Adataink azonban azt mutatták, hogy az APLA jelenléte egyformán hozzájárul az artériás és a vénás események kialakulásához. Az APLA pozitívítás hasonló RR-t jelentett az ATE és a VTE esetében (**40. táblázat**). A két felületes tromboflebitiszben szenvedő betegnél az APLA volt az egyetlen kockázati tényező. Bár ez a fajta trombólízis gyakran társul gyulladásos állapotokhoz, e két betegnek tromboflebitiszük kialakulásakor inaktív SLE-je volt. Egy fiatal, agyi vénás trombólízisban szenvedő nőbetegnél az összes APLA magas titerét (LA is, tehát hármass pozitív APLA) találtuk mint egyetlen rizikófaktort. Az irodalomból is ismert az APS fiatal betegeknél agyi vénás trombólízis<sup>373,374</sup> formájában való manifesztációja.

A TE epizódok körülbelül egyharmada (az artériás események 25%-a, a vénás események 35,3%-a) az SLE diagnózist követő első két éven belül történt; további egyharmaduk (37,5%

és 29,4%) a diagnózist követő második és tizedik év között, míg a fennmaradó egyharmad (37,5% és 35,3%) a tizedik év után, ami megerősíti, hogy mind az artériás, mind a vénás epizódok az SLE viszonylag korai manifesztációi is lehetnek,<sup>375</sup> de a TE kockázata hosszú távon fennáll. Néhány olyan tromboziskockázati tényezőt, mint például a dohányzás és a diszlipidémia,<sup>375</sup> nem vettünk figyelembe ebben a vizsgálatban. E tényezők jelenléte vagy hiánya nem valószínű, hogy alapvető megállapításainkat módosítaná.

Ennek a vizsgálatnak van néhány fontos korlátja. Ez egy retrospektív, egyetlen országos referenciaközpontban követett betegpopuláció elemzése. Ez a beutalási torzítás elemét is magában hordozhatja, amennyiben a központba irányított betegek szenvedhetnek az átlagosnál súlyosabb SLE-ben. Vizsgálatunk jellege korlátozta a rendelkezésre álló betegek számát is. Vizsgálatunkat azonban értékessé teszi, hogy az átlag populációban ismert tromboziskockázati tényezőknek számító laboratóriumi paraméterek teljes körét bevontuk, és összehasonlítottuk őket az APLA-val egy viszonylag egységes SLE betegpopulációban.

Összefoglalva, azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az APLA jelenléte magas TE kockázatot jelent SLE-ben. A trombotikus kockázathoz más jól ismert TE kockázati tényezők is hozzájárulnak ugyan, de kontribúciójuk marginális, aminek statisztikai igazolásához jóval nagyobb esetszámra lenne szükség. Így az SLE-s betegek mindennapi ellátásában az APLA vizsgálata egyértelműen fontos klinikai paraméter, míg a többi trombofiliás tényező rutinszerű szűrése nem tűnik indokoltnak. Továbbá az itt bemutatott adatok alátámasztják, hogy a különféle szerológiai anti-foszfolipid antitestek közül az  $\alpha$ -CL és a  $\alpha$ - $\beta$ 2-GP1 ELISA teszt pozitivitás jelenti a legmagasabb tromboziszrizikót, aminek alapján egyetérthetünk a jelenlegi diagnosztikus irányelvekkel, melyek szerint az antiáfoszfolipid szindróma laboratóriumi kritériumát csak az  $\alpha$ -CL, az  $\alpha$ - $\beta$ 2-GP1 és a LA képezik.

## **Jatrogén trombofília – az aszparagináz okozta trombózis kezelése<sup>376</sup>**

A hematológiai malignitások gyakran szövődnek TE eseményekkel. Ennek számos oka van, amelyek következtében a daganatos véresejtekből szöveti faktor szabadul fel következményes trombingenerációval. Ezek a TE szövődmények mindig kihívást jelentenek a hematológus számára, mert e betegségek kezelése során nagyon gyakori a(z) olykor súlyos) trombocitopénia, ami az antikoaguláns kezelést nehezíti, alkalmanként lehetetlenné teszi. Az ALL esetében még összetettebb a helyzet, ugyanis az L-Asp, mely az ALL kezelésében a polikemoterápia hatékony összetevőjének bizonyult,<sup>377</sup> a véralvadási faktorok (lényegében minden alvadási fehérje, melyek közül kiemelkedik a fibrinogén és az antitrombin [AT]) szintjének csökkentésével megzavarja a hemosztázist.<sup>378</sup> Ez a megbomlott egyensúly klinikailag gyakran tromboembóliás szövődményekhez vezet.<sup>378</sup> A vénás trombotikus szövődmények aránya 5,9% az ALL-lel kezelt felnőttek körében, amit az L-Asp kezelés egyértelműen növel.<sup>379,380</sup> A profilaktikus friss fagyasztott plazma (FFP) hatástalannak bizonyult az L-Asp-hez társuló trombózis megelőzésében, míg az AT koncentráttal együtt adott alacsony molekulásúlyú heparin valóban csökkentheti a trombotikus események arányát.<sup>381-383</sup> Az AT koncentráttal adására azért van szükség, mert az ilyenkor általában alkalmazott gyógyszerünk (frakcionálatlan vagy kis molekulásúlyú heparin) hatása közvetett, AT nélkül e szerek hatástalanok, így szokásos kezelési stratégiánk eleve nem működik. Az AT koncentráttal magas költsége azonban aggályossá teszi ezt a megközelítést. In vitro kísérletek bizonyították a melagatran (direkt trombin inhibitor) antikoaguláns hatékonyságát L-Asp-indukált AT-hiányos plazmával.<sup>384</sup> Azonban az új, közvetlenül ható orális antikoagulánsokkal szerzett klinikai tapasztalatok az akut leukémia kezelésében még mindig nagyon korlátozottak.

Ebben e helyzetben logikus segítség lenne a közvetlenül ható újabb antikoaguláns (DOAC) szereink alkalmazása, azonban e gyógyszerekkel a leukémiák kezelésében szinte semmi tapasztalattal nem rendelkezünk – részben az e gyógyszerek bevezetése óta eltelt viszonylag rövid idő, részben a trombocitopénia miatt indokolt óvatosság miatt. Közlésünk egyfajta áttörést képvisel ebben a kérdésben, mert az első közölt eset, amelyben DOAC szerrel kezeltünk egy L-Asp által okozott trombózist. Bár a hivatalos irányelvek<sup>385</sup> még mindig az LMWH + antitrombin adást javasolják, közleményünk óta egyre több beszámoló<sup>386,387</sup> van a DOAC szerek hatásosságáról nemcsak a kezelésben, de a megelőzésben is.

A rivaroxaban egy közvetlenül ható anti-Xa-gátló, amely az AT-től függetlenül fejti ki hatását, a mélyvénás trombózis és a tüdőembólia megelőzésére és kezelésére rendelkezik

engedéllyel.<sup>388</sup> Esetünk egy 41 éves férfi volt, akinél közönséges pre-B-ALL-t diagnosztizáltunk. Az egyetlen ismert társbetegsége a magas vérnyomás volt. Megjegyezzük, hogy a beteg kivizsgálása során heterozigótának bizonyult Leiden mutációra. A beteget a GMALL 07-2003 protokoll szerint kezeltük.<sup>389</sup> A terápia 20. napján (az indukciós fázis I. szakaszának végén) a beteg 1700 NE Peg-aszparaginázt (PEG-Asp) kapott. Orvosai nem rendeltek el profilaktikus AT- vagy FFP-pótlást. A 24. napon a B-ALL minimális reziduális betegség (MRD) még mindig kimutatható volt immunfenotipizálással (a sejtek 0,5%-a).

A beteget a 32. napon újra felvettük a II. indukciós fázis elindítása céljából. Felvételekor láztalan volt, a jobb karja duzzadt volt, és a deltoid izom és a csukló radiális oldala közötti vena cephalica mentén egy fájdalmas köteget találtunk. Az ultrahangvizsgálat felületes flebitisz igazolt, mélyvénás trombózis jelei nélkül (**49. ábra**). A fehérvérsejtek száma 66,4 G/l volt, ebből 88% neutrofil granulocita (blasztok nélkül); a vérlemezkeszám 120 G/l, a hemoglobin normális, a fibrinogén 1,6 g/l, a protrombin aktivitás 52%, az aPTI 48 s, a TI 30 s, az AT aktivitás 31,4%, a transzaminázok és a vesefunkció normális volt. A beteg az előző 10 napban nem kapott G-CSF-et. Központi vénás katéterét (CVK) eltávolították a jobb subclavia vénából, antibiotikumot (piperacillin/tazobaktam+vancocin) és rivaroxabant indítottunk, napi 2x15 mg



**49. ÁBRA.** *Ultrahangvizsgálattal kimutatott felületes flebitisz.* A téglalap felső részén egy trombóissal teli véna látható, a véráramlás jelei nélkül.



dózisban; a II. indukciós fázist elhalasztottuk. A CVK csúcsából származó baktériumtenyésztések negatívak maradtak. A rivaroxaban szedésének 13 napja alatt az AT aktivitás normalizálódott, és a felületes tromboflebitisz klinikai tünetei teljesen megszűntek. Az AT aktivitást trombin alapú kromogén teszttel (Berichrom Antithrombin III, Dade Behring) határoztuk meg, hogy elkerüljük a rivaroxaban hatását az AT aktivitás mérésére.

Amint a bevezetőben említettem, tudomásunk szerint ez volt az első beszámoló az L-Asp okozta szerzett AT-hiányos trombózis DOAC gyógyszerrel történő sikeres kezeléséről. Hangsúlyozni kell, hogy ez egy több tényező (pl. AT-hiány, leukocitózis, Leiden mutáció) által okozott felületes flebitisz volt, de a javulás gyorsasága, az alkalmazás kényelme és a gyógyszer viszonylag alacsony ára (összehasonlítva a hagyományos LMWH+AT-pótlás árával) már akkor nagyon vonzóvá tette ezt a megközelítést. Bármennyire is logikus lépés a DOAC szerek használata, nyilvánvalóan prospektív vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy hatásosságukat és biztonságosságukat ebben a kiélezett helyzetben részleteiben megismerjük. Az itt röviden összefoglalt, úttörőnek számító beszámoló után ezért nagy öröm, hogy ez első ilyen prospektív vizsgálat<sup>390</sup> már folyamatban van – izgalommal várjuk az eredményeket.

## A PNH az agresszív trombofiliák jellegzetes példája<sup>391-394</sup>

Noha a legtöbb tankönyv nem tárgyalja külön a trombofiliák agresszív formáit, a hemosztázissal foglalkozó gyakorló orvos számára világos, hogy vannak olyan tromboziskészségek, amelyek sokkal nehezebben tarthatók kézben, mint a legtöbb tromboembóliás betegség. Az előző fejezetek egyikében tárgyalt SLE-s betegek közül ide kívánkozik két beteg esete: mindkettőjüknek magas titerű hármes pozitív antifoszfolipid szindrómája (APS) volt. Egyikük súlyos agyi vénás szinusztrombózist szenvedett, a másikuk terápia ellenére ismételtén visszatérő artériás (+vénás) trombozist. Ez a fajta agresszív trombozishajlam szerencsére meglehetősen ritka, viszont annál nagyobb kihívást jelent a kezelőorvos számára. Ezért érdemesnek látszott ezt a problémát külön névvel és definícióval ellátni.<sup>394</sup> Agresszív trombofiliának tekintem a tromboembóliás betegséget, ha bármely feltétel teljesül az alábbiak közül:

1. Lokalizációja nem a végtagokat érinti (pl. agyi szinusztrombózis, splanchnikus – kapuvéna, májvénák [Budd–Chiari-szindróma], lépvéna- vagy vena mesenterica – vagy bőrvénatrombózis stb.)
2. Az artériás ÉS a vénás ág is érintett (nem számítva a stroke miatt bénult végtag trombozist, sem az ismert artériás érbetegek VTE betegségét)
3. TE esemény hatékony antikoaguláns kezelés mellett lép föl

A felnőttkori agresszív trombofiliák hátterében szinte mindig szerzett betegséget kell keresni. Az **43. táblázat**<sup>394</sup> összefoglalja azokat a betegségeket, amelyek gyakran okoznak agresszív trombofiliát. A tromboembóliás betegségek komplex patofiziológiáját mutatja, hogy ezek a betegségek nem minden betegben járnak tromboembóliás szövődéssel, és egyelőre ennek magyarázatát nem sikerült fölfedezni. Vagyis nem tudjuk, mi a különbség azok között a betegek között, akiknél kialakul tromboembólia és akiknél nem. Azt sem tudjuk, hogy a különbséget a betegség heterogenitásában vagy a beteg hemosztázis rendszerének komponenseiben kell-e keresni. Mindenesetre a **43. táblázatban** található felsorolás hasznos támasz e betegek kivizsgálásánál, hiszen a célzott vizsgálatok segítenek a gyors diagnózishoz.

## 43. TÁBLÁZAT. Az agresszív trombofília okai.

Az agresszív trombofília háttérében gyakran talált betegségek	
Betegség neve	Megjegyzés
Anti-foszfolipid szindróma (APS)	Trombocitopenia előfordul, katasztrofális APS sokszervi elégtelenséget is okozhat. Diagnózis: APLA panel
Paroxizmális nokturnális hemoglobinuria (PNH)	ssitopenia előfordul, LDH lényegében mindig emelkedett. Diagnózis: Flow cytometria
HIT	Trombocitopenia. 4-T szabály. Diagnózis: klinikai + laboratóriumi.
Mieloproliferatív betegségek (MPN)	Gyakran (nem mindig) trombocitózis. LDH lehet emelkedett (nem mindig). Diagnózis: JAK2, CALR, MPL mutációk, csontvelő szövettan
DIC, disszeminált malignitás	Alacsony fibrinogén, megnyúlt PT, APTT, Diagnózis: klinikai kép+labor
Gyulladásos bélbetegségek (IBD)	Általában panaszos, és a TE szövödmény az IBD diagnózist követi
Nefrózis	Vizeletvizsgálat! (gyakran sajnos elmarad a trombózis kivizsgálás során)
Egyéb (pl. kumarin nekrosis, hiperviszkozitás stb.)	Klinikai kép
„Idiopátiás” – nem találunk magyarázatot	

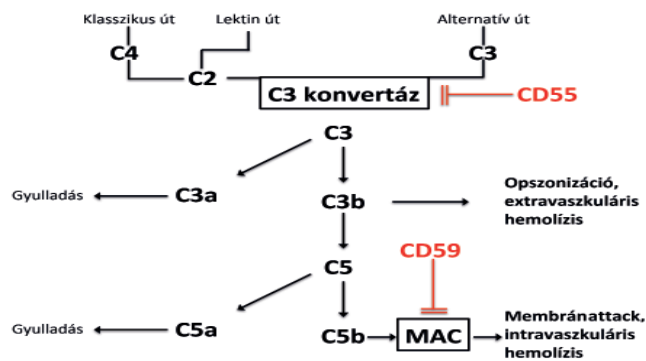
Az agresszív trombofília definícióját illetően a szövegre utalunk.

A táblázatban felsorolt betegségek közül különösen érdekes a paroxizmális nokturnális hemoglobinuria (PNH), amiről itt részletesebben szeretnék beszélni. „A PNH az orvostudomány számára ismert leggonoszabb szerzett trombofiliás állapot”<sup>395</sup> (*PNH is the most vicious acquired thrombophilic state known in medicine*) – ezt a mondatot a PNH neves szakemberei, a firenzei Lucio Luzzatto, Giacomo Gianfaldoni és Rosario Notaro nevezetes összefoglalójából idéztem, és teljesen egyetértek vele. A kritikus trombotikus szövödményeket, amelyeket a PNH okozhat, jól példázza egy nevezetes esetünk, egy fiatal leány, aki terhesen kapott agyi sinus transversus trombózist terápia LMWH antikoaguláns kezelés mellett – így két kritériumát egyszerre teljesítve az agresszív trombofiliának.<sup>393</sup> Ez a szövödmény egy olyan – a beteg szempontjából szerencsés – időpontban következett be, amikor már elérhető volt a PNH akkor egészen újszerű kezelési lehetősége, az első komplementgátló monoklonális antitest, az eculizumab. Így ez a betegünk lett az első, aki Magyarországon ezt a kezelést kaphatta – a kezelés hatékonynak bizonyult, a szinusztrombózis meggyógyult, betegünk egészséges kislánynak adott életet. Sőt, azóta folyamatos eculizumab védelemben egy kisfiút is szült, szövödménymentes terhesség és szülés során.

Ez az eset adta a lökést, hogy a PNH-val részletesebben kezdjek foglalkozni. Az alábbiakban összefoglalom a PNH-ban feltételezett trombotikus tényezőket, és összefoglalom azt a munkát, amelyet én koordináltam, és amelynek során kialakítottunk egy Közép-Európára vonatkozó konszenzusos ajánlást a PNH modern gyógyszerekkel való kezelésére.

A PNH a hemopoetikus őssejtek PIG-A nevű génjének (foszfatidil-inozitol N-acetilglukozamin-A) null-mutációja okozza.<sup>396,397</sup> Ez tehát egy ún. szomatikus mutáció, vagyis nem örökletes, és kizárólag a hemopoietikus őssejtet és leszármazottjait, tehát az összes

vérsejtet érinti, a szervezet többi sejtjeit nem. Ez a mutáció azt eredményezi, hogy a PNH-s klón sejtjei nem rendelkeznek a „gliko-foszfatidil inozitol (GPI) horgonnyal” és következésképpen az összes olyan membránfehérjével, amelyek a normális sejtekben e horgonnyal kapcsolódnak a membránhoz. Az emberi szervezetben kb. 150 fehérjéről ismert, hogy GPI horgonnyal van a sejtmembránhoz rögzítve, amelyek közül a PNH patogenezise szempontjából a legfontosabbnak a komplement rendszer CD55 és CD59 fehérjéinek hiányát tartjuk. Amint a **50. ábrán**<sup>392</sup> látható, a CD55 (decay accelerating factor, DAF) a komplement rendszer fontos membrán inhibitora, gátolja a C3 konvertázt és ezáltal a C3a/C3b keletkezését és az ebből származó opsonizációt és kemokin-felszabadulást. A CD59 szintén a komplement rendszer membrán inhibitora, a C5 fehérjén keresztül közvetlenül gátolja a membrán-attak komplex (MAC) kialakulását. A CD59-et korábban nevezték protectinnek, illetve a *membrane inhibitor of reactive lysis* rövidítés után MIRL-nek is. E két fehérje hiánya a PNH-s klón vörösvérsejtjeit (illetve összes sejtjét) védtelenné teszi a komplement rendszerrel szemben, ami a PNH-ban megfigyelhető intravaszkuláris hemolízis közvetlen oka.



**50. ÁBRA. A komplement rendszer sematikus ábrázolása.** A PNH-s klónhoz tartozó sejtek membránjából hiányzik a két fő komplementgátló fehérje (CD55 és CD59). Minthogy az alternatív út folyamatosan aktív, e védelem hiánya intravaszkuláris hemolízist okoz. Viszont a C5 gátlás (pl. eculizumab) ugyan megakadályozza az intravaszkuláris hemolízist, de a C3b opsonizáció révén extravaszkuláris (C3 Coombs pozitív) hemolízis megjelenéséhez vezet.

A PNH legtöbb tünete a vér sejtjeinek komplement iránti védtelenségével, illetve következményes sérülékenységgel függ össze. Ez okozza az intravaszkuláris hemolízist, amely a klasszikus forma vezető tünete (hemoglobinuria, laktát-dehidrogenáz [LDH] emelkedés, hiperbilirubinémia, és a szabad hemoglobin okozta tünetek (**44. táblázat**), amelyek a nitrogén-monoxid [NO] megkötése révén jelentkeznek). Nemcsak a vörösvértestek, hanem a fehérvérsejtek és a vérlemezkék is áldozatul esnek a komplement támadásának, nagymennyiségű szöveti faktort és mikropartikulumot szabadítva fel, ami az intravaszkuláris hemolízissel együtt a trombózisra való hajlam drámaian megnövekedett mértékét eredményezi.

Ez az agresszív trombofilia a PNH másik vezető tünete. A **44. táblázat**<sup>392</sup> mutatja a leggyakrabban megfigyelt tüneteket és patomechanizmusukat.

**44. TÁBLÁZAT. A PNH leggyakoribb tünetei és patomechanizmusuk**

Tünet	Patomechanizmus
Légszomj, fáradékonyság	Anémia, PE, pulmonális hipertónia, NO depléció
Sötét vizelet	Hemoglobinuria
Hasi Fájdalom	NO depléció
Trombózis, gyakran atípusos lokalizációban	Intravaszkuláris hemolízis. TF felszabadulás széteső trombocitákból, fehérvérsejtekből
Erektilis diszfunkció	NO depléció
Diszfágia	NO depléció
Mellkasi fájdalom	NO depléció, odinofágia, PE
Veseelégtelenség	Szabad hemoglobin nefrotoxicitása, vese hemosziderózis (proximális tubulus károsodás)
Csontvelő-elégtelenség, citopéniák	Az őssejtek elleni immunológiai (T sejt) támadás, társuló aplasztikus anémia, komplement-indukálta sejtsejtés
Vashiány	Hemosziderinuria

PE: pulmonális embólia, NO: nitrogén-monoxid, TF: szöveti faktor.

Amint a fenti eset kapcsán már megjegyeztem, a PNH kezelésében az áttörést az első komplementgátló megjelenése<sup>398</sup> hozta – korábban szupportív gondozáson, transzfúziók adásán kívül nem volt lehetőség a betegek gyógyítására. Eculizumab kezeléssel, mely egy terminális C5-gátló monoklonális antitest, és kéthetente kell adni vénás infúzióban, a betegek jelentős része transzfúziómentessé volt tehető.<sup>399,400</sup> További fejlődést jelentett a ravulizumab megjelenése.<sup>401,402</sup> A ravulizumab is monoklonális antitest, mindössze négy aminosavban tér el az eculizumabtól, ami az antitest specificitását nem befolyásolja, de a neonatális Fc receptorhoz való kötődés révén plazmafelezési idejét jelentősen növeli,<sup>403</sup> ezért csak 8 hetente kell adni.

Azonban a betegek nem egyöntetűen reagálnak a C5-gátló kezelésre. Egy 2021-ben megjelent nemzetközi tanulmány 160, eculizumabbal kezelt beteg válaszát vizsgálta, és a válaszokat négy kategóriába sorolta (**45. táblázat**).<sup>1</sup> A táblázatból látható, hogy a betegek egy részénél a C5-

**45. TÁBLÁZAT. Eculizumabra adott válasz<sup>1</sup>**

Eculizumabra adott válasz	A betegek hány %-a?	Újabb gyógyszertől milyen javulás várható?
Komplett remisszió (CR) Hgb >120	<b>21,3</b> (11% BTH, 17% EVH)	Ritkább kórházi vizitek
Jó parciális válasz (VGPR) Hgb 100-120	<b>40,2</b> (8% BTH, 43% EVH)	Hgb teljes normalizálása
Részleges válasz, vérszegénység (Hgb 80-100, 1-1 transzfúzió)	<b>26,8</b> 21% BTH, 55% EVH)	Teljes transzfúziómentesség
Rendszeres transzfúziók	<b>11,8</b> 27% BTH, 66% EVH)	Transzfúziómentesség, vasterhelés csökkentése

160 kezelt betegnél. BTH: áttöréses hemolízis (*breakthrough hemolysis*); EVH: extravaszkuláris hemolízis. A hemoglobin (Hgb) g/l egységben van megadva.

gátló kezeléssel nem sikerült a vérszegénységet teljesen rendezni. A táblázatban látható számok lényegében minden korábbi vizsgálatban is<sup>398-402</sup> hasonló mértékű válaszokat mutattak. A fennmaradó anémiának több oka is lehetséges (pl. csontvelő-elégtelenség), de jelentős részben az extravaszkuláris hemolízisnek köszönhető (l. **50. ábra**). Tudnivaló, hogy bár a kezeletlen PNH-ban csak intravaszkuláris hemolízist látunk, a terminális C5-gátlás megakadályozza a PNH-s vörösvérsejtek intravaszkuláris hemolitikus pusztulását, aminek a C3-gátlás hiányában az a következménye, hogy opszonizálódnak, és elindul egy C3-Coombs-pozitív, extravaszkuláris hemolízis. Ez okozza a C5-gátlás mellett fennmaradó vérszegénység jelentős részét.

A következő áttörést a proximális (tehát a C3 szintjén ható) komplementgátló szerek megjelenése jelentette. E szerektől várható volt, hogy az extravaszkuláris hemolízis kezelésében is hatékonyak. Az első ilyen már Magyarországon is elérhető gyógyszer a pegcetacoplan. Valóban, az eddigi vizsgálatok tanúsága szerint a C5-gátlásra csak részlegesen reagáló PNH-s betegek körében a pegcetacoplan a hemoglobin jelentős emelkedéséhez vezetett, legtöbbjükben megszüntetve a vérszegénységet.<sup>404,405</sup>

Tekintettel arra, hogy immár három gyógyszer is elérhető a PNH kezelésére, nem beszélve a gyógyszerkipróbálás alatt lévő számos különféle komplementgátló szerről, egyre nagyobb igény volt arra, hogy a PNH kezelésében gyakorlattal rendelkező szakemberek megegyezzenek a kezelés, a különféle gyógyszerek alkalmazásának irányelveiben. Minthogy Közép-Európában a nyugati országoktól jelentősen eltér az egészségügy szervezése és a finanszírozási viszonyok is, összehívtunk egy közép-európai panelt magyar, bolgár, horvát, szlovén, szlovák, román, cseh, lengyel és orosz hematológusokból, és a konszenzus<sup>391</sup> kialakítását én vezethettem. A kialakult irányelvet foglalom össze a következő bekezdésekben.

A cikkben a fentiekhez hasonlóan összefoglaltuk az eddigi randomizált vizsgálatokból származó ismereteket. Ezután a terminális C5-gátlás és a proximális C3-gátlás előnyeit és hátrányait hasonlítottuk össze. Ezt az összehasonlítást tartalmazza a **46. táblázat**<sup>391</sup>.

**46. TÁBLÁZAT. A terminális (C5) és proximális (C3) komplement gátlás előnyei és hátrányai**

	C5 (terminális) komplement gátlás	C3 (proximális) komplement gátlás
Előnyök	Több éves tapasztalat	Szuperior hatékonyság*
	Klinikailag a betegek jelentős részének segít	Szubkután adagolás, önadagolás lehetséges
	Nagyon kevés mellékhatás	Kevés mellékhatás
Hátrányok	Extravasculáris C3-Coombs hemolízist okoz	Kevés a gyakorlati tapasztalat
	A betegek egy részében nem kellően hatásos	Egyetlen gyógyszer elérhető egyelőre
	Intravénásan adható csak	Heti kétszer kell adni, fél-egy órás szubkután injekció
	Neisseria meningitidis oltás szükséges	Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae és Hemophilus influenzae oltás is szükséges
	Magas közvetlen költségek	Magas közvetlen költségek
	Magas indirekt költségek (munkából kiesés, BTH stb.)	Indirekt költségeket nem ismerjük még

BTH: áttöréssel járó hemolízis.\*A Hgb szint emelésében.

A konszenzusos javaslatok megértéséhez még beszélni kell az áttöréssel járó hemolízis (BTH) két fajtájáról. Az egyiket farmakokinetikai BTH-nak (PK-BTH) hívják, ez rendszeresen, minden infúziós ciklus vége felé jelentkezik, és oka az eculizumab szokásosnál rövidebb felezési ideje. A másikat farmakodinámiás BTH-nak (PD-BTH) nevezik, és oka a komplement rendszer váratlan aktivitásnövekedése, általában egy interkurrens fertőzés vagy gyulladás miatt. Ezek kiszámíthatatlan időzítéssel jelentkeznek, és a kiváltó ok általában nyilvánvaló. A kettőt klinikai alapon általában nagyon egyszerűen el lehet különíteni egymástól. Mindezek alapján a következő ajánlások fogalmazhatók meg:

- 1. Bár a PNH egyetlen kuratív kezelése az őssejtátültetés, annak morbiditása és mortalitása miatt a legtöbb tünetes beteget komplementgátló kezeléssel javasoljuk kezelni, annak ellenére, hogy ez általában élethossziglani kezelést jelent.**
- 2. A közép-európai országok legtöbbszörében a klinikai vizsgálatok menetét tükrözve a diagnózis után C5-gátló kezelés (eculizumab vagy ravulizumab) javasolt. Sok ország egészségügyi biztosítója az csak eculizumabot engedélyezi első vonalban, amit elfogadhatónak tartunk.**

3. Szuboptimális válasz (Hgb <100, tünetes PNH, pl. hasi fájdalom vagy súlyos fáradékonyság; esetleg C5-gátlás mellett föllépő TE esemény [igen ritka]) esetén javasoljuk C3-gátló pegcetacoplanra váltani. Ez akkor is javasolt, ha az extravaszkuláris hemolízis előtérben áll C5-gátlás mellett. Hgb 100-120 között egyéni mérlegelés szükséges.
4. Tekintettel a PNH ritka előfordulására és az ebből származó információhiányra, minden szokatlan helyzetben (pl. BTH) javasoljuk a beteget klinikai vizsgálatba jelölni, amennyiben van szóba jöhető klinikai vizsgálat az ellátóhelyen.
5. PK-BTH esetében javasolt eculizumabról ravulizumabra váltani annak sokkal hosszabb féléletideje miatt.
6. PD-BTH nem ok gyógyszerváltásra – a kiváltó okot kell kezelni.
7. Amennyiben eculizumab-rezisztenciát okozó C5 polimorfizmust találunk egy betegnél (ezt elsősorban Japánban írták eddig le), akkor C3-gátló pegcetacoplanra állítsuk a beteget.

Visszatérve a trombózishajlamra, a komplementgátlás különböző fent részletezett formái ugyan tüneti kezelésnek számítanak, hiszen az alapfolyamatra nincsenek hatással, de a PNH legveszélyesebb szövődményének, a tromboembóliás komplikációknak veszélyét lényegesen csökkentik,<sup>406</sup> illetve a hemolízis megfékezésével párhuzamosan fel is függesztik. Mivel a TE események képezték a PNH mortalitásának legfőbb okát, ezáltal a betegek várható élettartama (csakúgy mint életminősége) nagyon lényegesen javult.<sup>407</sup>

A jelenleg kipróbálás alatt álló gyógyszerek várhatóan még tovább fogják növelni a PNH kezelésének lehetőségeit, ami feltétlenül e betegség további enyhítéséhez, de egyúttal a kezelési algoritmusok egyre komplexebbé válásához fog vezetni.



## A rituximab a folyamatos plazmaferézis mellett is a keringő CD20<sup>+</sup> T- és B-sejtek korai eltávolításához vezet<sup>408</sup>

A TTP a mikrovaszkulátúra trombotikus folyamata, amely a PNH-hoz hasonlóan Coombs-negatív hemolitikus anémiát és trombocitopéniát okoz. Azonban a betegség klinikuma és patogeneze is lényegesen eltér a PNH-tól. Ebben a fejezetben az autoimmun TTP (iTTP) kezelésével kapcsolatos kutatómunkánkat mutatom be.

A bevezetőben részletezett háttér értelmében számos adat támasztja alá a rituximab előnyös hatását az iTTP kezelésében.<sup>122-125</sup> Az egyidejűleg adott TPEX nyilvánvaló hatással van a rituximab felezési idejére, ám ennek részletei továbbra is vita tárgyát képezik.<sup>126,409,410</sup> Bár a rituximab feltehetően elsősorban azokat a CD20<sup>+</sup> B-sejteket célozza meg, amelyek az

### 47. TÁBLÁZAT. A három beteg (P1-3) klinikai adatai

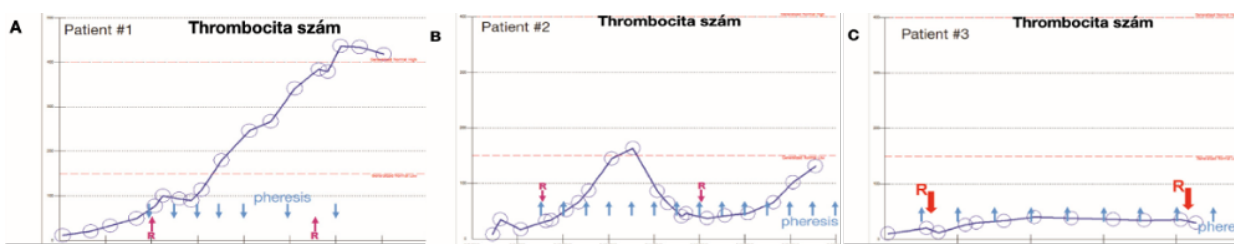
Anamnézis	Felvételi laboerek	ADAMTS13	Elsővonal kezelés	Kimenetel
<b>P1</b> 54 é nő; TTP x 21 é, sok relapszus; az utolsó 8 éve jelen felvétel előtt. Jobb kar hematóma miatt jelentkezett. Korábbi kezelések: TPEX, szteroid, rituximab, vincristin.	Hgb: 84, Thr: 11, Cr: 159, TBili: 10,3; LDH: 456, Haptog: <0,7. ARC: 100 E Kenet: rengeteg fragmentocita/HPF	Aktivitás: 5% Inhibitor: >8 IU	1. Prednisone 1 mg/kg, 10 napig, utána csökkentés 2. TPEX x 12 (10 napig naponta, utána ritkítva 3. Rituximab 375 mg/m <sup>2</sup> hetente (a kórházban kétszer)	Thr normalizálódott a 8. napon. Utána is stabil maradt – a beteget a 15. napon hazaengedtük a kórházból
<b>P2</b> 57 é nő; metasztatikus melanoma, ipili+ nivel x4 q3 hetente. Utolsó: 41 nappal a felvétel előtt. Lábai hematomák és szédülés, gyengeség miatt jelentkezett. Lázatlan, más tünet nincs.	Hgb: 72; Thr: 8; Cr: 75, TBili: 61,6 (d: 11); LDH: 1562 Haptog: <0,7; ARC: 250 E Kenet: rengeteg fragmentocita/HPF	Aktivitás: <5% Inhibitor: 0,7 (IgG titer 68)  Az ismétléseknél az aktivitás 2 hét alatt 11%-ra emelkedett, majd 2 hónap elteltével (normál Thr mellett) újra 5% alá csökkent.	1. Sztteroid lökés (metilprednisolon). 2. TPEX, naponta a 2. naptól a 8. napig, amikor napi 2s TPEX-re emeltük. A 10. naptól napi 1x 1,5 plazmacsere térfogattal folytattuk a 25. napig. 3. Rituximab 375 m/m <sup>2</sup> hetente x4.	Thr normalizálódott a 6. napon (163), de utána fluktuált, majd 3 hét után stabilan normál maradt. A beteget a 25. napon hazaengedtük, de végül 154. napon elhunyt a melanoma progresszió és relabált iTTP miatt.
<b>P3</b> 25 é nő; metaszt. anaplaszt. ependymoma x 6 é. XRT több alkalommal; jelenleg temozolomid x 12 hónap. Hőemelkedés, kután hematóma x 3 nap miatt jelentkezett.	Hgb: 63; Thr: 6; Cr: 101, Tbili: 95,8 (d: 12); LDH: 1132 Haptog: <0,7; ARC: 120 E Kenet: rengeteg fragmentocita/HPF	Aktivitás: <5% Inhibitor: 2,4 IU  Az ismétléseknél az aktivitás egy hónap alatt 87%-ra emelkedett	1. Prednisone, 1 mg/kg x 3 hét, utána csökkentés. 2. TPEX naponta, majd napi 2x a 13.-19. napokon, majd naponta a 36. napig. 3. Rituximab 375 mg/m <sup>2</sup> , x 4 dózis, hetente. 4. bortezomib, 1 mg/m <sup>2</sup> , sc. a 13., 16. és 20. napon	Thr: 6 volt a hazabocsátáskor (40. nap). Semmi nem utalt ekkor fennálló iTTP-re. A csontvelő-elégtelenséget a malignitás és a beteg romló általános állapota következményének tartottuk. Csontvelő (39. nap): nem diagnosztikus.

A laborok egységei: Hemoglobin (Hgb): g/l; Trombocita (Thr): x10<sup>9</sup>/l; Creatinine (Cr): µmol/L; Össz bilirubin (TBili): µmol/L; Haptoglobulin (Haptog): µmol/L; Abszolút retikulocita szám (ARC): / µL; HPF: látótér 100x nagyítással. XRT: sugárkezelés.

autoimmun folyamatért felelős antitesteket termelő plazmasejtek következő generációjává válnának, a rituximab keringő CD20<sup>+</sup> T-sejtekre gyakorolt hatásáról iTTP-ben még nem számoltak be. Fontos megjegyezni, hogy bár funkciójuk kérdéses, a CD20<sup>+</sup> T-sejtek jelenlétét leírták már egészséges személyeknél, és autoimmun betegségekben szenvedő betegeknél is, és

ismert, hogy autoimmun betegségekben szenvedő betegeknél e CD20<sup>+</sup> T-sejtek citokineket expresszálnak és infiltrálják a nyirokszöveteket<sup>117,411-414</sup>

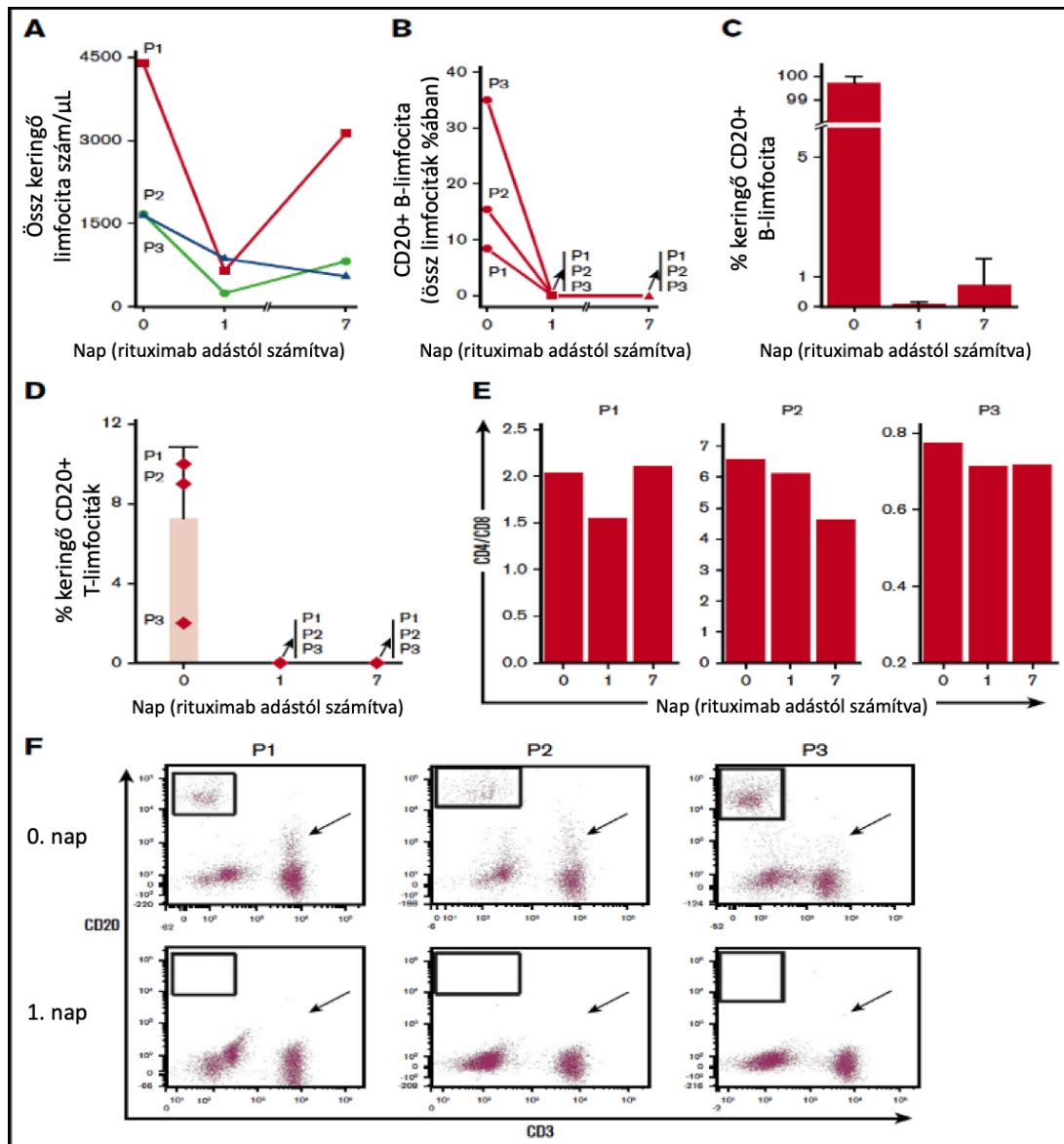
Ebben a prospektív vizsgálatban a rituximabot folyamatos, megszakítás nélkül minden nap alkalmazott TPEX mellett adtuk, három egymást követő felnőtt betegnek, akiknél iTTP-t diagnosztizáltunk, mindegyiküknél egyedi klinikai képpel.<sup>415</sup> A rituximab adásától nem észleltünk jelentős mellékhatást, és e vizsgálat során azt találtuk, hogy a rituximab gyorsan és sikeresen eliminálja a keringő CD20<sup>+</sup> B-sejteket és a T-sejtek CD20<sup>+</sup> szubpopulációját is, a rituximab dózist követő 24 órán belül, amely hatás legalább egy hétig fennmarad a megszakítás nélkül naponta folytatott TPEX ellenére. Ez jó hír a kezelőorvosok számára, hiszen a rituximab



**51. ÁBRA.** *A trombocitaszám* alakulása az időben a három betegnél (A, B, C panelek). A piros nyilak a rituximab (R) a kék nyilak a plazmaferézis időpontjait mutatják. Az időtengely osztásai 2 napos intervallumot képviselnek.

korai adásának ellenérve szokott lenni, hogy a TPEX eltávolítja az antitesteket, így az egyik kezelés hatástalanítja a másikat – jelen vizsgálatunk azt bizonyítja, hogy ettől nem kell tartani.

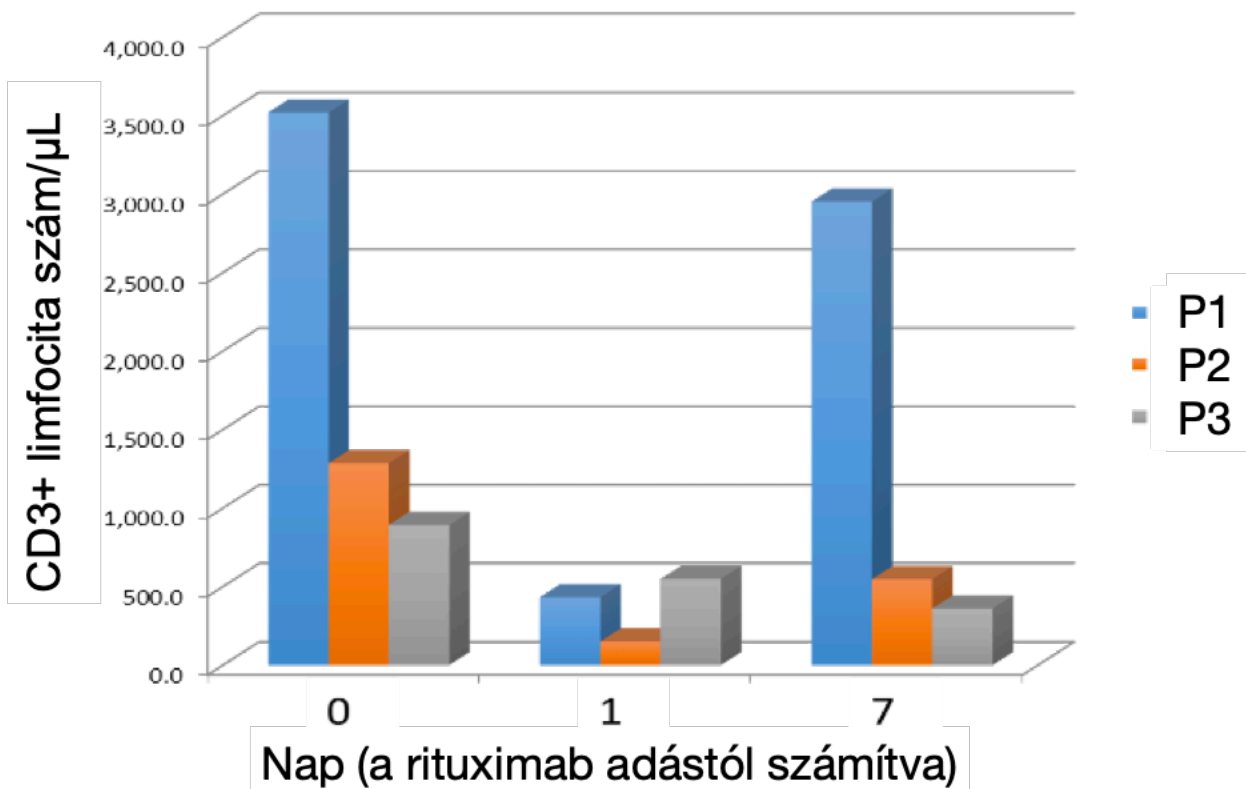
A betegek jellemzőit az **47. táblázat** tartalmazza. A trombocitaszámok időbeli alakulását a **51. ábra** mutatja. Röviden, az 1. beteg (*P1*) ismert, relabáló iTTP-ben szenvedett, anamnézisében számos relapsussal. A laboratóriumi eredmények és a perifériás kenet megfeleltek az újra relabált iTTP-nek. A beteg TPEX-, szteroid- és rituximab-kezeléssel két hét alatt teljes remisszióba került. A 2. beteg (*P2*) metasztatikus melanóma miatt állt gondozás alatt, és ezért ipilimumab/nivolumab *checkpoint-inhibitor* immunterápiával kezelték. Az utolsó ciklust 41 nappal a felvétele előtt kapta. Felvételekor iTTP-t diagnosztizáltunk, amelyet a laboratóriumi eredmények és a perifériás kenetek egyaránt alátámasztottak (**47. táblázat**). Bár a beteg kezdetben reagált a terápiára, sajnos a 6. nap után refrakter lett. 22 napon át adott TPEX, szteroid és rituximab alkalmazásával sikerült ugyan egy második részleges választ elérni, azonban az



**52. ÁBRA. Rituximab hatása a keringő CD20+ B- és T-limfociták számára** folyamatos TPEx mellett. (A) A keringő össz-limfocitaszám; (B) A keringő CD20+ B-limfociták száma; (C) A CD20 mindhárom betegnél (P1, P2, P3) expresszálódik a legtöbb keringő B-limfocitán a diagnóziskor. A rituximab 24 órán belül eltávolítja a valamennyi CD20+ B-limfocitát. A CD20+ B-limfociták helyreállítása a 7. npra betegfüggő, a 3. betegnél (P3) van a legtöbb keringő sejt. (D) A 3 beteg CD20+ T-limfocitáinak száma rituximab után; (E) A CD4/CD8 (F) Az áramlási citometriás ábrák azt mutatják, hogy a CD20+ B-sejtek minden betegnél eliminálódtak (doboz) a rituximab-kezelést követően a 0. és az 1. nap között. A CD20+ T-sejtek (nyilak) száma is drámaian csökkent.

ADAMTS13 aktivitás soha nem normalizálódott, és a beteg végül a diagnózistól számított 154. napon elhunyt a melanoma progressziója és az iTTP szövődményei miatt. A 3. beteg (P3) áttétes ependymoma miatt részesült palliatív temozolomid-kezelésben. Felvételekor az iTTP diagnózisát a laboratóriumi eredmények és perifériás kenet egyaránt alátámasztották. Bár az alkalmazott szteroid, rituximab és TPEx kezelésre ADAMTS13 aktivitás szintje kezdetben javult, a trombocitaszám nem normalizálódott teljesen a 4 hétig folytatott kombinált kezelés ellenére sem. Ezért bortezomibot is adtunk a kombinációhoz – lényeges klinikai benefit nélkül.

A rituximab első adagja után csökkent az összlímocitaszám (**52. A ábra**). A CD20<sup>+</sup> B-límociták az összes limfociták 8-35%-át tették ki, és a legtöbb keringő B-sejt CD20<sup>+</sup> volt (**52. ábra, B-C panelek**). A rituximab minden beteg esetében 24 órán belül lényegében az összes keringő CD20<sup>+</sup> B-sejtet eliminálta, a minden nap alkalmazott TPEx ellenére. Ebből azt a tanulságot lehet levonni, hogy a rituximab hatékony része gyorsan kapcsolódik a célsejtekhez, és a plazmaferézis nem távolítja el. A CD20<sup>+</sup> B-sejtek egy héttel később, a következő rituximab dózissnál is szinte teljesen hiányoztak. A rituximab a T-sejtek CD20<sup>+</sup> szubpopulációját is



**53. ÁBRA.** Az **össz T-sejtek számának alakulása** az időben rituximab adás után. A három beteg (P1-P3) adatait a rituximab dózis előtt, majd az első és 7. napon mutatjuk.

eliminálta mindhárom betegnél. A CD4/CD8 arány egyidejűleg csökkent a 0. napról az 1. napra (**52. ábra, D-F panel**), ami a CD4<sup>+</sup> T-sejtek preferenciális eliminációjára utal. Az összes T-sejt csökkenése nagyobb volt, mint ami csak a CD20<sup>+</sup> T-sejtek eliminációjából várható, hiszen a CD20<sup>+</sup> T-sejtek az összes keringő T-sejt kis hányadát tették ki, viszont a T-sejtek száma ennél lényegesen nagyobb mértékben, átlagosan 71,4%-kal (38,5-88,3%) esett az 1. napon (**53. ábra**). A CD3<sup>+</sup>20<sup>+</sup> csökkentés egy héttel később is fennállt, amikor a betegek folytatták a TPExet. A legkevésbé reagáló beteg (**P3**) rendelkezett a legkevesebb CD20<sup>+</sup> T-sejttel, míg a legjobban reagáló beteg (**P1**) esetében volt a legmagasabb a keringő CD20<sup>+</sup> T-sejtek száma.

Ebben a prospektív vizsgálatban igazoltuk, hogy a rituximab biztonságosan adható a betegeknek TPEX után, és hogy gyorsan és hatékonyan csökkenti a CD20<sup>+</sup> limfocitákat iTTP-ben szenvedő betegeknél. Ez az első olyan vizsgálat, amely prospektív módon bizonyítja, hogy a CD20<sup>+</sup> B-sejtek a rituximabot követően 24 órán belül eltűnnek az iTTP-ben szenvedő betegek keringéséből a folyamatos, naponta történő TPEX ellenére. Azt is elsőként demonstráltuk, hogy a CD20<sup>+</sup> T-sejtek jelen vannak az iTTP-ben szenvedő betegek perifériás vérében, és hogy ezek a sejtek is hasonló kinetikával eliminálódnak a rituximab kezelés következtében. A CD20<sup>+</sup> T-sejtek képesek infiltrálni a primer és szekunder limfoid szöveteket is, és citokineket, köztük interferon  $\gamma$ -t, tumor nekrozis faktor  $\alpha$ -t, interleukin 4-et és interleukin 17-et termelnek. E sejtek poliklonális T-sejt-populációként ismertek, nagyrészt CD8<sup>+</sup> és CD45RO<sup>+</sup> memória T-sejteket tartalmaznak, proinflammatorikus helper 1-es típusú/citotoxikus T-sejt fenotípussal és autoantigénekre nagy proliferatív kapacitással.<sup>117,411,414,416</sup> Érdekes módon eredményeink arra utalnak, hogy a CD4<sup>+</sup> T-sejtek is szerepet játszhatnak a rituximab-válaszban az iTTP kezelése során. A keringő CD4/CD8 arány rituximab kezelés utáni csökkenésével az elveszett T-sejtek egy része B-sejt-függő follikuláris helper CD4<sup>+</sup> T-sejt lehetett, amelyek feltételezett szerepet játszanak az autoimmun betegségekben.<sup>417</sup> Az iTTP-ben szenvedő betegek keringésében található CD20<sup>+</sup> T-sejtek, továbbá más autoimmun betegségekben található CD20<sup>+</sup> T-sejtek<sup>414</sup> együtt szintén alátámasztják, hogy ezek a T-sejtek szerepet játszhatnak az iTTP patogenezisében. Továbbá az újabban közölt adatok arra utalnak, hogy a kettős T- és B-sejt markerekkel rendelkező limfociták nem illeszkednek az adaptív immunitás korábban kialakított abszolút kompartmentalizációjának paradigmájához, és akár az autoimmunitás fontos mozgatórugói lehetnek.<sup>418</sup> A CD20<sup>+</sup> T-limfociták általunk is észlelt jelenléte szintén ebbe az irányba mutat. Továbbá, megfigyeléseink megerősítik, hogy a malignus betegségek kezelése során alkalmazott *check-point* blokádnál típusú immunterápiák életveszélyes autoimmun hematológiai állapotokat, köztük iTTP-t is kiválthatnak.<sup>419,420</sup> További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy a CD20<sup>+</sup> T-sejtek milyen szerepet játszanak az iTTP patofiziológiájában, és hogy eredményeink megismételhetők-e a rituximab adagolásának és/vagy beadási gyakoriságának más módzataival (pl. kisdózisú adagolással) is.

## ÖSSZEFOGLALÁS, ZÁRSZÓ

Disszertációmban összefoglaltam a hemosztázis különböző területein az elmúlt negyedszázad során végzett kutatásaimat. E kutatások jelentős része a von Willebrand betegséggel foglalkozott, de az élet úgy hozta, hogy a vérzékenység és trombózishajlam más területein is vizsgálódhattam. Minden kutatómunka sikerek és kudarcok sorozata – hullámvölgyek és csúcsok váltogatják egymást. Zárásként a csúcsokat veszem végig érintőlegesen.

A súlyos 1-es típusú VWB patogenezisének elemzése során a mutáns és a dimerizáció révén hozzákapcsolódott normál heterodimer alegységek intracelluláris lebontásában olyan általános mechanizmust sikerült igazolni, amely túlmutat a vérzékenység megértésén: hasonló domináns negatív mechanizmus állhat más oligomer szerkezetű fehérjék kvantitatív deficienciájának hátterében is.

Különösen tanulságos volt a Vicenza variáns vizsgálata. Ritka, hogy „*in silico*” modellezéssel sikerül megérteni egy évtizedek óta rejtélyesnek tartott fenotípus létrejöttének mechanizmusát. E kísérletek tanulságát – a clearance és hasítás egyensúlyi helyzetének fontosságát a plazma VWF multimer eloszlás kialakításában – azóta az egész von Willebrand betegséget vizsgáló nemzetközi közösség magáévá tette, és szinte „tankönyvi evidencia” lett belőle.

Magyar kutató számára különösen fontos, de az egyetemes VWF ismeretekhez is lényeges információkkal járult hozzá a magyarországi 3-as típusú von Willebrand kór egész országra kiterjedő genetikus jellemzése. Ez a vizsgálat váratlan eredményt hozott: a más populációkban nem észlelt delExon1-3 nagyméretű deléció (a „magyar 3-as típusú mutáció”) 25%-os allélfrekvenciával az egyik leggyakoribb ismétlődő mutáció az irodalomban. A vizsgálat további váratlan eredménye, hogy megdöntötte azt a korábban dogmaszerűen vallott nézetet, hogy a nagy deléciók homozigóta formában mindig alloimmunizációhoz vezetnek (hiszen a Magyarországon azonosított öt homozigóta beteg közül senkinél nem jelentkezett alloimmunizáció a gyakori faktorpótlások ellenére sem). Talán beválogatási hiba (*selection bias*) okozhatta a korábbi vizsgálatokban e súlyos szövődmény gyakoriságának túlértékelését.

A vérzékenység egy másik ritka formájában, a szerzett inhibitoros hemofiliában végzett kutatás során is ránk mosolygott Fortuna: a több mint tíz éve bevezetett kombinált immunszuppressziós kezelési sémánkról (CyDRi) kiderült a retrospektív elemzés során, hogy minden eddig

alkalmazott immunterápiánál hatékonyabb és biztonságosabb – jelenleg ezt tekintjük a kezelés standardjának.

Végül az autoimmun iTTP kezelésében is lényeges előrelépést jelentett, hogy kiderítettük: a naponta alkalmazott plazmaferezis nem teszi hatástalanná a korai szakban adott rituximab kezelést, így nem kell tartani annak adásától – a rituximabról már korábban kimutatták, hogy lényegesen csökkenti a relapsusrátát ebben a súlyos betegségben.

Hogy mindez lehetségessé vált, elsősorban annak köszönhetem, hogy már gimnazista koromban szívhattam a Piarista Gimnázium szellemi műhelyének légkörét, majd a Semmelweis Egyetemen Péterfy Miklós és Gergely Péter tanítványa lehettem, később az USA-ban betekinhettem a Kolumbia Egyetem kutatói életébe, és végül Evan Sadler mellett elleshettem egy világszínvonalú tudós gondolkodásmódját – mindezért mérhetetlenül hálás vagyok a Gondviselésnek.

Vörösmarty idézettel kezdtem e disszertációt, illő, hogy azzal is fejezzem be:

*„Köszönjük, élet, áldomásodat!  
Ez jó mulatság, férfi munka volt!”*

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A fentiekből jól látható, hogy rengeteg embernek tartozom hálával azért, hogy ez a munka létrejöhetett. Köszönettel tartozom tanárainknak, elsősorban Péterfy Miklósnak, aki a hematológiát és hemosztazeológiát megszerettette velem, és akinek lényeglátása és szigorú természettudományos becsületessége mindvégig példa volt számomra. Sokat tanultam a III. Belklinika többi hematológusától is, különösen Fekete Sándortól és Benedek Szabolcstól. Köszönöm továbbá Gergely Péternek, hogy mindvégig segített; kezdő orvosként tőle is sokat tanultam, és az USA-ból való hazatérésem után ő tette lehetővé a hemosztázis laboratórium elindítását. Végül rengeteget köszönhetek Falus András támogatásának, akinek PhD programjához csatlakozhattam, először mint hallgató, később mint témavezető.

Mérhetetlen hálával tartozom Evan Sadlernek, akinek laboratóriumában dolgozhattam. Ő vezetett be a von Willebrand faktor biológiájába, és tőle a legmagasabb színvonalú kutatói gondolkodásmódot lehetett tanulni. Igen hálás vagyok Hanna J Khourynak és Sagar Lonialnak, hogy az Emory Egyetemen töltött idő alatt lelkesen támogattak, és segítették kutatásaim folytatását a betegellátás mellett.

Köszönöm a folyamatos támogatást Masszi Tamásnak, aki két intézetben is főnököm volt, és egyúttal köszönöm mindkét osztály, a Szent László Kórház Hematológiai és Óssejt-transzplantációs Osztálya, valamint a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika összes orvosának és nővérének, hogy olyan légkörben dolgozhatunk, amelyben a tudományos gondolkodás megfér a betegellátás napi gondjaival és nem sérti a derűs kollegiális kapcsolatokat. Azóta mindkét osztály más nevet visel, de a hála változatlan.

Köszönöm a Hemosztázis Laboratórium minden korábbi és jelenlegi dolgozójának és asszisztenseinek, de különösen Nagy Eszternek, Vilimi Beátának, és Horváth Róbertnek, hogy áldozatos munkájukkal lehetővé tették és tették a laboratórium színvonalas működését. Ki szeretném emelni PhD hallgatóimat, Mohl Adrienn, Sallai Krisztát, Szederjesi Attilát, akiknek fiatalos lendülete és kreativitása nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.

Végül végtelen hálával tartozom családomnak, feleségemnek, Németh Csillának és lányaimnak, Kingának és Csengének, valamint hét unokánknak, hogy mindvégig támogattak, lehetővé tették, hogy nyugodt körülmények között dolgozhassam, sokszor a családtól rabolva el az időt.



## IRODALOMJEGYZÉK

1. Debureaux PE, Kulasekararaj AG, Cacace F, et al. Categorizing hematological response to eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a multicenter real-life study. *Bone Marrow Transplant.* 2021;56(10):2600-2602.
2. Knoebl P, Marco P, Baudo F, et al. Demographic and clinical data in acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia Registry (EACH2). *J Thromb Haemost.* 2012;10(4):622-631.
3. Collins P, Baudo F, Knoebl P, et al. Immunosuppression for acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia Registry (EACH2). *Blood.* 2012;120(1):47-55.
4. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost.* 2006;4(10):2103-2114.
5. Coppola A, Favaloro EJ, Tufano A, Di Minno MN, Cerbone AM, Franchini M. Acquired inhibitors of coagulation factors: part I-acquired hemophilia A. *Semin Thromb Hemost.* 2012;38(5):433-446.
6. Chen ZY, Hendriks RW, Jobling MA, et al. Isolation and characterization of a candidate gene for Norrie disease. *Nat Genet.* 1992;1(3):204-208.
7. Tiede A, Klamroth R, Scharf RE, et al. Prognostic factors for remission of and survival in acquired hemophilia A (AHA): results from the GTH-AH 01/2010 study. *Blood.* 2015;125(7):1091-1097.
8. Holstein K, Liu X, Smith A, et al. Bleeding and response to hemostatic therapy in acquired hemophilia A: results from the GTH-AH 01/2010 study. *Blood.* 2020;136(3):279-287.
9. Eckhardt AE, Timpte CS, DeLuca AW, Hill RL. The complete cDNA sequence and structural polymorphism of the polypeptide chain of porcine submaxillary mucin. *J Biol Chem.* 1997;272(52):33204-33210.
10. Collins PW, Hirsch S, Baglin TP, et al. Acquired hemophilia A in the United Kingdom: a 2-year national surveillance study by the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. *Blood.* 2007;109(5):1870-1877.
11. Berber E, James PD, Hough C, Lillicrap D. An assessment of the pathogenic significance of the R924Q von Willebrand factor substitution. *J Thromb Haemost.* 2009;7(10):1672-1679.
12. Mingot-Castellano ME, Pardos-Gea J, Haya S, et al. Management of acquired hemophilia A: results from the Spanish registry. *Blood Adv.* 2021;5(19):3821-3829.
13. Sun B, Xue F, Feng Y, et al. Outcome of CARE: a 6-year national registry of acquired haemophilia A in China. *Br J Haematol.* 2019;187(5):653-665.
14. 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 Jan;83(1):107-113.
15. Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs N, Vandecasteele G, Vauterin S, Deckmyn H. A Reliable von Willebrand factor: ristocetin cofactor enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate between type 1 and type 2 von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost.* 2002;28(2):161-166.
16. Vanhoorelbeke K, Pareyn I, Schlammadinger A, et al. Plasma glycolaldehyde as a source of GPIIb/IIIa in the von Willebrand factor ristocetin cofactor ELISA. *Thromb Haemost.* 2005;93(1):165-171.

17. Federici AB, Canciani MT, Forza I, et al. A sensitive ristocetin co-factor activity assay with recombinant glycoprotein Ibalpha for the diagnosis of patients with low von Willebrand factor levels. *Haematologica*. 2004;89(1):77-85.
18. Schneppenheim R, Obser T, Budde U, Patzke J. Development of a new functional assay for von Willebrand factor binding to platelet GPIIb/IIIa that does not require Ristocetin. *Hamostaseologie*. 2010;30(A28):FC4-05.
19. Toretto A, Rodeghiero F, Castaman G, et al. A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J Thromb Haemost*. 2006;4(4):766-773.
20. Hickson N, Hampshire D, Winship P, et al. von Willebrand factor variant p.Arg924Gln marks an allele associated with reduced von Willebrand factor and factor VIII levels. *J Thromb Haemost*. 2010;8(9):1986-1993.
21. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*. 1987;40(5):373-383.
22. Flood VH, Friedman KD, Gill JC, et al. No increase in bleeding identified in type 1 VWD subjects with D1472H sequence variation. *Blood*. 2013;121(18):3742-3744.
23. Lesuffleur T, Roche F, Hill AS, et al. Characterization of a mucin cDNA clone isolated from HT-29 mucus-secreting cells. The 3' end of MUC5AC? *J Biol Chem*. 1995;270(23):13665-13673.
24. Flood VH, Friedman KD, Gill JC, et al. Limitations of the ristocetin cofactor assay in measurement of von Willebrand factor function. *J Thromb Haemost*. 2009;7(11):1832-1839.
25. Flood VH, Gill JC, Morateck PA, et al. Gain-of-function GPIIb ELISA assay for VWF activity in the Zimmerman Program for the Molecular and Clinical Biology of VWD. *Blood*. 2011;117(6):e67-74.
26. de Maistre E, Volot F, Mourey G, et al. Performance of two new automated assays for measuring von Willebrand activity: HemosIL AcuStar and Innovance. *Thromb Haemost*. 2014;112(4):825-830.
27. Patzke J, Budde U, Huber A, et al. Performance evaluation and multicentre study of a von Willebrand factor activity assay based on GPIIb binding in the absence of ristocetin. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2014;25(8):860-870.
28. Geisen U, Zieger B, Nakamura L, et al. Comparison of Von Willebrand factor (VWF) activity VWF:Ac with VWF ristocetin cofactor activity VWF:RCo. *Thromb Res*. 2014;134(2):246-250.
29. Graf L, Moffat KA, Carlino SA, et al. Evaluation of an automated method for measuring von Willebrand factor activity in clinical samples without ristocetin. *Int J Lab Hematol*. 2014;36(3):341-351.
30. Patzke J, Muth H, Wilkens M, Schneppenheim R. Performance of a new automated von Willebrand factor activity assay based in GPIIb binding. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011;9(Suppl. 2):671 Abstract P-WE-479.
31. Lawrie AS, Stufano F, Canciani MT, Mackie IJ, Machin SJ, Peyvandi F. A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity. *Haemophilia*. 2013;19(2):338-342.
32. Favaloro EJ, Mohammed S. Towards improved diagnosis of von Willebrand disease: comparative evaluations of several automated von Willebrand factor antigen and activity assays. *Thromb Res*. 2014;134(6):1292-1300.
33. Zhao Y, Gu Y, Ji S, Yang J, Yu Z, Ruan C. Development of an ELISA method for testing VWF ristocetin cofactor activity with improved sensitivity and reliability in the diagnosis of von Willebrand disease. *Eur J Haematol*. 2012;88(5):439-445.

34. Stufano F, Lawrie AS, La Marca S, Berbenni C, Baronciani L, Peyvandi F. A two-centre comparative evaluation of new automated assays for von Willebrand factor ristocetin cofactor activity and antigen. *Haemophilia*. 2014;20(1):147-153.
35. Pinol M, Sanchez T, Sales M, Vanrusselt M, Arnout J. New automated ristocetin cofactor activity assay to distinguish type 1 and type 2 von Willebrand disease (VWD). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;7(Suppl. 2):Abstract PP-Th-635.
36. Tous J, Barry RG, Arnout J, Vanrusselt M, Pascual Z. New automated chemiluminescent VWF:Ag and VWF:RCo assays: preliminary analytical and clinical performance. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;7(Suppl. 2):Abstract PP-TH-625.
37. Cabrera N, Moret A, Caunedo P, et al. Comparison of a new chemiluminescent immunoassay for von Willebrand factor activity with the ristocetin cofactor-induced platelet agglutination method. *Haemophilia*. 2013;19(6):920-925.
38. Mohl A, Boda Z, Jager R, et al. Common large partial VWF gene deletion does not cause alloantibody formation in the Hungarian type 3 von Willebrand disease population. *J Thromb Haemost*. 2011;9(5):945-952.
39. Schlunegger MP, Grutter MG. Refined crystal structure of human transforming growth factor beta 2 at 1.95 Å resolution. *J Mol Biol*. 1993;231(2):445-458.
40. von Willebrand EA. *Fin Laekaresaellsk Hand*. 1926;68:87-112.
41. Von Willebrand EA. Hereditary pseudo-haemophilia. *Haemophilia*. 1999;5(3):223-231; discussion 222.
42. Zimmerman TS, Ratnoff OD, Powell AE. Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor 8 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(1):244-254.
43. Titani K, Kumar S, Takio K, et al. Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry*. 1986;25(11):3171-3184.
44. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, et al. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 1989;264(33):19514-19527.
45. Zhang ZP, Blomback M, Nyman D, Anvret M. Mutations of von Willebrand factor gene in families with von Willebrand disease in the Åland Islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(17):7937-7940.
46. Marti T, Rosselet SJ, Titani K, Walsh KA. Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry*. 1987;26(25):8099-8109.
47. Voorberg J, Fontijn R, Calafat J, Janssen H, van Mourik JA, Pannekoek H. Assembly and routing of von Willebrand factor variants: the requirements for disulfide-linked dimerization reside within the carboxy-terminal 151 amino acids. *Journal of Cell Biology*. 1991;113(1):195-205.
48. McDonald NQ, Hendrickson WA. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell*. 1993;73(3):421-424.
49. Dang LT, Purvis AR, Huang RH, Westfield LA, Sadler JE. Phylogenetic and functional analysis of histidine residues essential for pH-dependent multimerization of von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 2011;286(29):25763-25769.
50. Fujimura Y, Titani K, Holland LZ, et al. von Willebrand factor. a reduced and alkylated 52/48-kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *Journal of Biological Chemistry*. 1986;261(1):381-385.
51. Dong Z, Thoma RS, Crimmins DL, McCourt DW, Tuley EA, Sadler JE. Disulfide bonds required to assemble functional von Willebrand factor multimers. *J Biol Chem*. 1994;269(9):6753-6758.

52. Katsumi A, Tuley EA, Bodó I, Sadler JE. Localization of disulfide bonds in the cystine knot domain of human von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 2000 Aug 18;275(33):25585-25594.
53. Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, Voorberg J, Eikenboom J. Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood*. 2011;117(19):5033-5043.
54. Nass J, Terglane J, Gerke V. Weibel Palade Bodies: Unique Secretory Organelles of Endothelial Cells that Control Blood Vessel Homeostasis. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:813995.
55. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:217-246.
56. Mogensen CE. The glomerular permeability determined by dextran clearance using Sephadex gel filtration. *Scand J Clin Lab Invest*. 1968;21(1):77-82.
57. Boon DM, Michiels JJ, Stibbe J, van Vliet HH, Kappers-Klunne MC. Heparin-induced thrombocytopenia and antithrombotic therapy [letter]. *Lancet*. 1994;344(8932):1296.
58. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*. 1996;84(2):289-297.
59. Fressinaud E, Baruch D, Girma JP, Sakariassen KS, Baumgartner HR, Meyer D. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion to collagen involves platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa as well as glycoprotein Ib. *J Lab Clin Med*. 1988;112(1):58-67.
60. Fressinaud E, Girma JP, Sadler JE, Baumgartner HR, Meyer D. Synthetic RGDS-containing peptides of von Willebrand factor inhibit platelet adhesion to collagen. *Thromb Haemost*. 1990;64(4):589-593.
61. Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood*. 1996;88(8):2939-2950.
62. Novak L, Deckmyn H, Damjanovich S, Harsfalvi J. Shear-dependent morphology of von Willebrand factor bound to immobilized collagen. *Blood*. 2002 Mar 15;99(6):2070-2076.
63. Zhang X, Halvorsen K, Zhang CZ, Wong WP, Springer TA. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science*. 2009;324(5932):1330-1334.
64. Ying J, Ling Y, Westfield LA, Sadler JE, Shao JY. Unfolding the A2 domain of von Willebrand factor with the optical trap. *Biophys J*. 2010;98(8):1685-1693.
65. Ruggeri ZM, Zimmerman TS. von Willebrand factor and von Willebrand disease [published erratum appears in *Blood* 1988 Mar;71(3):830]. *Blood*. 1987;70(4):895-904.
66. Sadler JE. A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*. 1994;71(4):520-525.
67. Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, et al. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). *Blood*. 2007;109(1):112-121.
68. Swystun LL, Lillicrap D. Genetic regulation of plasma von Willebrand factor levels in health and disease. *J Thromb Haemost*. 2018;16(12):2375-2390.
69. Enayat MS, Surdhar GK, Theophilus BDM, Williams DM, Hill FGH. A new candidate mutation causing type IID von Willebrand disease in 3 patients in 3 generations of the same family. *Thromb Haemost*. 1997;82(Suppl):P2671.
70. Schneppenheim R, Brassard J, Krey S, et al. Defective dimerization of von Willebrand factor subunits due to a Cys-> Arg mutation in type IID von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(8):3581-3586.

71. Montgomery RR, Jozwiak MA, Hutter JJ, Endres JL, Foster PA, Friedman KD. A homozygous variant of von Willebrand factor (vWF) that fails to C-terminal dimerize resulting in loss of vWF multimers larger than dimer. *Blood*. 1999;94(10, Suppl 1):433A.
72. Schneppenheim R, Budde U, Obser T, et al. Von Willebrand factor dimerization defects cause different types of von Willebrand disease. *Blood*. 1999;94(Suppl 1):453A.
73. Ribba AS, Loisel I, Lavergne JM, et al. 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 Sep;86(3):848-854.
74. Eikenboom JC. Congenital von Willebrand disease type 3: clinical manifestations, pathophysiology and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001;14(2):365-379.
75. Federici AB. Clinical diagnosis of von Willebrand disease. *Haemophilia*. 2004;10 Suppl 4:169-176.
76. Schneppenheim R, Krey S, Bergmann F, et al. Genetic heterogeneity of severe von Willebrand disease type III in the German population. *Hum Genet*. 1994;94(6):640-652.
77. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:395-424.
78. Mannucci PM, Bloom AL, Larrieu MJ, Nilsson IM, West RR. Atherosclerosis and von Willebrand factor. I. Prevalence of severe von Willebrand's disease in western Europe and Israel. *Br J Haematol*. 1984;57(1):163-169.
79. Weiss HJ, Ball AP, Mannucci PM. Incidence of severe von Willebrand's disease. *N Engl J Med*. 1982;307(2):127.
80. Lak M, Peyvandi F, Mannucci PM. Clinical manifestations and complications of childbirth and replacement therapy in 385 Iranian patients with type 3 von Willebrand disease. *Br J Haematol*. 2000;111(4):1236-1239.
81. Mohl A, Marschalek R, Masszi T, et al. An Alu-mediated novel large deletion is the most frequent cause of type 3 von Willebrand disease in Hungary. *J Thromb Haemost*. 2008;6(10):1729-1735.
82. Zhang ZP, Blomback M, Egberg N, Falk G, Anvret M. Characterization of the von Willebrand factor gene (VWF) in von Willebrand disease type III patients from 24 families of Swedish and Finnish origin. *Genomics*. 1994;21(1):188-193.
83. Eikenboom JC, Ploos van Amstel HK, Reitsma PH, Briet E. Mutations in severe, type III von Willebrand's disease in the Dutch population: candidate missense and nonsense mutations associated with reduced levels of von Willebrand factor messenger RNA. *Thromb Haemost*. 1992;68(4):448-454.
84. Eikenboom JC, Castaman G, Vos HL, Bertina RM, Rodeghiero F. Characterization of the genetic defects in recessive type 1 and type 3 von Willebrand disease patients of Italian origin. *Thromb Haemost*. 1998;79(4):709-717.
85. Baronciani L, Cozzi G, Canciani MT, et al. Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients. *Blood Cells Mol Dis*. 2003;30(3):264-270.
86. Schneppenheim R, Castaman G, Federici AB, et al. A common 253-kb deletion involving VWF and TMEM16B in German and Italian patients with severe von Willebrand disease type 3. *J Thromb Haemost*. 2007;5(4):722-728.
87. Sutherland MS, Cumming AM, Bowman M, et al. A novel deletion mutation is recurrent in von Willebrand disease types 1 and 3. *Blood*. 2009;114(5):1091-1098.
88. Gupta PK, Adamtziki E, Budde U, et al. Gene conversions are a common cause of von Willebrand disease. *Br J Haematol*. 2005;130(5):752-758.

89. Xie F, Wang X, Cooper DN, et al. A novel Alu-mediated 61-kb deletion of the von Willebrand factor (VWF) gene whose breakpoints co-locate with putative matrix attachment regions. *Blood Cells Mol Dis*. 2006;36(3):385-391.
90. Mannucci PM, Federici AB. Antibodies to von Willebrand factor in von Willebrand disease. *Adv Exp Med Biol*. 1995;386:87-92.
91. Mannucci PM, Tamaro G, Narchi G, et al. Life-threatening reaction to factor VIII concentrate in a patient with severe von Willebrand disease and alloantibodies to von Willebrand factor. *Eur J Haematol*. 1987;39(5):467-470.
92. Peake IR, Liddell MB, Moodie P, et al. Severe type III von Willebrand's disease caused by deletion of exon 42 of the von Willebrand factor gene: family studies that identify carriers of the condition and a compound heterozygous individual. *Blood*. 1990;75(3):654-661.
93. Shelton-Inloes BB, Chehab FF, Mannucci PM, Federici AB, Sadler JE. Gene deletions correlate with the development of alloantibodies in von Willebrand disease. *J Clin Invest*. 1987;79(5):1459-1465.
94. Mancuso DJ, Tuley EA, Castillo R, de Bosch N, Mannucci PM, Sadler JE. Characterization of partial gene deletions in type III von Willebrand disease with alloantibody inhibitors. *Thromb Haemost*. 1994;72(2):180-185.
95. Ngo KY, Glotz VT, Koziol JA, et al. Homozygous and heterozygous deletions of the von Willebrand factor gene in patients and carriers of severe von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(8):2753-2757.
96. Lozner EL, Jolliffe LS, Taylor FHL. "About Acquired Hemophilia". *American Journal of Medical Sciences*. 1940;199.
97. Baudo F, de Cataldo F. Acquired hemophilia: a critical bleeding syndrome. *Haematologica*. 2004;89(1):96-100.
98. Green D, Lechner K. A survey of 215 non-hemophilic patients with inhibitors to Factor VIII. *Thromb Haemost*. 1981;45(3):200-203.
99. Franchini M, Lippi G. Acquired factor VIII inhibitors. *Blood*. 2008;112(2):250-255.
100. Delgado J, Jimenez-Yuste V, Hernandez-Navarro F, Villar A. Acquired haemophilia: review and meta-analysis focused on therapy and prognostic factors. *Br J Haematol*. 2003;121(1):21-35.
101. Huth-Kuhne A, Baudo F, Collins P, et al. International recommendations on the diagnosis and treatment of patients with acquired hemophilia A. *Haematologica*. 2009;94(4):566-575.
102. Hay CR, Brown S, Collins PW, Keeling DM, Liesner R. The diagnosis and management of factor VIII and IX inhibitors: a guideline from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organisation. *Br J Haematol*. 2006;133(6):591-605.
103. Tiede A, Collins P, Knoebl P, et al. International recommendations on the diagnosis and treatment of acquired hemophilia A. *Haematologica*. 2020;105(7):1791-1801.
104. Kruse-Jarres R, Kempton CL, Baudo F, et al. Acquired hemophilia A: Updated review of evidence and treatment guidance. *Am J Hematol*. 2017;92(7):695-705.
105. Tiede A, Kemkes-Matthes B, Knobl P. Should emicizumab be used in patients with acquired hemophilia A? *J Thromb Haemost*. 2021;19(3):637-644.
106. Egeberg O. Inherited Antithrombin Deficiency Causing Thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh*. 1965;13:516-530.
107. Franchini M, Veneri D, Salvagno GL, Manzato F, Lippi G. Inherited thrombophilia. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2006;43(3):249-290.
108. Stevens SM, Woller SC, Bauer KA, et al. Guidance for the evaluation and treatment of hereditary and acquired thrombophilia. *J Thromb Thrombolysis*. 2016;41(1):154-164.

109. Bertoletti L, Benhamou Y, Bejot Y, et al. Direct oral anticoagulant use in patients with thrombophilia, antiphospholipid syndrome or venous thrombosis of unusual sites: A narrative review. *Blood Rev.* 2018;32(4):272-279.
110. Pruthi RK. Optimal utilization of thrombophilia testing. *Int J Lab Hematol.* 2017;39 Suppl 1:104-110.
111. Kearon C, Akl EA, Ornelas J, et al. Antithrombotic Therapy for VTE Disease: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest.* 2016;149(2):315-352.
112. guideline NNIHaCE. Venous thromboembolic diseases: diagnosis, management and thrombophilia testing. *NICE.* 2020;NG158.
113. Christiansen SC, Cannegieter SC, Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Thrombophilia, clinical factors, and recurrent venous thrombotic events. *JAMA.* 2005;293(19):2352-2361.
114. Mannucci PM, Franchini M. Classic thrombophilic gene variants. *Thromb Haemost.* 2015;114(5):885-889.
115. Elsebaie MAT, Van Es N, Langston A, Buller HR, Gaddh M. Follow-up to comment on "Direct Oral Anticoagulants in Patients with Venous Thromboembolism and Thrombophilia: Systematic Review and Meta-Analysis". *J Thromb Haemost.* 2019;17(6):1007-1009.
116. Elsebaie MAT, van Es N, Langston A, Buller HR, Gaddh M. Direct oral anticoagulants in patients with venous thromboembolism and thrombophilia: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2019;17(4):645-656.
117. Schuh E, Berer K, Mulazzani M, et al. Features of Human CD3+CD20+ T Cells. *J Immunol.* 2016;197(4):1111-1117.
118. Joly BS, Coppo P, Veyradier A. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2017;129(21):2836-2846.
119. Moake JL, Rudy CK, Troll JH, et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1982;307(23):1432-1435.
120. Sadler JE. Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2017;130(10):1181-1188.
121. George JN. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: 2010. *Blood.* 2010;116(20):4060-4069.
122. Scully M, McDonald V, Cavenagh J, et al. A phase 2 study of the safety and efficacy of rituximab with plasma exchange in acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2011;118(7):1746-1753.
123. Hie M, Gay J, Galicier L, et al. Preemptive rituximab infusions after remission efficiently prevent relapses in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2014;124(2):204-210.
124. Page EE, Kremer Hovinga JA, Terrell DR, Vesely SK, George JN. Rituximab reduces risk for relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2016;127(24):3092-3094.
125. Jestin M, Benhamou Y, Schelpe AS, et al. Preemptive rituximab prevents long-term relapses in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2018;132(20):2143-2153.
126. McDonald V, Manns K, Mackie IJ, Machin SJ, Scully MA. Rituximab pharmacokinetics during the management of acute idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2010;8(6):1201-1208.
127. Bodó I, Katsumi A, Tuley E, Schlamadinger Á, Boda Z, Sadler JE. Mutations causing dominant type 1 von Willebrand disease with high penetrance. *Blood.* 1999;94(Suppl.):373a.

128. Eikenboom J, Van Marion V, Putter H, et al. Linkage analysis in families diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 VWD. *J Thromb Haemost.* 2006;4(4):774-782.
129. Lattuada A, Preda L, Sacchi E, Gallo L, Federici AB, Rossi E. A rapid assay for ristocetin cofactor activity using an automated coagulometer (ACL 9000). *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2004;15(6):505-511.
130. Manuilova E, Schuetzenmeister A, Model F. mcr: Method Comparison Regression. R package version 1.2.1. 2014.
131. Lu MJ, Zhong WH, Liu YX, Miao HZ, Li YC, Ji MH. Sample Size for Assessing Agreement between Two Methods of Measurement by Bland-Altman Method. *Int J Biostat.* 2016;12(2).
132. Kearon C, Ageno W, Cannegieter SC, et al. Categorization of patients as having provoked or unprovoked venous thromboembolism: guidance from the SSC of ISTH. *J Thromb Haemost.* 2016;14(7):1480-1483.
133. Nakashima MO, Rogers HJ. Hypercoagulable states: an algorithmic approach to laboratory testing and update on monitoring of direct oral anticoagulants. *Blood Res.* 2014;49(2):85-94.
134. Petrilli CM, Heidemann L, Mack M, Durance P, Chopra V. Inpatient inherited thrombophilia testing. *J Hosp Med.* 2016;11(11):801-804.
135. Tientadakul P, Chinthamitr Y, Sanpakit K, Wongwanit C, Nilanont Y. Inappropriate use of protein C, protein S, and antithrombin testing for hereditary thrombophilia screening: an experience from a large university hospital. *Int J Lab Hematol.* 2011;33(6):593-600.
136. Mahajerin A, Obasaju P, Eckert G, Vik TA, Mehta R, Heiny M. Thrombophilia testing in children: a 7 year experience. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(3):523-527.
137. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982;25(11):1271-1277.
138. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.* 1992;35(6):630-640.
139. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemost.* 1995;73(2):247-251.
140. Kraus TS, Sillings CN, Saxe DF, Li S, Jaye DL. The role of CD11c expression in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2010;134(2):271-277.
141. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FRETS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol.* 2005;129(1):93-100.
142. Zheng XL, Kaufman RM, Goodnough LT, Sadler JE. Effect of plasma exchange on plasma ADAMTS13 metalloprotease activity, inhibitor level, and clinical outcome in patients with idiopathic and nonidiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2004;103(11):4043-4049.
143. Eikenboom JC, Matsushita T, Reitsma PH, et al. Dominant type 1 von Willebrand disease caused by mutated cysteine residues in the D3 domain of von Willebrand factor. *Blood.* 1996;88(7):2433-2441.
144. Wagner DD, Saffaripour S, Bonfanti R, et al. Induction of specific storage organelles by von Willebrand factor propolypeptide. *Cell.* 1991;64(2):403-413.
145. DuBridges RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol.* 1987;7(1):379-387.



146. Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol.* 1987;7(8):2745-2752.
147. Matsushita T, Sadler JE. Identification of amino acid residues essential for von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib. Charged-to-alanine scanning mutagenesis of the A1 domain of human von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 1995;270(22):13406-13414.
148. Lyons SE, Bruck ME, Bowie EJ, Ginsburg D. Impaired intracellular transport produced by a subset of type IIA von Willebrand disease mutations. *J Biol Chem.* 1992;267(7):4424-4430.
149. Randi AM, Jorieux S, Tuley EA, Mazurier C, Sadler JE. Recombinant von Willebrand factor Arg578-->Gln. A type IIB von Willebrand disease mutation affects binding to glycoprotein Ib but not to collagen or heparin. *J Biol Chem.* 1992;267(29):21187-21192.
150. Cormack B. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al., eds. *Current Protocols in Molecular Biology.* New York: John Wiley & Sons; 1997:8.5.1– 8.5.10.
151. Kaufman RJ, Davies MV, Wasley LC, Michnick D. Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(16):4485-4490.
152. Raines G, Aumann H, Sykes S, Street A. Multimeric analysis of von Willebrand factor by molecular sieving electrophoresis in sodium dodecyl sulphate agarose gel. *Thromb Res.* 1990;60(3):201-212.
153. Tuley EA, Gaucher C, Jorieux S, Worrall NK, Sadler JE, Mazurier C. Expression of von Willebrand factor "Normandy": an autosomal mutation that mimics hemophilia A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(14):6377-6381.
154. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(259):680-685.
155. Pietu G, Ribba AS, Cherel G, et al. Epitope mapping of inhibitory monoclonal antibodies to human von Willebrand factor by using recombinant cDNA libraries. *Thromb Haemost.* 1994;71(6):788-792.
156. Lyons SE, Cooney KA, Bockenstedt P, Ginsburg D. Characterization of Leu777Pro and Ile865Thr type IIA von Willebrand disease mutations. *Blood.* 1994;83(6):1551-1557.
157. Lu D, Yuan X, Zheng X, Sadler JE. Bovine proenteropeptidase is activated by trypsin, and the specificity of enteropeptidase depends on the heavy chain. *J Biol Chem.* 1997;272(50):31293-31300.
158. Bures EJ, Hui JO, Young Y, et al. Determination of disulfide structure in agouti-related protein (AGRP) by stepwise reduction and alkylation. *Biochemistry.* 1998;37(35):12172-12177.
159. Haniu M, Hui J, Young Y, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor: selective reduction of the intermolecular disulfide linkage and characterization of its disulfide structure. *Biochemistry.* 1996;35(51):16799-16805.
160. Katsumi A, Matsushita T, Yamazaki T, Sugiura I, Kojima T, Saito H. Severe factor VII deficiency caused by a novel mutation His348 to Gln in the catalytic domain. *Thromb Haemost.* 2000;83(2):239-243.
161. Katsumi A, Senda T, Yamashita Y, et al. Protein C Nagoya, an elongated mutant of protein C, is retained within the endoplasmic reticulum and is associated with GRP78 and GRP94. *Blood.* 1996;87(10):4164-4175.
162. Daopin S, Li M, Davies DR. Crystal structure of TGF-beta 2 refined at 1.8 Å resolution. *Proteins.* 1993;17(2):176-192.
163. Kraulis PJ. Similarity of protein G and ubiquitin. *Science.* 1991;254(5031):581-582.

164. Lenting PJ, Westein E, Terraube V, et al. An experimental model to study the in vivo survival of von Willebrand factor. Basic aspects and application to the R1205H mutation. *J Biol Chem.* 2004;279(13):12102-12109.
165. Gézsi A, Mohl A, Sallai K, et al. Modeling VWF catabolism predicts the multimer pattern and subunit degradation in VWD Vicenza, type 1, type 2A, and healthy controls after DDAVP infusion. *J Thromb Haemost.* 2005;3(Suppl. 1.):P1476.
166. Holmberg L, Nilsson IM. von Willebrand's disease. *Eur J Haematol.* 1992;48(3):127-141.
167. Tosetto A, Badiee Z, Baghaipour MR, et al. Bleeding symptoms in patients diagnosed as type 3 von Willebrand disease: Results from 3WINTERS-IPS, an international and collaborative cross-sectional study. *J Thromb Haemost.* 2020;18(9):2145-2154.
168. Pagliari MT, Rosendaal FR, Ahmadinejad M, et al. Von Willebrand factor propeptide and pathophysiological mechanisms in European and Iranian patients with type 3 von Willebrand disease enrolled in the 3WINTERS-IPS study. *J Thromb Haemost.* 2022;20(5):1106-1114.
169. Baronciani L, Peake I, Schneppenheim R, et al. Genotypes of European and Iranian patients with type 3 von Willebrand disease enrolled in 3WINTERS-IPS. *Blood Adv.* 2021;5(15):2987-3001.
170. Pagliari MT, Budde U, Baronciani L, et al. von Willebrand factor neutralizing and non-neutralizing alloantibodies in 213 subjects with type 3 von Willebrand disease enrolled in 3WINTERS-IPS. *J Thromb Haemost.* 2023;21(4):787-799.
171. Wagner DD, Fay PJ, Sporn LA, Sinha S, Lawrence SO, Marder VJ. Divergent fates of von Willebrand factor and its propolypeptide (von Willebrand antigen II) after secretion from endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(7):1955-1959.
172. Nossent AY, VANM, NH VANT, et al. von Willebrand factor and its propeptide: the influence of secretion and clearance on protein levels and the risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2006;4(12):2556-2562.
173. Haberichter SL, Castaman G, Budde U, et al. Identification of type 1 von Willebrand disease patients with reduced von Willebrand factor survival by assay of the VWF propeptide in the European study: molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 VWD (MCMDM-1VWD). *Blood.* 2008;111(10):4979-4985.
174. Schooten CJ, Tjernberg P, Westein E, et al. Cysteine-mutations in von Willebrand factor associated with increased clearance. *J Thromb Haemost.* 2005;3(10):2228-2237.
175. Haberichter SL, Balistreri M, Christopherson P, et al. Assay of the von Willebrand factor (VWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased VWF survival. *Blood.* 2006;108(10):3344-3351.
176. Eikenboom J, Federici AB, Dirven RJ, et al. VWF propeptide and ratios between VWF, VWF propeptide, and FVIII in the characterization of type 1 von Willebrand disease. *Blood.* 2013;121(12):2336-2339.
177. Baronciani L, Cozzi G, Canciani MT, et al. Molecular characterization of a multiethnic group of 21 patients with type 3 von Willebrand disease. *Thromb Haemost.* 2000 Oct;84(4):536-540.
178. Tout H, Obert B, Houllier A, et al. Mapping and functional studies of two alloantibodies developed in patients with type 3 von Willebrand disease. *Thromb Haemost.* 2000;83(2):274-281.
179. Zhang ZP, Lindstedt M, Falk G, Blomback M, Egberg N, Anvret M. Nonsense mutations of the von Willebrand factor gene in patients with von Willebrand disease type III and type I. *Am J Hum Genet.* 1992;51(4):850-858.
180. Elliott B, Richardson C, Jasin M. Chromosomal translocation mechanisms at intronic alu elements in mammalian cells. *Mol Cell.* 2005;17(6):885-894.

181. Norris J FD, Aleman C, Marks JR, Futreal PA, Wiseman RW, Iglehart JD, Deininger PL, McDonnell DP. Identification of a new subclass of Alu DNA repeats which can function as estrogen receptor dependent transcriptional enhancer. *J Biol Chem.* 1995(270):22777-22782.
182. Vansant G RW. The consensus sequence of a major Alu subfamily contains a functional retinoic acid response element. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995(92):8229- 8233.
183. Deininger PL BM. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metabol.* 1999;67:183-193.
184. Rudiger NS, Gregersen N, Kielland-Brandt MC. One short well conserved region of Alu-sequences is involved in human gene rearrangements and has homology with prokaryotic chi. *Nucleic Acids Res.* 1995;23(2):256-260.
185. Ricci V, Regis S, Di Duca M, Filocamo M. An Alu-mediated rearrangement as cause of exon skipping in Hunter disease. *Hum Genet.* 2003;112(4):419-425.
186. Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab.* 1999;67(3):183-193.
187. Cordaux R, Hedges DJ, Herke SW, Batzer MA. Estimating the retrotransposition rate of human Alu elements. *Gene.* 2006;373:134-137.
188. Gazda H, Budde U, Krey S, Rokicka-Milewska R, Schneppenheim R. Delta C in exon 18 of the von Willebrand factor gene is the most common mutation in patients with severe von Willebrand disease type 3 in Poland. *Blood.* 1997;90:3132 Suppl.
189. James PD, Notley C, Hegadorn C, et al. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study. *Blood.* 2007;109(1):145-154.
190. Cumming A, Grundy P, Keeney S, et al. An investigation of the von Willebrand factor genotype in UK patients diagnosed to have type 1 von Willebrand disease. *Thromb Haemost.* 2006;96(5):630-641.
191. Casais P, Carballo GA, Woods AI, et al. R924Q substitution encoded within exon 21 of the von Willebrand factor gene related to mild bleeding phenotype. *Thromb Haemost.* 2006;96(2):228-230.
192. Hilbert L, Jorieux S, Proulle V, et al. Two novel mutations, Q1053H and C1060R, located in the D3 domain of von Willebrand factor, are responsible for decreased FVIII-binding capacity. *Br J Haematol.* 2003 Feb;120(4):627-632.
193. Gaucher C, Dieval J, Mazurier C. Characterization of von Willebrand factor gene defects in two unrelated patients with type IIC von Willebrand disease. *Blood.* 1994;84(4):1024-1030.
194. Michiels JJ, Gadisseur A, van der Planken M, Schroyens W, Berneman Z. Laboratory and molecular characteristics of recessive von Willebrand disease type 2C (2A subtype IIC) of variable severity due to homozygous or double heterozygous mutations in the D1 and D2 domains. *Acta Haematol.* 2009;121(2-3):111-118.
195. Fressinaud E, Mazurier C, Meyer D. Molecular genetics of type 2 von Willebrand disease. *Int J Hematol.* 2002;75(1):9-18.
196. Sadler JE. von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 1991;266(34):22777-22780.
197. Isaacs NW. Cystine knots. *Curr Opin Struct Biol.* 1995;5(3):391-395.
198. Perez-Vilar J, Hill RL. Norrie disease protein (norrin) forms disulfide-linked oligomers associated with the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 1997;272(52):33410-33415.
199. Perez-Vilar J, Hill RL. The carboxyl-terminal 90 residues of porcine submaxillary mucin are sufficient for forming disulfide-bonded dimers. *J Biol Chem.* 1998;273(12):6982-6988.
200. Meitinger T, Meindl A, Bork P, et al. Molecular modelling of the Norrie disease protein predicts a cystine knot growth factor tertiary structure. *Nat Genet.* 1993;5(4):376-380.

201. Perez-Vilar J, Hill RL. The structure and assembly of secreted mucins. *J Biol Chem.* 1999;274(45):31751-31754.
202. Gray WR. Echistatin disulfide bridges: selective reduction and linkage assignment. *Protein Sci.* 1993;2(10):1749-1755.
203. Gray WR. Disulfide structures of highly bridged peptides: a new strategy for analysis. *Protein Sci.* 1993;2(10):1732-1748.
204. Smallwood PM, Williams J, Xu Q, Leahy DJ, Nathans J. Mutational analysis of Norrin-Frizzled4 recognition. *J Biol Chem.* 2007;282(6):4057-4068.
205. Sadler JE. von Willebrand factor assembly and secretion. *J Thromb Haemost.* 2009;7 Suppl 1:24-27.
206. Tamaoki H, Miura R, Kusunoki M, Kyogoku Y, Kobayashi Y, Moroder L. Folding motifs induced and stabilized by distinct cystine frameworks. *Protein Eng.* 1998;11(8):649-659.
207. Zhou YF, Springer TA. Highly reinforced structure of a C-terminal dimerization domain in von Willebrand factor. *Blood.* 2014;123(12):1785-1793.
208. Bodó I, Katsumi A, Tuley EA, Eikenboom JC, Dong Z, Sadler JE. Type 1 von Willebrand disease mutation Cys1149Arg causes intracellular retention and degradation of heterodimers: a possible general mechanism for dominant mutations of oligomeric proteins. *Blood.* 2001;98(10):2973-2979.
209. James PD, Paterson AD, Notley C, et al. Genetic linkage and association analysis in type 1 von Willebrand disease: results from the Canadian type 1 VWD study. *J Thromb Haemost.* 2006;4(4):783-792.
210. 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 2 M Vicenza and the G3864A (R1205H) mutation. *Thromb Haemost.* 2000;84(2):350-351.
211. Ginsburg D, Sadler JE. von Willebrand disease: a database of point mutations, insertions, and deletions. For the Consortium on von Willebrand Factor Mutations and Polymorphisms, and the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* 1993;69(2):177-184.
212. Sixma JJ, Schiphorst ME, Verweij CL, Pannekoek H. Effect of deletion of the A1 domain of von Willebrand factor on its binding to heparin, collagen and platelets in the presence of ristocetin. *Eur J Biochem.* 1991;196(2):369-375.
213. Lankhof H, van Hoeij M, Schiphorst ME, et al. A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. *Thromb Haemost.* 1996;75(6):950-958.
214. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ, Jr., Montgomery RR. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood.* 1987;69(6):1691-1695.
215. Hammond C, Helenius A. Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol.* 1994;126(1):41-52.
216. Cole NB, Ellenberg J, Song J, DiEuliis D, Lippincott-Schwartz J. Retrograde transport of Golgi-localized proteins to the ER. *J Cell Biol.* 1998;140(1):1-15.
217. Braakman I, Helenius J, Helenius A. Manipulating disulfide bond formation and protein folding in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 1992;11(5):1717-1722.
218. Lodish HF, Kong N. The secretory pathway is normal in dithiothreitol-treated cells, but disulfide-bonded proteins are reduced and reversibly retained in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1993;268(27):20598-20605.
219. Casonato A, Pontara E, Sartorello F, et al. Reduced von Willebrand factor survival in type Vicenza von Willebrand disease. *Blood.* 2002;99(1):180-184.

220. Brown SA, Eldridge A, Collins PW, Bowen DJ. Increased clearance of von Willebrand factor antigen post-DDAVP in Type 1 von Willebrand disease: is it a potential pathogenic process? *J Thromb Haemost.* 2003 1(8):1714-1717.
221. Lentz SR, Sadler JE. Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum. *Blood.* 1993;81(3):683-689.
222. Fra AM, Fagioli C, Finazzi D, Sitia R, Alberini CM. Quality control of ER synthesized proteins: an exposed thiol group as a three-way switch mediating assembly, retention and degradation. *Embo J.* 1993;12(12):4755-4761.
223. Kerem A, Kronman C, Bar-Nun S, Shafferman A, Velan B. Interrelations between assembly and secretion of recombinant human acetylcholinesterase. *J Biol Chem.* 1993;268(1):180-184.
224. Ellgaard L, Molinari M, Helenius A. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science.* 1999;286(5446):1882-1888.
225. Ritter C, Helenius A. Recognition of local glycoprotein misfolding by the ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *Nat Struct Biol.* 2000;7(4):278-280.
226. Fowler WE, Fretto LJ, Hamilton KK, Erickson HP, McKee PA. Substructure of human von Willebrand factor. *J Clin Invest.* 1985;76(4):1491-1500.
227. Fretto LJ, Fowler WE, McCaslin DR, Erickson HP, McKee PA. Substructure of human von Willebrand factor. Proteolysis by V8 and characterization of two functional domains. *J Biol Chem.* 1986;261(33):15679-15689.
228. Bonifacino JS, Weissman AM. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:19-57.
229. Fenteany G, Schreiber SL. Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J Biol Chem.* 1998;273(15):8545-8548.
230. Duga S, Asselta R, Santagostino E, et al. Missense mutations in the human beta fibrinogen gene cause congenital afibrinogenemia by impairing fibrinogen secretion. *Blood.* 2000;95(4):1336-1341.
231. Brennan SO, Wyatt J, Medicina D, Callea F, George PM. Fibrinogen brescia: hepatic endoplasmic reticulum storage and hypofibrinogenemia because of a gamma284 Gly-->Arg mutation. *Am J Pathol.* 2000;157(1):189-196.
232. Wehinger H, Klinge O, Alexandrakis E, Schurmann J, Witt J, Seydewitz HH. Hereditary hypofibrinogenemia with fibrinogen storage in the liver. *Eur J Pediatr.* 1983;141(2):109-112.
233. Lamande SR, Chessler SD, Golub SB, et al. Endoplasmic reticulum-mediated quality control of type I collagen production by cells from osteogenesis imperfecta patients with mutations in the pro alpha 1 (I) chain carboxyl-terminal propeptide which impair subunit assembly. *J Biol Chem.* 1995;270(15):8642-8649.
234. Bogaert R, Tiller GE, Weis MA, et al. An amino acid substitution (Gly853-->Glu) in the collagen alpha 1(II) chain produces hypochondrogenesis. *J Biol Chem.* 1992;267(31):22522-22526.
235. Gézsi A, Budde U, Deak I, et al. Accelerated clearance alone explains ultra-large multimers in von Willebrand disease Vicenza. *J Thromb Haemost.* 2010;8(6):1273-1280.
236. Mannucci PM, Lombardi R, Castaman G, et al. von Willebrand disease "Vicenza" with larger-than-normal (supranormal) von Willebrand factor multimers. *Blood.* 1988;71(1):65-70.
237. Zieger B, Budde U, Jessat U, et al. New families with von Willebrand disease type 2M (Vicenza). *Thrombosis Research.* 1997;87(1):57-64.

238. Schneppenheim R, Federici AB, Budde U, et al. 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;83(1):136-140.
239. Castaman G, Rodeghiero F, Mannucci PM. The elusive pathogenesis of von Willebrand disease Vicenza. *Blood.* 2002;99(11):4243-4244; author reply 4244.
240. Rodeghiero F, Castaman G, Di Bona E, Ruggeri M, Lombardi R, Mannucci PM. Hyperresponsiveness to DDAVP for patients with type I von Willebrand's disease and normal intra-platelet von Willebrand factor. *Eur J Haematol.* 1988;40(2):163-167.
241. Castaman G, Lethagen S, Federici AB, et al. Response to desmopressin is influenced by the genotype and phenotype in type 1 von Willebrand disease (VWD): results from the European Study MCMDM-1VWD. *Blood.* 2008;111(7):3531-3539.
242. Lenting PJ, CJ VANS, Denis CV. Clearance mechanisms of von Willebrand factor and factor VIII. *J Thromb Haemost.* 2007;5(7):1353-1360.
243. Casonato A, Pontara E, Sartorello F, et al. Identifying type Vicenza von Willebrand disease. *J Lab Clin Med.* 2006;147(2):96-102.
244. Bodó I, Eikenboom J, Montgomery R, et al. Platelet-dependent von Willebrand factor activity. Nomenclature and methodology: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2015;13(7):1345-1350.
245. Howard MA, Firkin BG. Ristocetin--a new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thromb Diath Haemorrh.* 1971;26(2):362-369.
246. Weiss HJ, Hoyer LW, Rickles FR, Varma A, Rogers J. Quantitative assay of a plasma factor deficient in von Willebrand's disease that is necessary for platelet aggregation. Relationship to factor VIII procoagulant activity and antigen content. *J Clin Invest.* 1973;52(11):2708-2716.
247. Allain JP, Cooper HA, Wagner RH, Brinkhous KM. Platelets fixed with paraformaldehyde: a new reagent for assay of von Willebrand factor and platelet aggregating factor. *J Lab Clin Med.* 1975;85(2):318-328.
248. Nichols WL, Hultin MB, James AH, et al. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia.* 2008;14(2):171-232.
249. Favaloro EJ. Laboratory identification of von Willebrand disease: technical and scientific perspectives. *Semin Thromb Hemost.* 2006;32(5):456-471.
250. Favaloro EJ, Koutts J. Laboratory assays for von Willebrand factor: relative contribution to the diagnosis of von Willebrand's disease. *Pathology.* 1997;29(4):385-391.
251. Rodeghiero F, Castaman G. Calibration of lyophilized standards for ristocetin cofactor activity of von Willebrand Factor (vWF) requires vWF-deficient plasma as diluent for dose-response curves. *Thromb Haemost.* 1987;58(4):978-981.
252. Favaloro EJ, Mohammed S, McDonald J. Validation of improved performance characteristics for the automated von Willebrand factor ristocetin cofactor activity assay. *J Thromb Haemost.* 2010;8(12):2842-2844.
253. Hillarp A, Stadler M, Haderer C, Weinberger J, Kessler CM, Romisch J. Improved performance characteristics of the von Willebrand factor ristocetin cofactor activity assay using a novel automated assay protocol. *J Thromb Haemost.* 2010;8(10):2216-2223.
254. Patzke J, Schneppenheim R. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *Hamostaseologie.* 2010;30(4):203-206.
255. Favaloro EJ. Diagnosis and classification of von Willebrand disease: a review of the differential utility of various functional von Willebrand factor assays. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2011;22(7):553-564.

256. Scott JP, Montgomery RR, Retzinger GS. Dimeric ristocetin flocculates proteins, binds to platelets, and mediates von Willebrand factor-dependent agglutination of platelets. *J Biol Chem.* 1991;266(13):8149-8155.
257. Weiss HJ, Rogers J, Brand H. Defective ristocetin-induced platelet aggregation in von Willebrand's disease and its correction by factor VIII. *J Clin Invest.* 1973;52(11):2697-2707.
258. Flood VH, Gill JC, Morateck PA, et al. Common VWF exon 28 polymorphisms in African Americans affecting the VWF activity assay by ristocetin cofactor. *Blood.* 2010;116(2):280-286.
259. Bolton-Maggs PH, Favaloro EJ, Hillarp A, Jennings I, Kohler HP. Difficulties and pitfalls in the laboratory diagnosis of bleeding disorders. *Haemophilia.* 2012;18 Suppl 4:66-72.
260. Lillicrap D. von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy. *Blood.* 2013;122(23):3735-3740.
261. Castaman G, Hillarp A, Goodeve A. Laboratory aspects of von Willebrand disease: test repertoire and options for activity assays and genetic analysis. *Haemophilia.* 2014;20 Suppl 4:65-70.
262. Costa-Pinto J, Perez-Rodriguez A, del CG-d-CM, et al. Diagnosis of inherited von Willebrand disease: comparison of two methodologies and analysis of the discrepancies. *Haemophilia.* 2014;20(4):559-567.
263. Verfaillie CJ, De Witte E, Devreese KM. Validation of a new panel of automated chemiluminescence assays for von Willebrand factor antigen and activity in the screening for von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol.* 2013;35(5):555-565.
264. ISTH. SSC Subcommittee minutes 2014: von Willebrand factor. *International Society on Thrombosis and Haemostasis.* 2014;[http://c.ymcdn.com/sites/www.isth.org/resource/resmgr/yearly\\_subcommittee\\_minutes/all\\_subcommittee\\_standing\\_c.pdf](http://c.ymcdn.com/sites/www.isth.org/resource/resmgr/yearly_subcommittee_minutes/all_subcommittee_standing_c.pdf)(Accessed: November 2014).
265. Stufano F, Baronciani L, Pagliari MT, et al. Diagnosis of type 2B von Willebrand disease (VWD) using an alternative assay to ristocetin induced platelet agglutination (RIPA). *Thromb Res.* 2014;134(Suppl. 2):OC-156.
266. Goodall AH, Jarvis J, Chand S, et al. An immunoradiometric assay for human factor VIII/von Willebrand factor (VIII:vWF) using a monoclonal antibody that defines a functional epitope. *Br J Haematol.* 1985;59(4):565-577.
267. Chand S, McCraw A, Hutton R, Tuddenham EG, Goodall AH. A two-site, monoclonal antibody-based immunoassay for von Willebrand factor--demonstration that vWF function resides in a conformational epitope. *Thromb Haemost.* 1986;55(3):318-324.
268. Murdock PJ, Woodhams BJ, Matthews KB, Pasi KJ, Goodall AH. von Willebrand factor activity detected in a monoclonal antibody-based ELISA: an alternative to the ristocetin cofactor platelet agglutination assay for diagnostic use. *Thromb Haemost.* 1997;78(4):1272-1277.
269. Laffan M, Brown SA, Collins PW, et al. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia.* 2004;10(3):199-217.
270. Favaloro EJ, Henniker A, Facey D, Hertzberg M. Discrimination of von Willebrand disease (VWD) subtypes: direct comparison of von Willebrand factor:collagen binding assay (VWF:CBA) with monoclonal antibody (MAB) based VWF-capture systems. *Thromb Haemost.* 2000;84(4):541-547.
271. De Vleeschauwer A, Devreese K. Comparison of a new automated von Willebrand factor activity assay with an aggregation von Willebrand ristocetin cofactor activity assay for the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2006;17(5):353-358.

272. Sucker C, Senft B, Scharf RE, Zotz RB. Determination of von Willebrand factor activity: evaluation of the HaemosIL assay in comparison with established procedures. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2006;12(3):305-310.
273. Salem RO, Van Cott EM. A new automated screening assay for the diagnosis of von Willebrand disease. *Am J Clin Pathol.* 2007;127(5):730-735.
274. Pinol M, Sales M, Costa M, Tosetto A, Canciani MT, Federici AB. Evaluation of a new turbidimetric assay for von Willebrand factor activity useful in the general screening of von Willebrand disease. *Haematologica.* 2007;92(5):712-713.
275. Trossaert M, Ternisien C, Lefrancois A, et al. Evaluation of an automated von Willebrand factor activity assay in von Willebrand disease. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2011;17(6):E25-29.
276. Szederjesi A, Baronciani L, Budde U, et al. An international collaborative study to compare different von Willebrand factor glycoprotein Ib binding activity assays: the COMPASS-VWF study. *J Thromb Haemost.* 2018;16(8):1604-1613.
277. Szederjesi A, Baronciani L, Budde U, et al. Comparison of von Willebrand factor platelet-binding activity assays: ELISA overreads type 2B with loss of HMW multimers. *J Thromb Haemost.* 2020;18(10):2513-2523.
278. Lawrie AS, Mackie IJ, Machin SJ, Peyvandi F. Evaluation of an automated platelet-based assay of ristocetin cofactor activity. *Haemophilia.* 2011;17(2):252-256.
279. Timm A, Hillarp A, Philips M, Goetze JP. Comparison of automated von Willebrand factor activity assays. *Thromb Res.* 2015;135(4):684-691.
280. Stufano F, Baronciani L, Pagliari MT, et al. Evaluation of an heterogeneous group of patients with von Willebrand disease using an assay alternative to ristocetin induced platelet agglutination. *J Thromb Haemost.* 2015;13(10):1806-1814.
281. Castaman G, Baronciani L, Canciani MT, Federici AB. Different bleeding risk in type 2A and 2M von Willebrand disease: a 2-year prospective study in 107 patients: a reply to a rebuttal. *J Thromb Haemost.* 2012;10(7):1458-1460.
282. Favaloro EJ, Bodó I, Israels SJ, Brown SA. von Willebrand disease and platelet disorders. *Haemophilia.* 2014;20 Suppl 4:59-64.
283. Castaman G, Goodeve A, Eikenboom J, European Group on von Willebrand D. Principles of care for the diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Haematologica.* 2013;98(5):667-674.
284. Rodeghiero F, Pabinger I, Ragni M, et al. Fundamentals for a Systematic Approach to Mild and Moderate Inherited Bleeding Disorders: An EHA Consensus Report. *Hemasphere.* 2019;3(4):e286.
285. De Meyer SF, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. von Willebrand factor to the rescue. *Blood.* 2009;113(21):5049-5057.
286. Mannucci PM. Treatment of von Willebrand's Disease. *N Engl J Med.* 2004;351(7):683-694.
287. Pasi KJ, Collins PW, Keeling DM, et al. Management of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia.* 2004;10(3):218-231.
288. Rodeghiero F, Castaman G, Tosetto A. How I treat von Willebrand disease. *Blood.* 2009;114(6):1158-1165.
289. Mannucci PM, Franchini M, Castaman G, Federici AB. Evidence-based recommendations on the treatment of von Willebrand disease in Italy. *Blood Transfus.* 2009;7(2):117-126.
290. Swami A, Kaur V. von Willebrand Disease: A Concise Review and Update for the Practicing Physician. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2017;23(8):900-910.



291. Laffan MA, Lester W, O'Donnell JS, et al. The diagnosis and management of von Willebrand disease: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol*. 2014;167(4):453-465.
292. James PD, Lillicrap DP. The diagnosis and management of von Willebrand disease in Canada. *Semin Thromb Hemost*. 2011;37(5):522-527.
293. Lassila R, Holme PA, Landorff A, Petrini P, Onundarson PT, Hillarp A. Nordic Haemophilia Council's practical guidelines on diagnosis and management of von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost*. 2011;37(5):495-502.
294. Keeney S, Collins P, Cumming A, Goodeve A, Pasi J. Diagnosis and management of von Willebrand disease in the United Kingdom. *Semin Thromb Hemost*. 2011;37(5):488-494.
295. de Wee EM, Leebeek FW, Eikenboom JC. Diagnosis and management of von Willebrand disease in The Netherlands. *Semin Thromb Hemost*. 2011;37(5):480-487.
296. Mannucci PM. How I treat patients with von Willebrand disease. *Blood*. 2001;97(7):1915-1919.
297. Mannucci PM. Treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost*. 2001 Jul;86(1):149-153.
298. Federici AB, Mazurier C, Berntorp E, et al. Biologic response to desmopressin in patients with severe type 1 and type 2 von Willebrand disease: results of a multicenter European study. *Blood*. 2004;103(6):2032-2038.
299. Mannucci PM, Bettega D, Cattaneo M. Patterns of development of tachyphylaxis in patients with haemophilia and von Willebrand disease after repeated doses of desmopressin (DDAVP). *Br J Haematol*. 1992;82(1):87-93.
300. Smith TJ, Gill JC, Ambruso DR, Hathaway WE. Hyponatremia and seizures in young children given DDAVP. *Am J Hematol*. 1989;31(3):199-202.
301. Bond L, Bevan D. Myocardial infarction in a patient with hemophilia treated with DDAVP. *N Engl J Med*. 1988;318(2):121.
302. Byrnes JJ, Larcada A, Moake JL. Thrombosis following desmopressin for uremic bleeding. *Am J Hematol*. 1988;28(1):63-65.
303. Holmberg L, Nilsson IM, Borge L, Gunnarsson M, Sjorin E. Platelet aggregation induced by 1-desamino-8-D-arginine vasopressin (DDAVP) in Type IIB von Willebrand's disease. *N Engl J Med*. 1983;309(14):816-821.
304. Casonato A, Steffan A, Pontara E, et al. Post-DDAVP thrombocytopenia in type 2B von Willebrand disease is not associated with platelet consumption: failure to demonstrate glyco-calicin increase or platelet activation. *Thromb Haemost*. 1999;81(2):224-228.
305. Federici AB. The safety of plasma-derived von Willebrand/factor VIII concentrates in the management of inherited von Willebrand disease. *Expert Opin Drug Saf*. 2009;8(2):203-210.
306. Castaman G. Treatment of von Willebrand disease with FVIII/VWF concentrates. *Blood Transfus*. 2011;9 Suppl 2:s9-13.
307. Berntorp E, Petrini P. Long-term prophylaxis in von Willebrand disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2005;16 Suppl 1:S23-26.
308. Federici AB. Highly purified VWF/FVIII concentrates in the treatment and prophylaxis of von Willebrand disease: the PRO. WILL Study. *Haemophilia*. 2007;13 Suppl 5:15-24.
309. Abshire TC, Federici AB, Alvarez MT, et al. Prophylaxis in severe forms of von Willebrand's disease: results from the von Willebrand Disease Prophylaxis Network (VWD PN). *Haemophilia*. 2013;19(1):76-81.
310. Simon B, Cegledi A, Dolgos J, et al. Combined immunosuppression for acquired hemophilia A: CyDRi is a highly effective low-toxicity regimen. *Blood*. 2022;140(18):1983-1992.

311. Baudo F, Collins P, Huth-Kuhne A, et al. Management of bleeding in acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia (EACH2) Registry. *Blood*. 2012;120(1):39-46.
312. Tiede A, Giangrande P, Teitel J, et al. Clinical evaluation of bleeds and response to haemostatic treatment in patients with acquired haemophilia: A global expert consensus statement. *Haemophilia*. 2019;25(6):969-978.
313. Makita S, Aoki T, Watarai A, et al. Acquired hemophilia associated with autoimmune bullous diseases: a report of two cases and a review of the literature. *Intern Med*. 2013;52(7):807-810.
314. Gaddh M, Cheng E, Elsebaie MAT, Bodo I. Clinical Utilization and Cost of Thrombophilia Testing in Patients with Venous Thromboembolism. *TH Open*. 2020;4(3):e153-e162.
315. Simpson EL, Stevenson MD, Rawdin A, Papaioannou D. Thrombophilia testing in people with venous thromboembolism: systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess*. 2009;13(2):iii, ix-x, 1-91.
316. Pernod G, Biron-Andreani C, Morange PE, et al. Recommendations on testing for thrombophilia in venous thromboembolic disease: a French consensus guideline. *J Mal Vasc*. 2009;34(3):156-203.
317. Baglin T, Gray E, Greaves M, et al. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia. *Br J Haematol*. 2010;149(2):209-220.
318. Middeldorp S, Nieuwlaat R, Baumann Kreuziger L, et al. American Society of Hematology 2023 Guidelines for Management of Venous Thromboembolism: Thrombophilia Testing. *Blood Adv*. 2023.
319. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Arch Intern Med*. 2000;160(6):809-815.
320. Anderson FA, Jr., Spencer FA. Risk factors for venous thromboembolism. *Circulation*. 2003;107(23 Suppl 1):I9-16.
321. Meyer MR, Witt DM, Delate T, et al. Thrombophilia testing patterns amongst patients with acute venous thromboembolism. *Thromb Res*. 2015;136(6):1160-1164.
322. Somma J, Sussman, II, Rand JH. An evaluation of thrombophilia screening in an urban tertiary care medical center: A "real world" experience. *Am J Clin Pathol*. 2006;126(1):120-127.
323. Favaloro EJ, Mohammed S, Pati N, Ho MY, McDonald D. A clinical audit of congenital thrombophilia investigation in tertiary practice. *Pathology*. 2011;43(3):266-272.
324. O'Brien SH, Smith KJ. Using thrombophilia testing to determine anticoagulation duration in pediatric thrombosis is not cost-effective. *J Pediatr*. 2009;155(1):100-104.
325. Mou E, Kwang H, Hom J, et al. Magnitude of Potentially Inappropriate Thrombophilia Testing in the Inpatient Hospital Setting. *J Hosp Med*. 2017;12(9):735-738.
326. Wu O, Robertson L, Langhorne P, et al. Oral contraceptives, hormone replacement therapy, thrombophilias and risk of venous thromboembolism: a systematic review. The Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) Study. *Thromb Haemost*. 2005;94(1):17-25.
327. Wu O, Greer IA. Is screening for thrombophilia cost-effective? *Curr Opin Hematol*. 2007;14(5):500-503.
328. Shen YM, Tsai J, Taiwo E, et al. Analysis of Thrombophilia Test Ordering Practices at an Academic Center: A Proposal for Appropriate Testing to Reduce Harm and Cost. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155326.

329. Masuda EM, Lee RW, Okazaki IJ, Benyamini P, Kistner RL. Thrombophilia testing has limited usefulness in clinical decision-making and should be used selectively. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2015;3(2):228-235.
330. Couturaud F. Guided duration of anticoagulation after unprovoked venous thromboembolism using D-dimer testing. *Eur Respir J.* 2016;47(5):1313-1314.
331. Pengo V, Denas G, Zoppellaro G, et al. Rivaroxaban vs warfarin in high-risk patients with antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2018;132(13):1365-1371.
332. Sallai KK, Nagy E, Bodo I, Mohl A, Gergely P. Thrombosis risk in systemic lupus erythematosus: the role of thrombophilic risk factors. *Scand J Rheumatol.* 2007;36(3):198-205.
333. Marai I, Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. The systemic nature of the antiphospholipid syndrome. *Scand J Rheumatol.* 2004;33(6):365-372.
334. Arnout J, Vermeylen J. Current status and implications of autoimmune antiphospholipid antibodies in relation to thrombotic disease. *J Thromb Haemost.* 2003;1(5):931-942.
335. Rand JH. Molecular pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Circ Res.* 2002;90(1):29-37.
336. Pierangeli SS, Harris EN. Probing antiphospholipid-mediated thrombosis: the interplay between anticardiolipin antibodies and endothelial cells. *Lupus.* 2003;12(7):539-545.
337. Esmon CT. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res.* 2004;114(5-6):321-327.
338. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(5):2311-2315.
339. Mok CC. Accelerated atherosclerosis, arterial thromboembolism, and preventive strategies in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol.* 2006;35(2):85-95.
340. Brouwer JL, Bijl M, Veeger NJ, Kluin-Nelemans HC, van der Meer J. The contribution of inherited and acquired thrombophilic defects, alone or combined with antiphospholipid antibodies, to venous and arterial thromboembolism in patients with systemic lupus erythematosus. *Blood.* 2004;104(1):143-148.
341. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994;369(6475):64-67.
342. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 1996;88(10):3698-3703.
343. Balogh I, Poka R, Pfliegler G, Dekany M, Boda Z, Muszbek L. High prevalence of factor V Leiden mutation and 20210A prothrombin variant in Hungary. *Thromb Haemost.* 1999;81(4):660-661.
344. Pongracz E, Tordai A, Csornai M, Bela Z, Nagy Z. [Significance of Factor V gene A506G mutation (Leiden) in the pathogenesis of ischemic stroke]. *Ideggyogy Sz.* 2003;56(5-6):157-164.
345. Stankovics J, Melegh B, Nagy A, et al. [Incidence of factor V G1681A (Leiden) mutation in samplings from the Hungarian population]. *Orv Hetil.* 1998;139(19):1161-1163.
346. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest.* 1981;68(5):1370-1373.
347. Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood.* 1984;64(6):1297-1300.
348. Tran M, Spencer FA. Thromboepidemiology: identifying patients with heritable risk for thrombin-mediated thromboembolic events. *Am Heart J.* 2005;149(1 Suppl):S9-18.
349. Bucciarelli P, Rosendaal FR, Tripodi A, et al. Risk of venous thromboembolism and clinical manifestations in carriers of antithrombin, protein C, protein S deficiency, or

- activated protein C resistance: a multicenter collaborative family study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(4):1026-1033.
350. Bertina RM. Elevated clotting factor levels and venous thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33(5-6):395-400.
351. Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, et al. High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2000;343(7):457-462.
352. Koster T, Blann AD, Briet E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet.* 1995;345(8943):152-155.
353. Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis. *Thromb Haemost.* 1999;81(2):165-176.
354. Ray JG, Kearon C, Yi Q, Sheridan P, Lonn E, Heart Outcomes Prevention Evaluation I. Homocysteine-lowering therapy and risk for venous thromboembolism: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2007;146(11):761-767.
355. Afeltra A, Vadacca M, Conti L, et al. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: congenital and acquired risk factors. *Arthritis Rheum.* 2005;53(3):452-459.
356. Male C, Mitchell L, Julian J, et al. Acquired activated protein C resistance is associated with lupus anticoagulants and thrombotic events in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Blood.* 2001;97(4):844-849.
357. Cervera R, Khamashta MA, Font J, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore).* 2003;82(5):299-308.
358. Mok CC, Tang SS, To CH, Petri M. Incidence and risk factors of thromboembolism in systemic lupus erythematosus: a comparison of three ethnic groups. *Arthritis Rheum.* 2005;52(9):2774-2782.
359. Nordstrom M, Lindblad B, Bergqvist D, Kjellstrom T. A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population. *J Intern Med.* 1992;232(2):155-160.
360. Anderson FA, Jr., Wheeler HB, Goldberg RJ, et al. A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT Study. *Arch Intern Med.* 1991;151(5):933-938.
361. Erkan D, Yazici Y, Peterson MG, Sammaritano L, Lockshin MD. A cross-sectional study of clinical thrombotic risk factors and preventive treatments in antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford).* 2002;41(8):924-929.
362. Shapiro SS. The lupus anticoagulant/antiphospholipid syndrome. *Annu Rev Med.* 1996;47:533-553.
363. Galli M, Barbui T. Prevalence of different anti-phospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus and their relationship with the antiphospholipid syndrome. *Clin Chem.* 2001;47(6):985-987.
364. Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med.* 1990;112(9):682-698.
365. Palomo I, Pereira J, Alarcon M, et al. Antiphospholipid antibodies in Chilean patients with systemic lupus erythematosus. *J Lab Clin Med.* 2002;140(5):336-341.
366. Radway-Bright EL, Ravirajan CT, Isenberg DA. The prevalence of antibodies to anionic phospholipids in patients with the primary antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and their relatives and spouses. *Rheumatology (Oxford).* 2000;39(4):427-431.

367. Caccavo D, Del Porto F, Garzia P, et al. Raynaud's phenomenon and antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus: is there an association? *Ann Rheum Dis.* 2003;62(10):1003-1005.
368. Sebastiani GD, Galeazzi M, Tincani A, et al. Anticardiolipin and anti-beta2GPI antibodies in a large series of European patients with systemic lupus erythematosus. Prevalence and clinical associations. European Concerted Action on the Immunogenetics of SLE. *Scand J Rheumatol.* 1999;28(6):344-351.
369. Gould T, Tikly M, Asherson R, Loizou S, Singh S. Prevalence and clinical correlates of anti-phospholipid antibodies in South Africans with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol.* 2006;35(1):29-34.
370. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet.* 1995;346(8983):1133-1134.
371. Lucotte G, Mercier G. Population genetics of factor V Leiden in Europe. *Blood Cells Mol Dis.* 2001;27(2):362-367.
372. Simioni P, Prandoni P, Burlina A, et al. Hyperhomocysteinemia and deep-vein thrombosis. A case-control study. *Thromb Haemost.* 1996;76(6):883-886.
373. Levine SR, Kieran S, Puzio K, Feit H, Patel SC, Welch KM. Cerebral venous thrombosis with lupus anticoagulants. Report of two cases. *Stroke.* 1987;18(4):801-804.
374. Levy DM, Massicotte MP, Harvey E, Hebert D, Silverman ED. Thromboembolism in paediatric lupus patients. *Lupus.* 2003;12(10):741-746.
375. Calvo-Alen J, Toloza SM, Fernandez M, et al. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort (LUMINA). XXV. Smoking, older age, disease activity, lupus anticoagulant, and glucocorticoid dose as risk factors for the occurrence of venous thrombosis in lupus patients. *Arthritis Rheum.* 2005;52(7):2060-2068.
376. Plander M, Szendrei T, Bodo I, Ivanyi JL. Successful treatment with rivaroxaban of an extended superficial vein thrombosis in a patient with acquired antithrombin deficiency due to Peg-asparaginase treatment. *Ann Hematol.* 2015;94(7):1257-1258.
377. Avramis VI, Sencer S, Periclou AP, et al. A randomized comparison of native Escherichia coli asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood.* 2002;99(6):1986-1994.
378. Truelove E, Fielding AK, Hunt BJ. The coagulopathy and thrombotic risk associated with L-asparaginase treatment in adults with acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia.* 2013;27(3):553-559.
379. Caruso V, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Storti S, Donati MB. Venous thrombotic complications in adults undergoing induction treatment for acute lymphoblastic leukemia: results from a meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2007;5(3):621-623.
380. Grace RF, Dahlberg SE, Neuberg D, et al. The frequency and management of asparaginase-related thrombosis in paediatric and adult patients with acute lymphoblastic leukaemia treated on Dana-Farber Cancer Institute consortium protocols. *Br J Haematol.* 2011;152(4):452-459.
381. Hunault-Berger M, Chevallier P, Delain M, et al. Changes in antithrombin and fibrinogen levels during induction chemotherapy with L-asparaginase in adult patients with acute lymphoblastic leukemia or lymphoblastic lymphoma. Use of supportive coagulation therapy and clinical outcome: the CAPELAL study. *Haematologica.* 2008;93(10):1488-1494.
382. Mitchell L, Andrew M, Hanna K, et al. Trend to efficacy and safety using antithrombin concentrate in prevention of thrombosis in children receiving l-asparaginase for acute lymphoblastic leukemia. Results of the PAARKA study. *Thromb Haemost.* 2003;90(2):235-244.

383. Elhasid R, Lanir N, Sharon R, et al. Prophylactic therapy with enoxaparin during L-asparaginase treatment in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2001;12(5):367-370.
384. Kuhle S, Lau A, Bajzar L, et al. Comparison of the anticoagulant effect of a direct thrombin inhibitor and a low molecular weight heparin in an acquired antithrombin deficiency in children with acute lymphoblastic leukaemia treated with L-asparaginase: an in vitro study. *Br J Haematol*. 2006;134(5):526-531.
385. Zwicker JJ, Wang TF, DeAngelo DJ, et al. The prevention and management of asparaginase-related venous thromboembolism in adults: Guidance from the SSC on Hemostasis and Malignancy of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2020;18(2):278-284.
386. Gundabolu K, Bhatt VR, Smith LM, et al. Thrombosis prophylaxis with apixaban in patients treated with asparaginase. *Blood*. 2021;138.
387. Talamo L, Douvas M, Macik BG, Ornan D. Successful treatment with apixaban of sinus venous thrombosis due to pegylated asparaginase in a young adult with T cell acute lymphoblastic leukemia: case report and review of management. *Ann Hematol*. 2017;96(4):691-693.
388. Xarelto. Summary of product characteristics.
389. European Leukemia Net. European Leukemia Trial Registry - Trial:ALL GMALL 07/2003.
390. O'Brien SH, Li D, Mitchell LG, et al. PREVAPIX-ALL: Apixaban Compared to Standard of Care for Prevention of Venous Thrombosis in Paediatric Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL)-Rationale and Design. *Thromb Haemost*. 2019;119(5):844-853.
391. Bodo I, Amine I, Boban A, et al. Complement Inhibition in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH): A Systematic Review and Expert Opinion from Central Europe on Special Patient Populations. *Adv Ther*. 2023;40(6):2752-2772.
392. Bodó I. [New options is the magament of PNH]. *Onkológia és Hematológia*. 2020;10(5):3.
393. Horanyi D, Varkonyi A, Nagy GR, Bodo I, Masszi T. [Rare case of a pregnancy in a woman with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Case report]. *Orv Hetil*. 2016;157(23):916-918; quiz 919-920.
394. Bodó I. The most dramatic aspect of PNH: Aggressive thrombophilia CEE Complement Academy. Prague (online): SWIXX Biopharma; 2021.
395. Luzzatto L, Gianfaldoni G, Notaro R. Management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a personal view. *Br J Haematol*. 2011;153(6):709-720.
396. Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell*. 1993;73(4):703-711.
397. Bessler M, Mason PJ, Hillmen P, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO J*. 1994;13(1):110-117.
398. Hillmen P, Hall C, Marsh JC, et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2004;350(6):552-559.
399. Hillmen P, Young NS, Schubert J, et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2006;355(12):1233-1243.
400. Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, et al. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2008;111(4):1840-1847.
401. Lee JW, Sicre de Fontbrune F, Wong Lee Lee L, et al. Ravulizumab (ALXN1210) vs eculizumab in adult patients with PNH naive to complement inhibitors: the 301 study. *Blood*. 2019;133(6):530-539.

402. Kulasekararaj AG, Hill A, Rottinghaus ST, et al. Ravulizumab (ALXN1210) vs eculizumab in C5-inhibitor-experienced adult patients with PNH: the 302 study. *Blood*. 2019;133(6):540-549.
403. Stoppler D, Macpherson A, Smith-Penzel S, et al. Insight into small molecule binding to the neonatal Fc receptor by X-ray crystallography and 100 kHz magic-angle-spinning NMR. *PLoS Biol*. 2018;16(5):e2006192.
404. Hillmen P, Szer J, Weitz I, et al. Pegcetacoplan versus Eculizumab in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2021;384(11):1028-1037.
405. Wong RSM, Navarro-Cabrera JR, Comia NS, et al. Pegcetacoplan controls hemolysis in complement inhibitor-naïve patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Adv*. 2023;7(11):2468-2478.
406. Hillmen P, Muus P, Duhrsen U, et al. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2007;110(12):4123-4128.
407. Kelly RJ, Hill A, Arnold LM, et al. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood*. 2011;117(25):6786-6792.
408. Carden MA, Gaddh M, Hoskote A, et al. Rituximab leads to early elimination of circulating CD20+ T and B lymphocytes in patients with iTTP despite ongoing TPEX. *Blood Adv*. 2020;4(3):477-481.
409. Darabi K, Berg AH. Rituximab can be combined with daily plasma exchange to achieve effective B-cell depletion and clinical improvement in acute autoimmune TTP. *Am J Clin Pathol*. 2006;125(4):592-597.
410. Azzopardi N, Francois M, Laurent E, Paintaud G, Birmele B. Influence of plasma exchange on rituximab pharmacokinetics. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;76(3):486-488.
411. Wilk E, Witte T, Marquardt N, et al. Depletion of functionally active CD20+ T cells by rituximab treatment. *Arthritis Rheum*. 2009;60(12):3563-3571.
412. Gingele S, Jacobus TL, Konen FF, et al. Ocrelizumab Depletes CD20(+) T Cells in Multiple Sclerosis Patients. *Cells*. 2018;8(1).
413. Palanichamy A, Jahn S, Nickles D, et al. Rituximab efficiently depletes increased CD20-expressing T cells in multiple sclerosis patients. *J Immunol*. 2014;193(2):580-586.
414. Chen Q, Yuan S, Sun H, Peng L. CD3(+)CD20(+) T cells and their roles in human diseases. *Hum Immunol*. 2019;80(3):191-194.
415. George JN. The remarkable diversity of thrombotic thrombocytopenic purpura: a perspective. *Blood Adv*. 2018;2(12):1510-1516.
416. von Essen MR, Ammitzboll C, Hansen RH, et al. Proinflammatory CD20+ T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Brain*. 2019;142(1):120-132.
417. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*. 2014;41(4):529-542.
418. Ahmed R, Omidian Z, Giwa A, et al. A Public BCR Present in a Unique Dual-Receptor-Expressing Lymphocyte from Type 1 Diabetes Patients Encodes a Potent T Cell Autoantigen. *Cell*. 2019;177(6):1583-1599 e1516.
419. Brahmer JR, Lacchetti C, Schneider BJ, et al. Management of Immune-Related Adverse Events in Patients Treated With Immune Checkpoint Inhibitor Therapy: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2018;36(17):1714-1768.
420. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med*. 2018;378(2):158-168.