

# A von Willebrand alvadási faktor analízise

Doktori értekezés

**Szederjesi Attila**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. habil. Bodó Imre, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Bagoly Zsuzsa, Ph.D., tudományos munkatárs  
Dr. Wohner Nikolett, Ph.D., klinikai orvos

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bereczky Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Masszi András, Ph.D., főorvos

Budapest  
2019

## TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék .....	1
1. Rövidítések jegyzéke .....	4
2. Bevezetés .....	6
2.1. A von Willebrand faktor és betegség .....	6
2.1.1. A betegség felfedezése és a VWF biológiájáról való ismeretek fejlődése .....	6
2.1.2. A von Willebrand faktor .....	8
2.1.2.1. A VWF gén és fehérje .....	8
2.1.2.2. Post-transzlációs processing .....	9
2.1.2.3. Multimerizáció .....	10
2.1.2.4. Tárolás .....	11
2.1.2.5. Szekréció .....	11
2.1.2.6. VWF clearance .....	12
2.1.2.7. A doménszerkezet és a domének funkciója .....	13
2.1.2.8. A VWF fő mozgatója, a folyadékúrlódás .....	17
2.1.2.9. A VWF regulációja, az ADAMTS-13 szerepe .....	18
2.1.3. A betegség felosztása .....	19
2.1.3.1. 1-es típusú VWB .....	19
2.1.3.2. 2-es típusú VWB .....	20
2.1.3.3. 3-as típusú VWB .....	24
2.1.3.4. Különlegességek .....	24
2.1.4. A betegség tünetei .....	26
2.1.5. Epidemiológia .....	27
2.1.6. A VWB laboratóriumi diagnosztikája .....	27
2.1.6.1. A VIII. faktor szint .....	27
2.1.6.2. von Willebrand antigén szint .....	28
2.1.6.3. von Willebrand kollagénkötési aktivitás .....	29
2.1.6.4. von Willebrand thrombocytakötő aktivitás .....	30
2.1.6.5. von Willebrand faktor multimer analízis .....	33
2.1.6.6. von Willebrand faktor FVIII kötő aktivitás .....	37
2.1.6.7. von Willebrand faktor propeptid szint .....	37
2.1.6.8. Ristocetin indukálta thrombocytá aggregáció .....	37
2.1.6.9. von Willebrand ellenes antitest detektálása .....	38

2.1.6.10. PFA-100 .....	38
2.1.6.11. Diagnosztikai algoritmus és specifikus aktivitások.....	38
2.1.7. A VWF szerepe a daganatok fenntartásában és a metasztázis képzésben, különös tekintettel a colorectalis carcinomára .....	40
3. Célkitűzések .....	43
3.1. A von Willebrand faktor thrombocytakötő aktivitásának vizsgálata (COMPASS- VWF Study).....	43
3.2. von Willebrand faktor multimer analízisének hasznosítása.....	43
4. Módszerek .....	45
4.1. A VWF aktivitások összehasonlítása, azaz a COMPASS-VWF study (Comparison of Assays to Measure VWF Activity).....	45
4.1.1. Beteganyag .....	45
4.1.2. Reagensek és műszerpark.....	47
4.1.3. Adatelemzés .....	49
4.2. A multimer analízis hasznosítása - CRC betegekben .....	50
4.2.1. Beteganyag .....	50
4.2.2. Laboratóriumi vizsgálatok és statisztikai analízis.....	50
5. Eredmények .....	53
5.1. COMPASS-VWF.....	53
5.1.1.1. Tesztek korrelációja.....	53
5.1.1.2. Laboratóriumok összehasonlítása.....	53
5.1.1.3. Normál minták.....	56
5.1.1.4. A kalibrátorok hatása.....	56
5.1.1.5. Szenszitivitás.....	56
5.1.1.6. Precizitás.....	56
5.1.1.7. Referencia tartományok meghatározása.....	56
5.1.1.8. Szisztematikus hibák .....	57
5.2. UL-VWFM analízise CRC betegekben .....	65
6. Megbeszélés .....	67
6.1. COMPASS-VWF.....	67
6.2. Az UL-VWFM CRC betegekben .....	70
7. Következtetések.....	72
8. Összefoglalás.....	73
9. Summary.....	74

10. Irodalomjegyzék .....	75
11. Saját publikációk jegyzéke .....	101
11.1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények .....	101
11.2. Disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények.....	101
12. Köszönetnyilvánítás .....	102

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADAMTS-13 – a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin repeats

AVWS - szerzett von Willebrand szindróma

CD - Cluster of Differentiation

cDNS – komplementer DNS

CK – cystine knot/ cisztin csomó

CML - krónikus myeloid leukémia

C-terminális – karboxi-terminális

Del - deléció

EDTA - etiléndiamin-tetraacetát

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ER – endoplazmatikus retikulum

FVIII – VIII-as faktor

FVIII:C – factor VIII – coagulant/ VIII-as faktor aktivitás

GPIb $\alpha$  - Glikoprotein-1b $\alpha$

HMWM – high molecular weight multimer/nagy molekulásúlyú multimer

HRP - horse radish peroxidase - tormaperoxidáz

IL - Instrumentation Laboratory (cég név)

IU - international unit/nemzetközi egység

kDa - kilo Dalton

LMWM – low molecular weight multimer/alacsony molekulásúlyú multimer

LRP1 - Low density lipoprotein receptor-related protein 1

MGUS - monoklonális gammopátia

NP – normál plazma

NPP - normál poolozott plazma

N-terminális – amino-terminális

PFA-100 – Platelet function analyser 100/thrombocytá funkció analizátor

PT-VWB - thrombocytá típusú von Willebrand betegség

RIPA – Ristocetin induced platelet aggregation/ristocetin indukálta thrombocytá aggregáció

SDS- sodium dodecil sulphate/nátrium lauril szulfát

TTP – thrombotikus thrombocytopeniás purpura

U/dl – unit (egység) / deciliter

UL-HMWM - ultra nagy molekulásúlyú multimer

VWB / VWD– von Willebrand betegség / von Willebrand disease

VWF – von Willebrand faktora

VWF:Ag – von Willebrand antigén

VWF:CB – von Willebrand collagen binding activity/ kollagénkötő aktivitás

VWF:FVIIIIB - von Willebrand FVIII kötő aktivitás

VWF:RCo – von Willebrand ristocetin kofaktor aktivitás

WP –Weibel–Palade test

## **2. BEVEZETÉS**

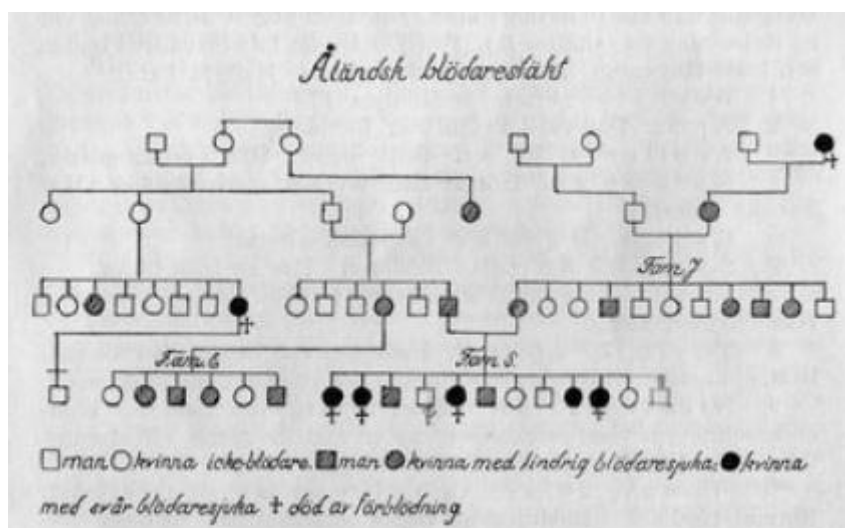
### **2.1. A von Willebrand faktor és betegség**

A von Willebrand betegség (VWB) a leggyakoribb öröklött vérzékenység a humán populációban, prevalenciája eléri az 1%-ot is. A betegséget az endothel sejtek és a megakaryocyták által termelt von Willebrand faktor (VWF) mennyiségének és/vagy működésének a zavara okozza, mely diszfunkciók alapján a betegség beosztása három csoportba történik: mennyiségi zavar az 1-s és 3-s típus, illetve a minőségi zavar a 2-s típusú VWB (1). A plazmában keringő óriás glikoprotein feladatai közé tartozik a VIII. alvadási faktor (FVIII) degradációtól való védelme, valamint a thrombocyták érfalhoz kötése a sérülés helyén. A vérzések legjellemzőbb formái a különböző nyálkahártya- és bőrvérzések, traumás, illetve műtét utáni vérzések. A diagnózis felállításához és a betegség altípusának meghatározásához szükséges a beteg családi anamnézisének ismerete, valamint a VWF és FVIII szintjeinek és funkciójának laboratóriumi meghatározása. Kutatócsoportunk e laboratóriumi diagnosztika fejlesztését tűzte ki célul, ennek a fejlesztésnek/erőfeszítésnek a fontosabb elemeit tartalmazza a dolgozatom.

#### **2.1.1. A betegség felfedezése és a VWF biológiájáról való ismeretek fejlődése**

Az első von Willebrand beteget Dr. Erik Adolf von Willebrand (hematológus, balneológus, akiről a betegséget később elnevezték) diagnosztizálta 1924 áprilisában a Helsinki Deaconess Kórházban. Páciense egy 5 éves kislány, a finn Åland-szigeteki Hjördis volt, aki visszatérő mucocutan vérzésektől szenvedett, és addigra már három nővérét veszítette el különböző típusú nyálkahártyavérzések miatt. A szülők elmondása szerint – akiknél szintén gyakori volt az orrvérzés -, több fiú és lány gyermekük (8 gyermek a 11-ből, ahogy az Willebrand későbbi kutatásából kiderült) is vérzékenységben szenvedett (**1. ábra**), melynek típusai a menorrhagia, orrvérzés, foghúzás utáni vérzések. Az enyhe anaemiától és a thrombocytopeniától eltekintve a beteg vérképe, valamint alvadási ideje normális volt, azonban a vérzési ideje extrémén megnyúlt. Von Willebrand a vérzés okát thrombocytá és érfal defektusnak gondolta. A betegség további vizsgálatai során von Willebrand 2 rokon család 4 generációjának 66 tagját (35 nő, 3 férfi) vizsgálta meg, és írta le vérzéses állapotukat Hjördis egyik tanárának segítségével, melyről 1926-

ban megjelent cikkében számolt be (2, 3). A betegséget akkor herediter pseudohaemophiliának nevezte, hangsúlyozva a 'rendes' haemophiliától való különbséget, mivel férfiakat és nőket egyaránt érintett (női betegeket erősebb vérzéssel és magasabb halálozási aránnyal). Német kutatótársával Dr. Rudolf von Jürgensszel az 1930-as években 3 közös publikációt is megjelentettek, melyekben a saját maguk által kidolgozott vizsgálati protokollal (teljes vérkép, thrombocyta elemzés, alvadási idő, alvadék retrakció, vércsoport stb) és egy saját tervezésű 'kapilláris thrombométerrel' próbálták tisztázni a betegség mibenlétét. A betegekben a laboratóriumi paraméterek Hjördiséhez hasonlóak voltak. Később von Willebrand arra is rájött, hogy ezen vérzékeny betegeknél a vér transfúzió nem csak az anaemia kezelésére használható, de a vérzékenység csökkentésére, illetve megszüntetésére is alkalmas. Ezzel párhuzamban más országokban is találtak von Willebrand betegeket, azonban őket vérzéseik alapján, akkor még haemophiliás betegeként kezelték (2). Az 1950-70 között fedezték fel a cryoprecipitátum pozitív hatását a vérzékeny betegek vérzési idejére, ill. ezekben az években sikerült immunológiai módszerekkel szétválasztani egymástól a keringő VWF és a FVIII-t (4). 1981-ben Nyman és mtsai Hjördis családjának újvizsgálatokor az enyhe vérzékeny betegeket 1-s típusú VWB-nek sorolta be, a súlyos vérzékenységben szenvedőket pedig homozigóta 3-s típusba (5).



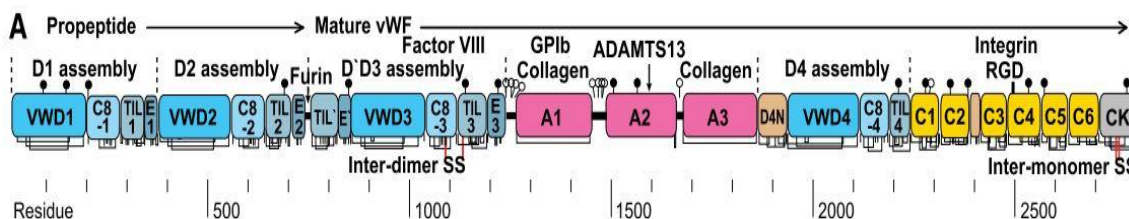
1. ábra: Hjördis családfája (Sundblom család)(2)



## 2.1.2. A von Willebrand faktor

### 2.1.2.1. A VWF gén és fehérje

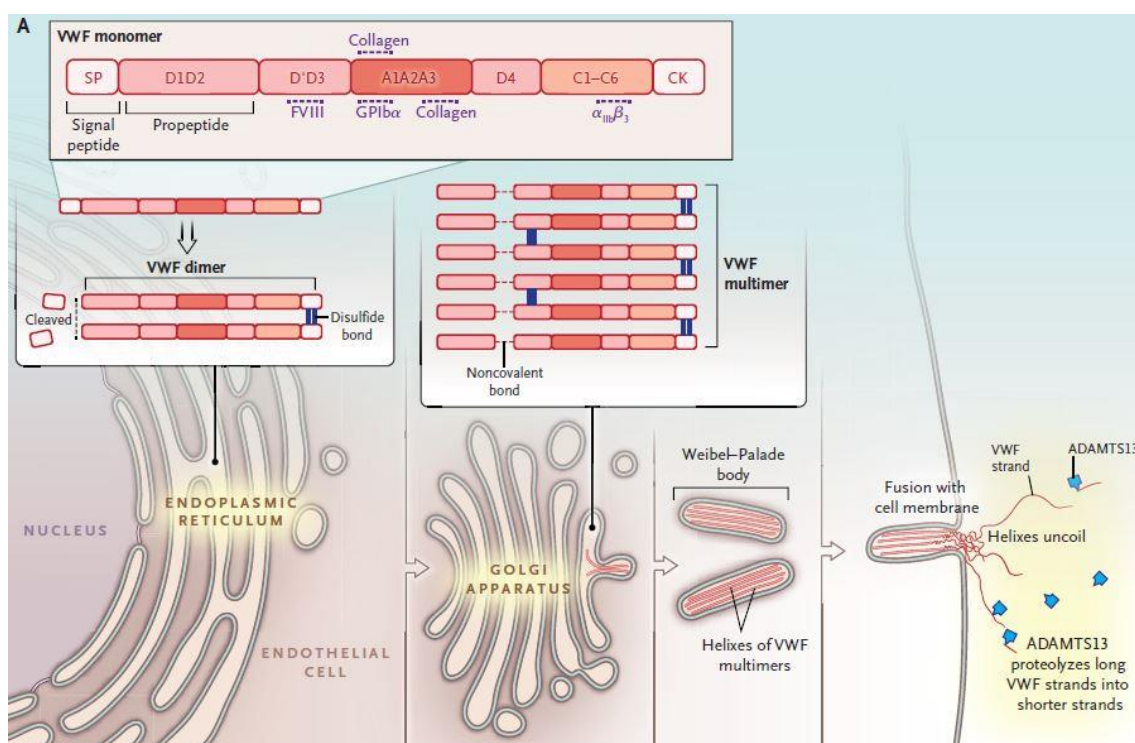
A von Willebrand faktort kódoló gén a 12-es kromoszóma rövid karján található, 52 exon és 179 kb nagyságú (6). A 22-es kromoszómán (22q11.2) egy 21-29 kb hosszúságú, nem funkcionális pseudogén azonosítottak, mely 97%-ban homológ a VWF gén 23-34. exonjaival, és az A1-A2-A3 doméneket kódolja (7). A pseudogén mutációs rezervoárként is szolgálhat, mely mutációk aztán a VWF lókuszra kerülhetnek. Több olyan silent mutációt azonosítottak a 27-es és 28-as exonokban VWB-ben, melyek szekvenciája megegyezik a pseudogén szekvenciával. A VWF gén transzkripciója során egy 8,9 kb nagyságú mRNS készül, melynek elsődleges terméke egy 2813 aminosav hosszúságú prekursor fehérje, a pre-pro-VWF. A prekursor fehérje áll egy 22 aminosav hosszúságú signal peptidből (exon 2-3), a 741 aminosav hosszúságú propeptidből (exon 3-18), valamint az 2051 aminosavból felépülő (exon 19-52) érett VWF alegységből (8). A faktort 4 ismétlődő domén alkotja a D, A, C és CK, a következő sorrendben D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK melyben a D1-D2 domén a propeptid szekvencia, a D' az érett fehérje első, a CK pedig az utolsó doménje (9). **(2. ábra)** A domének funkciójáról részletesen később lesz szó.



2. ábra: A VWF részletes domén szerkezete és a domének funkciója (9)

### 2.1.2.2. Post-transzlációs processing

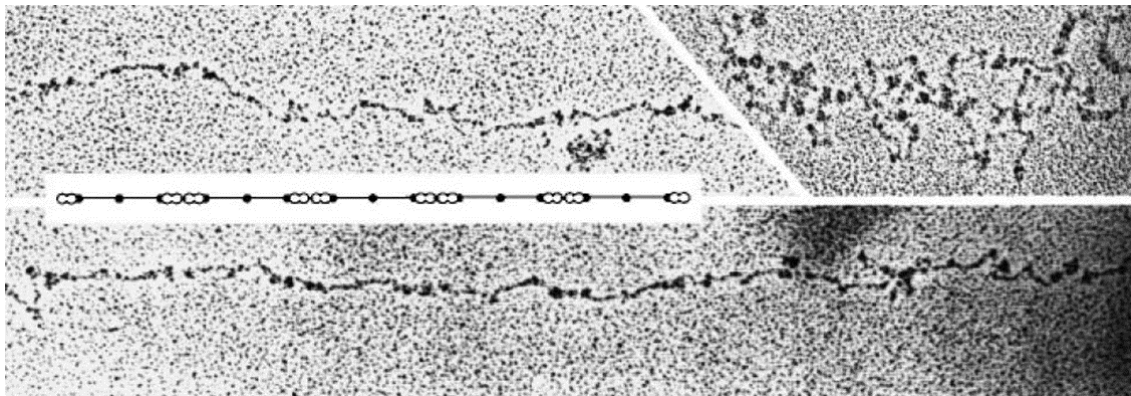
Transzláció és a szignál peptid lehasítása után a pro-VWF monomerek az endoplazmatikus retikulumban (ER) párosával dimerizálódnak (10-12). A dimerizáció a monomer C-terminális végén, az úgynevezett cystein knot (CK) doménekben (tail-to-tail végeken) történik diszulfid hidakon keresztül (a CK domén 87 aminosava 11 ciszteint tartalmaz, mely mind részt vesz a dimerizációban) (13, 14). A 11 ciszteinből 8 láncon belüli-, 3 pedig láncok közötti diszulfid hidakat hoz létre (Cys2771, Cys2773, and Cys2811) (15). A CK doménben bekövetkező mutáció a dimerizáció zavarához vezethet, ami gyakran, de nem kizárólag 2A/IIID típusú von Willebrand betegségben jelenik meg (16). Mielőtt a pro-VWF dimerek a Golgiban multimerizálódnának, mindenképpen N-glikoziláción kell átesniük, enélkül a monomerek az ER-ban maradnak és degradálódnak (3. ábra) (17, 18).



3. ábra: A VWF képződésének sematikus ábrája (18)

### 2.1.2.3. Multimerizáció

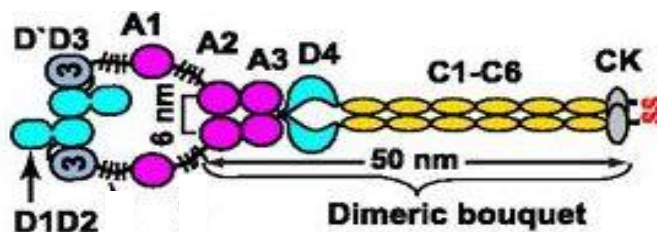
Az endoplazmatikus retikulumból a pro-VWF dimerek a Golgiba kerülnek, ahol megtörténik a multimerizáció, azaz a dimerek sokaságából a gerincesekben található leghosszabb protein keletkezik (4. ábra). A propeptid egységet (VWFpp) egy furin proteáz lehasítja az érett VWF dimerről (D1-D2 domén), majd a trans-Golgiban az alegységek a D3 domének közt létrejövő, az N-terminális (head-to-head) végüknél 'láncközi' diszulfid hidak segítségével multimerizálódnak. (18). Ebben a folyamatban a propeptid fontos szerepet játszik, a diszulfid isomeráz aktivitásával katalizálja a hidak kialakulását a D3 domének között. A propeptid mindkét D doménje tartalmaz CGLC diszulfid isomeráz konszenzus szekvenciát, mely a D3 doménben szintén jelen van. A Golgi apparátus alacsonyabb pH-jában, ez az oxidoreduktáz funkció, a CGLC szomszédságában lévő hisztidin protonizálódásával aktiválódik (19-21). A multimerizáció által egy viszonylag heterogén nagyságú VWF-ből álló pool jön létre, melyben a legkisebb egységektől a >60 egységből álló faktorig terjedhet (18). A multimerizáció mellett az érett faktor több glikoziláláson és szulfatálódáson is átesik még a Golgiban (22-24).



**4. ábra:** Mechanikus felszínhez rögzített VWF multimer. A dupla fehér gombócok jelölik a VWF dimerek határait (51)

#### 2.1.2.4. Tárolás

A von Willebrand faktor a thrombocyták  $\alpha$ -granulumaiban és az endothel sejtek Weibel-Palade testjeiben (WPB) tárolódik 1:1 arányban a non-kovelensen kötődő propeptiddel (25). Az  $\alpha$ -granulumokkal ellentétben, melyek a VWF-tól függetlenül is kialakulhatnak, a WPB (csak endothel sejtekben jelenlévő, 0,1-0,2  $\mu\text{m}$  hosszúságú és 4  $\mu\text{m}$  szélességű kompartment) csak VWF jelenlétében jöhet létre (26). A WPB kialakulásához mindenképp szükséges, hogy a VWF egy kompakt, összehajtogatott formát (csavart vagy cső) vegyen fel, mely hajtogatódás a kiindulási méret század része is lehet (27, 28). Az enyhén savas közegű WPB-ban a faktor a propeptid+D'-D3 doméneken keresztül kapcsolódik egymáshoz, kialakítva egy jobbra tekert helikális szerkezetet, a maradék A1-CK rész pedig egy összefonódó csokor szerű szerkezetbe hajtogatódik össze (5. ábra). Ez a lépés a WPB-ben a VWF érésének fontos lépése (29, 30). VWF a thrombocyták  $\alpha$ -granulumaiban is tárolódik, ez adja a plazma faktor tartalmának 10-20%-át (31, 32). Az itt található VWF a WPB-ban tárolthoz képest magasabb hemosztatikus aktivitással rendelkezik (33, 34).



5. ábra: A faktor csokorszerű szerkezete (34)

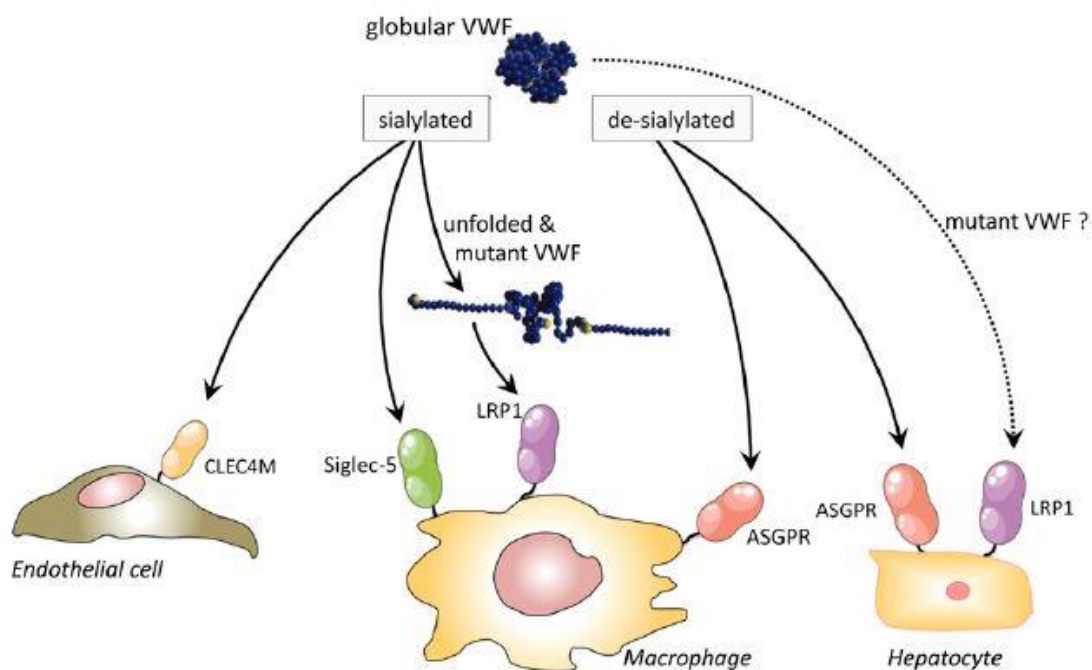
#### 2.1.2.5. Szekréció

A von Willebrand faktor különböző útvonalakon szekretálódik a véráramba az endothel Weibel-Palade testjeiből, valamint az  $\alpha$ -granulumokból. Az endothel sejtekből konstitutívan (90-95%), ill. szabályozott szekrécióval (5-10%), míg a thrombocytákból aktiváció révén szekrécióval. Aktiváció hiányában a WPB-k fuzionálnak és sejtfelszínre kerülve (kinezin/dinein mikrotubulusok mentén) basalis szekrécióval juttatják a vérbe és

a subendotheliumba az érett VWF-t (35, 36). A szekretált von Willebrand faktor molekulásúlyában is eltér, ugyanis a konstitutív szekréció döntően alacsony molekulásúlyú VWF-t (LW-VWF), míg az aktivált szekréció nagy molekulásúlyút (HW-VWF) eredményez (37). Az endothel exocitosisz nagyon összetett rendszer szabályozza, intracelluláris fehérjék sora (Rab és SNARE család tagjai, például RalA, Rab3, Rab27a, Rab15) vesz részt a WPB-k fúziójában (38-40). A szekrécióval egyidőben felbomlik a VWF „csokor” szerkezete, elongeált formát vesz fel és leválik a propeptid is. Az aktivációs útvonalon az általánosan ismert markereket lehet megnevezni, melyek kilövik a VWF-t a perifériára, ezek többek között a cAMP szintet emelő ágensek (epinephrin), intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szintet emelő (thrombin), valamint a gyulladásos és thrombotikus eseményekben fontos ágensként résztvevő hisztonok (41-43).

#### 2.1.2.6. VWF clearance

A VWF clearancét számos tényező befolyásolja, úgymint genetikai hatások, ABO vércsoport, életkor, a faktor különböző szializáltsági és glikoziláltsági állapota (és így a felszínre kerülő glükóz oldalláncok, mint lehetséges targete az ASPGR receptornak), azonban ezek részletezése túlmutat a dolgozat keretein. Immunológiai módszerekkel azonban több esetben megfigyelték, hogy a VWF főként macrophagok közelében található meg, melyből feltételezhető, hogy ezek valamilyen módon részt vesznek a faktor clearancében. Több kísérlet vizsgálta és bizonyította is ezt a kapcsolatot, melyek szerint a macrophagok nemcsak kötik a VWF-t, hanem endocytálják is azt, így segítve a lebontásukat a májban, ill. a lépben (44, 45). Ahhoz azonban, hogy a macrophagok hatásos munkát végezzenek, valamilyen receptoron keresztül fel kell ismerniük a VWF-t. A kisebb fontosságú receptorok mellett (Ashwell, Siglec-5, CLEC4 M) az az LRP1 (lipoprotein receptor 1, CD91) receptor játssza a főszerepet, amit korábban az FVIII receptoraként azonosítottak. Az LRP1, csak az elongeált VWF-hoz képes kapcsolódni, ez alól kivételek azok a konformációk, melyeknél a VWF kötési helye szabaddá válik (ennek fontos szerepe van a VWF különböző mutációiban, például a Vicenza típus R1205H esetében is). Az LRP1 működését bizonyítja az is, hogy a kódoló génjében történő változások kapcsolatban állnak a VWF szinttel is (**6. ábra**) (46-49).



**6. ábra:** A VWF sejt alapú clearance sematikus ábrája és útvonalainak lehetőségei (47)

#### 2.1.2.7. A doménszerkezet és a domének funkciója

Az érett VWF szerkezetét 4 ismétlődő domén alkotja a D (4 típus), A (3 típus), C (6 típus) és CK létrehozva az óriási >20000 kDa nagyságú proteint (concatamert). Mindegyik domén megfelelő működése szükséges ahhoz, hogy a faktor ellássa legfontosabb hemostatikus feladatait, úgymint a FVIII védelme a keringésben, kikötődés a sérült érfalhoz és a thrombocyták megragadása a sérülés helyén (50, 51). Részletezésben megadjuk a mai napig használatos domén nomenklatúrát és a felújítottat is (**2. ábra**) (9).

##### 2.1.2.7.1. D1-D2 domén, propeptid (VWD1-C8\_1-TIL1-E1- VWD2-C8\_2-TIL2-E2 subdomének)

A VWF első két doménjét, a D1-D2 domént a Golgiban furin hasítja le, azonban non-kovalensen továbbra is kötődik az érett faktorhoz és csak akkor válik le róla, amikor a faktor a keringésbe lökődik, vele equimolárisan (52). Funkciói közül kiemelendő a disulfid izomeráz és oxidoreduktáz aktivitása, mellyel a dimerek multimerizációját segíti, mindezt alátámasztja a propeptidben létrejövő mutációkor bekövetkező VWF tárolási és multimerizációs defektus is (53, 54). Kötőhelye az érett VWF D'-D3 doménjében van

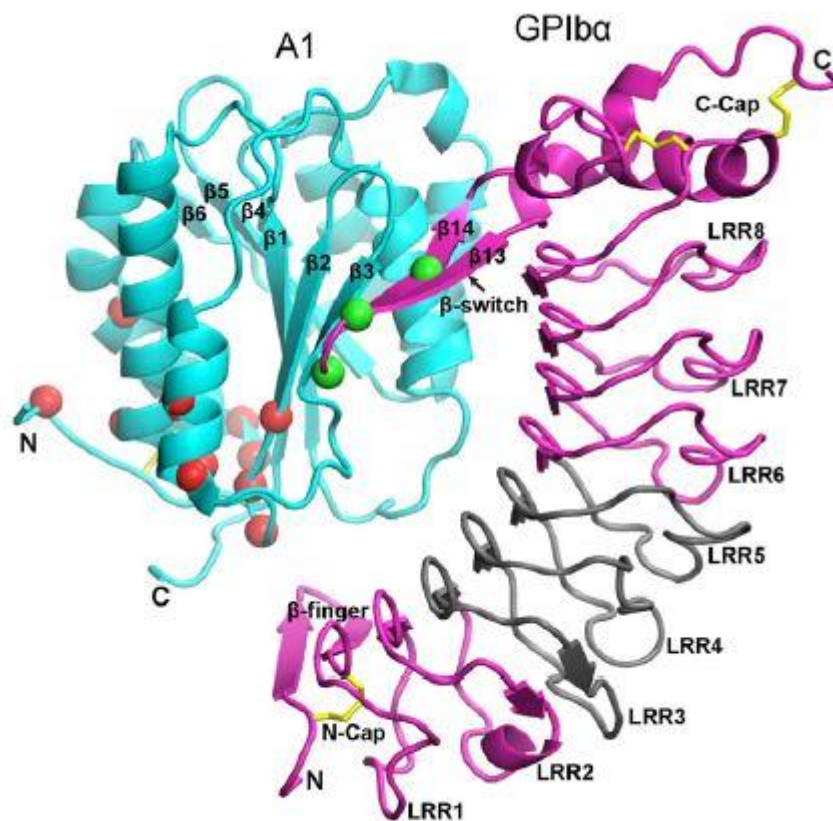
(55). Mérési lehetőségeit és szerepét a von Willebrand betegség diagnosztikájában később tárgyaljuk.

#### 2.1.2.7.2. D'-D3 domén (TIL'-E'-VWD3-C8\_3-TIL3-E3 subdomének)

Az érett von Willebrand faktor első 310 aminosava alkotja a D'-D3 domént, melynek legfontosabb feladata a FVIII védelme a proteolízistól (a már fent tárgyalt multimerizáció mellett). A FVIII egy nehéz, ill. egy hozzá non-kovalensen kötődő könnyű láncból áll. A VWF a nehéz lánc A3, C1 és C2 doménjéhez képes kötődni a saját D'-D3 doménjével (56). A FVIII C1-VWF D' domének között kialakuló kötés bizonyul elsődlegesnek és erősebbnek, míg a FVIII C2-VWF D3 a gyengébbnek (57). Több elektronmikroszkópos és tömegspektrofotométeres vizsgálattal sikerült a D'-D3 doménon belül pontosabban is meghatározni a kötődés helyét, ez pedig a TIL' subdomén (58). Bármely domén vagy subdomén hiánya, illetve a bennük bekövetkező mutáció erősen érinti a VWF FVIII kötő kapacitását (59, 60). Mérési lehetőségeit és szerepét a von Willebrand betegség diagnosztikájában később tárgyaljuk.

#### 2.1.2.7.3. A1 domén (A1 domén)

A thrombocyták egyetlen GPIIb $\alpha$  (thrombocytá GP Ib-IX-V komplex) receptor kötőhelye a von Willebrand faktor 219 aminosav hosszú A1 doménjében található, ez a kötés azonban csak nagy folyadék nyíróerő mellett vagy a VWF kollagénhez tapadásakor jöhet létre, ugyanis a natív VWF globuláris formában kering a véráramban, így az A1 régió hozzáférhetetlen (61, 62). A thrombocytá kapcsolódásához nagyban hozzájárul az A1 domén pozitív töltése, mellyel szemben a GPIIb $\alpha$  felülete erősen negatív töltésű. A doménon belül a thrombocytá 2 régióhoz kötődik be, az első egy ~1700Å hosszúságú leucin dús szakaszhoz erősebben, a második ~900Å nagyságú régióba gyengébben (50). Több kutatás leírta az A1 domén kollagénkötő szerepét (VWF:CB), bár e képesség jóval alacsonyabb aktivitású az I és III típusú subendotheliális kollagén esetén, mint az A3 doménben, azonban a non-fibrilláris kollagén VI esetén az A1 domént tekintjük elsődlegesnek. Bizonyos mutációk (pl.: Arg1308Leu) az A1 doménben, csökkentik a VWF:CB-t (7. ábra). (63-65). Ebbe a régióba kötődik be a heparin is, mely gátolja a GPIIb receptor bekötését (66, 67).



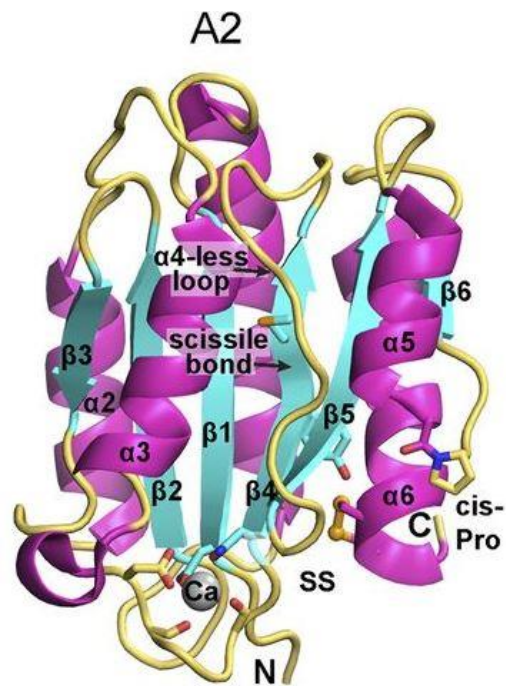
7. ábra: Az A1 domén kristallográf ábrája (34)

#### 2.1.2.7.4. A2 domén

A VWF A2 domén, mely 192 aminosav hosszúságú, nagyban homológ az A1 ill. A2 doménnel, azonban nincsenek se intradomén diszulfid kötése (szomszédos ciszteinek között alakulnak csak ki, ezzel jelentősen fokozva a faktor rigiditását és ellenállását a proteolízisnek) se  $\alpha$ 4-hélice (68, 69) (8. ábra). A domén szintén egyedülálló a VWA (A1+A2+A3 domének) domének között, hogy  $\text{Ca}^{2+}$  köt meg. Ennek szerepe jelentős a thermostabilitás biztosításában, a mechanikai védelemben, illetve a hajtogatódás elősegítésében (70). 2 órával a keringésbe kerülése után, az óriás multimerizált faktor hasításokon esik át, melynek helye az A2 doménben van, az ADAMTS-13 metalloproteáz (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13) a  $\text{Tyr}^{1605}$ – $\text{Met}^{1606}$  aminosavak között hasítja el a VWF-t (69). Ez a hasítás vágja hemosztatikusan optimális méretre a faktort. A hasítási hely mélyen a globuláris



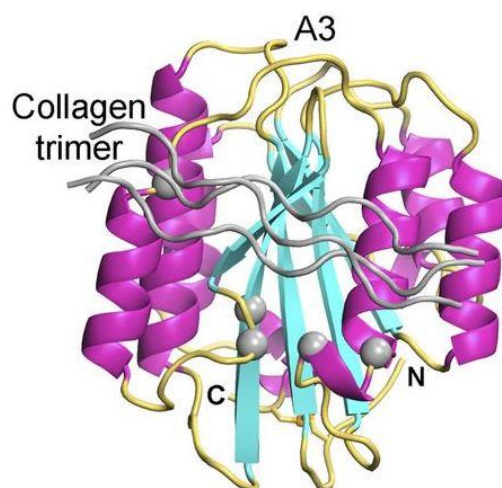
szerkezetben belül található, mint a faktor több funkciójának működéséhez, ennek feltárásához is szükséges a nagy nyíróerő (71-73).



**8. ábra:** Az A2 domén kristallográf ábrája (34)

#### 2.1.2.7.5. A3 domén

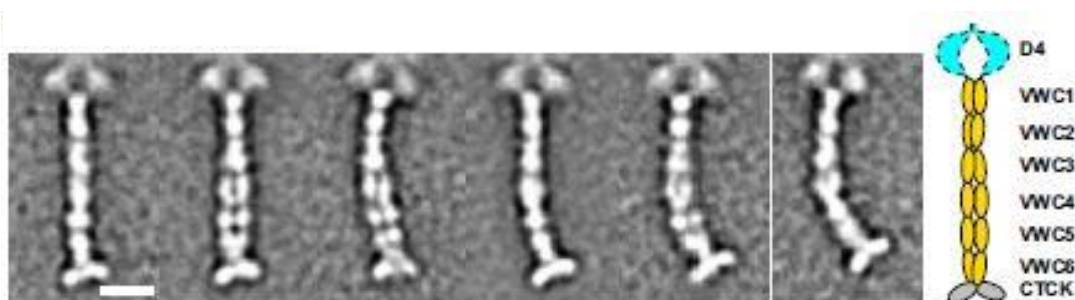
Az A3 domén 236 aminosav hosszúságú, struktúrájában homológ az A1 doménnel. Az I és III típusú kollagén fő kötőhelye, mely kötőhely a domén  $\beta$ 3-szála (**9. ábra**) (74, 75).



**9. ábra:** Az A3 domén kristallográf ábrája (34)

#### 2.1.2.7.6. VWC és CK domének (C1-C2-C3-C4-C5-C6 és CK(CTCK) domének)

A VWF C domén az egyik leggyakoribb „motif” a humán fehérjék között, 70 különböző proteinben 201 VWC domén található meg (például TGF- $\beta$  család). A 6 db C domén a dimer „csokorban” párosával helyezkedik el (VWC1-VWC1; VWC2-VWC2; VWC3-VWC3 stb), melynek bizonyítéka a 2 db  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin megkötése. A C4 domén legfontosabb feladata a thrombocyta  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrinek rögzítése, mely lassabb kinetikájú, mint a GPIb kötése, azonban tartósabb is (76, 77). A VWC2 és VWC3 domének közbeilleszkedik egy 4 ciszteint tartalmazó egység (2403-2429 aminosav), melynek stabilizálja a dimert, azonban túl kicsi, hogy önálló doménként számoljuk (78). A CK domén feladatát a még éretlen VWF post-transzlációs folyamatainál, a faktor dimerizációjánál tárgyaltuk részletesen, a ciszteinben gazdag régió, diszulfid hidakon keresztül alakítja ki a faktorra jellemző dimer formát (**10. ábra**).

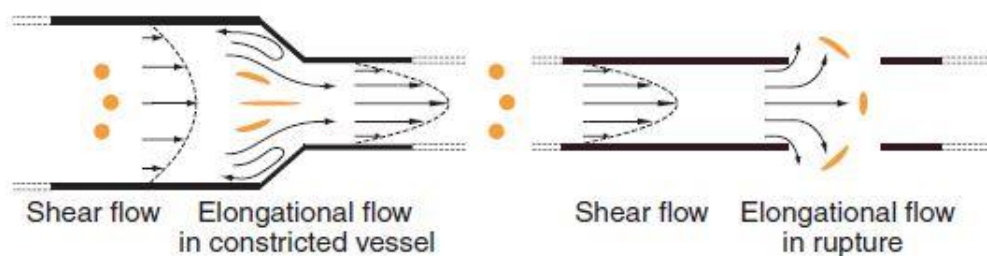


**10. ábra:** A C domének sematikus ábrája (34)

#### 2.1.2.8. A VWF fő mozgatója, a folyadéksúrlódás

Az érpályába való kiszabadulása utána a VWF működése nagyban függ a folyadékáramlástól és a nyíróerőtől. Sérülés esetén az áramlási viszonyok megváltoznak, az érfal közelében kisebb, attól távolodva az ér közepén pedig nagyobb sebességet mérhetünk, ennek megfelelően a folyadéksúrlódás ( $s^{-1}$ ) a fal mellett a legnagyobb, közepén pedig 0. A „normál” folyadékáramlás mellett meg kell különböztetnünk, az „elongeáló” folyadékáramlást, mely a sérülések helyén ill. a sérülésre adott válaszreakcióban létrejövő érösszehúzódkor jön létre (**11. ábra**). Az elongeáló áramlás hatása a faktor megnyúlásában nyilvánul meg, ugyanis ebben az áramlási formában a

nyújtóerő százszoros is lehet (79). Kritikus folyadéksúrlódás és nyírófeszültség mellett ( $\sim 50 \text{ dyn/cm}^2$ ) a VWF konformációja megváltozik ( $>5000 \text{ s}^{-1}$ ), az áramlás szélére (az érfal felé) sodródik, kitapad, majd globulárisból elongeált formát vesz fel (80-82). A kinyújtott forma teszi lehetővé a VWF addig fedett doménjeinek a megjelenését, ahogy fentebb tárgyaltuk, például az A1 domén thrombocytá kötésképesége is, ilyen formában aktiválódik (nem beteg, normál VWF esetében) (83).



**11. ábra:** A különböző típusú folyadékáramlások megjelenítése (83)

#### 2.1.2.9. A VWF regulációja, az ADAMTS-13 szerepe

A Golgiból kiszabaduló VWF a multimerizáció révén óriás protein formában van jelen a keringésben. Az óriás multimer hemosztatikusan „túl” aktív, ezért ebben a szokatlanul nagy formában (UL-VWFM, unusal large von Willebrand Factor Multimer) a ritka, de életveszélyes, thrombotikus thrombocytopeniás purpurát (TTP) okozhatja (84). Azonban ezt megakadályozandó, a faktornak van egy természetes inhibitora, az ADAMTS-13 metalloproteáz. Az enzimet dominánsan a hepatocyták termelik, koncentrációja a vérben átlagosan 5 nM körül mozog (85). Az enzim a VWF A2 doménben, a Tyr<sup>1605</sup>–Met<sup>1606</sup> aminosavak között hasítja el a faktort, ezzel a reakcióval gátolva a thrombusok képződését (86). A nagy folyadéksúrlódás emeli a hasítások számát, mert a kinyúló VWF-nál az A2 domének szabaddá, felszín közelivé válnak az enzim számára (87).

### 2.1.3. A betegség felosztása

A von Willebrand betegséget 3 nagy csoportba osztjuk be. Az 1-es és 3-as típusú VWB a betegség kvantitatív típusa, melyek a faktorszint mérhető értékeinek (melyekből a következőkben a von Willebrand faktor antigén szintre hivatkozunk, aminek a normál tartománya átlagosan 50-150 IU/dL) egységes csökkenésével járnak, 1-es típusban kevésbé (~30 IU/dL), 3-as típusban viszont súlyosan csökkentek ( $\leq 5$  IU/dL). A 2-es típus a betegség kvalitatív változata, ahol a már tárgyalt feladatok (FVIII kötés, kollagén kötése, thrombocyták kötése) valamelyike sérült, ezzel okozva tüneteket. A 2-es típuson belül megkülönböztetünk 4 alcsoportot aszerint, hogy a faktor mely funkciója változik meg, ezek a 2A, 2B, 2M, 2N. A 2A altípuson belül is létezik csoportosítás, ahol az alcsoport variánsait különböztetjük meg, ezeket római számokkal jelöljük, IIA, IIC, IID, IIE (1).

#### 2.1.3.1. 1-es típusú VWB

A leggyakoribb VWB, a betegséggel diagnosztizáltak között az előfordulása 70-80% körüli. A betegség fenotipikus megjelenése nagyon változatos, a faktorszintek az 5 IU/dL-s értéktől a 40 IU/dL környékéig terjednek (88). Öröklődése autoszomális domináns, az oki mutációk nagy része domináns negatív hatású missense szubsztitúció, melyek károsítják a VWF intracelluláris transzportját, a szekréciót vagy gyorsítják a clearancet. A legújabb kutatások szerint a betegség ezen típusát kiváltó okok komplexek, az esetek ~15%-ban nem egy mutációhoz köthetők és szerzett tényezőkkel (pl.: ABO vércsoport, etnikum, életkor) párosulva okozzák az alacsony laboratóriumi értékeket, azonban a betegnek diagnosztizáltak között csak ~65%-nál volt kimutatható genetikai eltérés (89, 90). A három leggyakoribb mutáció a Y1584C, mely heterozygota formában 40 IU/dL körüli értéket, míg homozygota formában 25 IU/dL közelit okoz, a R1205H, ami a Vicenza típust okozza, alacsony 10 IU/dL-es értékekkel, valamint a R924Q mely valószínűsíthetően egy polimorfizmus, nagyjából az 1-es típusú VWB 5%-ért felelős (91, 92).

Az 1-es típusú VWB-hez csatolva, de inkább mellette, mindenképp meg kell említeni az 1C variánst, illetve a diagnóziskor nehézségeket okozó „alacsony VWF” csoportot. Az 1C (C, mint clearance) variánsnál extrém gyors faktor kiürülés figyelhető meg.

Feltehetően a faktor már az intracelluláris érése során zavart szenved, például a C1130Y, R1315C mutációt tartalmazó VWF szekrécija és multimerizációja jelentősen csökkent, rontva így a kollagén és trombocytakötő képességet is. A C1130Y mutációnál, csökkent FVIII kötő aktivitást is észleltek, ami nem meglepő, ugyanis ez a mutáció a D3 domént érinti, ami a fő FVIII kötő domén a VWF-n belül (93).

A pontos diagnózist, így az esetleges kezelést is nagyban megnehezíti, ha a VWF értékek határértéken mozognak. A határérték vagy az alatti (40-50 IU/dL) eredmények ugyan nevezhetők patológiásnak, azonban ahogy előzőleg is tárgyaltuk, a VWF szintre több tényező is hatással van, például egy 0-s vércsoportú beteg antigén szintje 25-30%-al is alacsonyabb lehet. Ezen komplex hatások miatt az 1-es típusú VWB-nek tipizált betegek jó része tévesen 1-es típus (94). Az újabb irányelvek a 20 IU/dL vagy az alatti faktor szint, szignifikáns vérzési anamnézis és erős családi halmozódás meglétekor javasolják az 1-es típust diagnózisként, ha az értékek 30 IU/dL vagy afölött vannak, akkor érdemesebb az „határérték VWF” megnevezést használni a betegség helyett (95).

#### 2.1.3.2. 2-es típusú VWB

A betegség 2-es típusát a faktor egy vagy több funkciójának zavara okozza, ezért sérül az alapvető működése (96, 97). Legtöbb esetben a 28. exon mutációi okozzák a zavart. A következőkben az antigén szint mellett megjelenik több laboratóriumi paraméter is, melyeket itt csak felsorolunk, a „Laboratóriumi diagnózis” részben fogunk részletesen kifejteni, bízva az olvasó megfelelő előképzettségében. Thrombocyta kötő aktivitás (VWF:GPIbB), kollagénkötési aktivitás (VWF:CB), FVIII kötő aktivitás (VWF:FVIIIIB). A teljes VWB populációnak 10%-t teszi ki ez a típus (Olaszország: 9,6% vs. Irán: 3,4%), melynek öröklődése javarészt autoszomális domináns (95).

#### 2A altípus – IIA variáns

A IIA variáns a 2A altípus leggyakoribb előfordulási formája. A faktort érintő különböző mutációk miatt a faktor szintézise abnormális lehet, illetve az A2 domén felépítése is megváltozik, az ADAMTS-13 enzim hasítóhelye folyadéksúrlódási erők nélkül is a felszín közelébe kerül (mintegy kinyílik a faktor), ezért sokkal érzékenyebbé válik az enzim általi hasításra (98). A fokozott proteolízis miatt a hemosztatikusan legaktívabb nagy molekulású multimer (HMWM) hiányoznak a keringésből, így kevésbé

képesek kitapadni a kollagénhez, ezzel okozva vérzéseket. Genetikai hátterük felderítésekor a leggyakoribb mutációknak a missense mutációkat találták, kutatások során több mint 30-t írtak már le eddig. Azon mutációk, amik az A2 domént érintik, gyakran együtt károsítják a szekréciót és erősítik a proteolízist. Az a G1629E és R1597W a leggyakoribbak ezek közül (99).

#### 2A altípus – IIC variáns

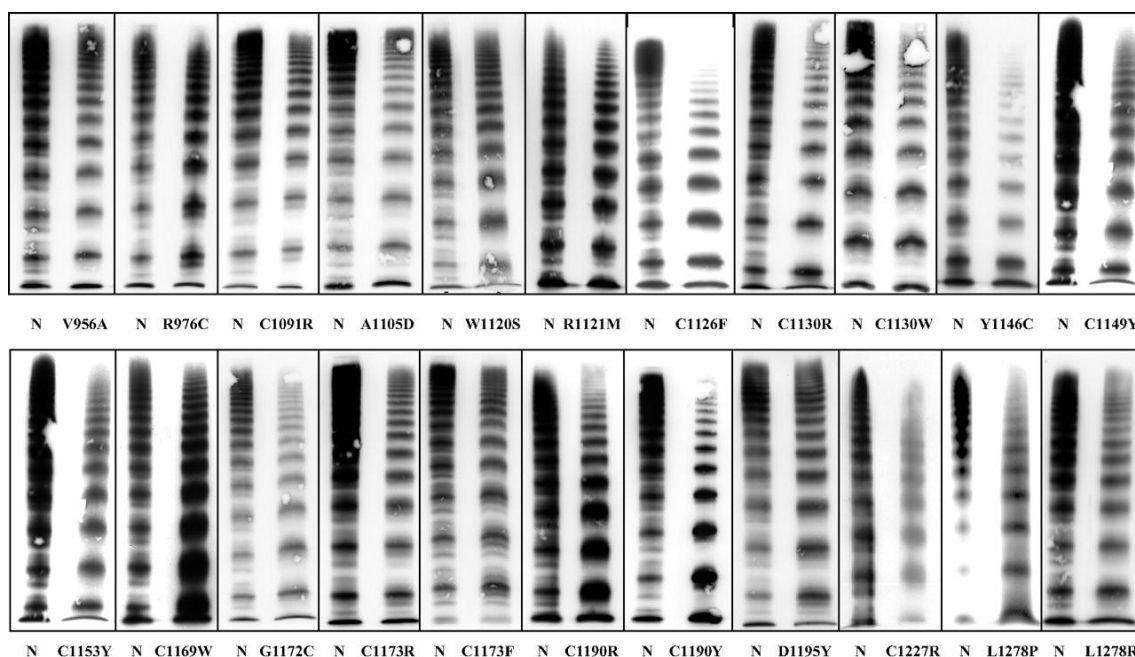
Recesszív öröklődés, alacsony antigén szint, alacsony VWF:GPIIB, a proteolitikus fragmentek hiánya és a HMWM hiánya jellemzi (ezek alól a Miami-IIC kivétel a domináns örökléssel és megemelkedett antigén értékkel). A mutációk a faktor N-terminálisát jellemzik (homozygota formában a propeptid D2 doménben is megtalálhatók, ismervé a propeptid katalitikus szerepét a multimerizációban), ezáltal a dimerek multimerizációját gátolják (100). Ahogyan a faktorban megjelenő aberranciák jelentős részéről elmondható, úgy itt is, a zavarok a ciszteineket érintik legfőképp és így a diszulfid hidak létrejöttét gátolják. Példaként megemlíthető egy leírt p.N528S mutáció, mely blokkolja a propeptid bekötődését, így akadályozva a faktor transzportját a Weibel-Palade testekhez (101, 102).

#### 2A altípus – IID variáns

A faktor C-terminális végén a cisztein csomóban lévő missense mutációk okozzák (51 és 52. exon), rontva a monomerek poszt-transzlációs dimerizációját és kialakítva a tipikus multimer mintázatot (14).

#### 2A altípus – IIE variáns

Általánosságban elmondható, hogy a 2A altípuson belül 30%-ban előforduló IIE variáns nagyon heterogén csoport, mind laboratóriumi eredményeket tekintve (akár normál tartományú antigén értékek is lehetnek), mind a klinikai manifesztációt vizsgálva. Ennél a variánsnál, a IIC-hez hasonlóan, csökkent proteolízis figyelhető meg, mely abnormális multimer struktúrát okoz (néhány esetben azonban óriás molekulásúlyú multimerek is megfigyelhetők), de számottevő a fél-életidő rövidülése is. A szekréció hibája és az intracelluláris degradáció is jelentős (**11. ábra**). Mutációk (frameshift) a D3 domént érintik (p.Y1146C leggyakoribb) (103-105).



**12. ábra:** 2A/IIIE variáns VWB-k multimer képei. A 'N' a normál plazma, mellette pedig a betegséget érintő mutáció (104)

### 2B altípus

Az autoszomális dominánsan öröklődő gain-of-function mutáns VWF spontán (fokozott nyíróerő nélkül) nagy affinitással kapcsolódik a thrombocyta GPIIb $\alpha$  receptorához, mely a várt thrombotikus reakcióval ellentétben, a faktor és a vérlemezke fokozott kiürüléséhez vezet (106). Az A1 domént érintő zavarok esetében, az előbb tárgyalt altípusokhoz hasonlóan, megjelenik a fokozott ADAMTS-13 proteolízis és így a HMWM redukció is, ami a multimer analízisen fokozott sávokként jelenik meg (107). Az emelkedett hasítás okaként több folyamatot is hipotetizáltak: a spontán GPIIb $\alpha$  kapcsolódást, az ADAMTS-13 iránti fokozott szenzitivitást, valamint e kettő jelenlétét egyszerre (108). Kutatások szerint a mutáns VWF indukálta vérlemezke kötés nem indítja be ugyanazt a szignál és aktivációs folyamatot, ami szükséges  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 integrin kapcsolódásához és működéséhez (109, 110). A faktor A1 doménjében, azon belül is a C1272 - C1458 hurokban található

a legtöbb mutáció, melyek közül a R1306W, R1308C, V1316M és R1341Q, mely a 2B altípus 90%-ért felelős (111).

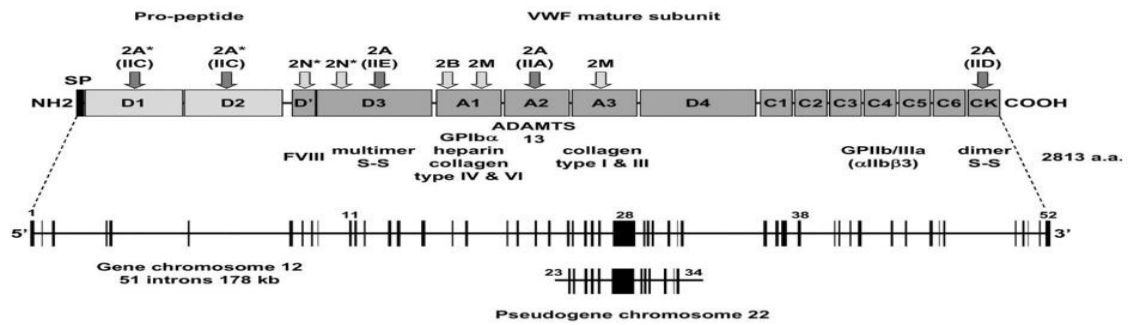
#### 2M altípus

Az A1 doménben úgy is kialakulhat mutáció, hogy az nem vagy csak minimálisan változtatja meg a multimer mintázatot (**2M**, mint normál **m**ultimer), ellenben a VWF:GPIbB jelentősen csökken, bizonyos esetekben pedig a VWF:CB is (A3 doménben lévő missense mutáció miatt)(112). A betegség ezen típusa heterogén csoport klinikai manifesztációjában, a kapott laboratóriumi értékek sokszor nem korrelálnak a „bleeding score” által megállapított vérzések súlyosságával (113). A leggyakoribb mutációk a S1358N, S1387I és S1394F, valamint a VI. kollagénkötést is érintő Q1402P, detalálható in-frame deléció is (114). A 2M altípust sokszor nehéz különválasztani az 1-es típustól, de az alacsony GPIbB/Ag arány jellemzőbb erre a csoportra (112).

#### 2N altípus

Recesszíven öröklődő Normandy típusú VWB. A normál VWF értékek és normál/közel normál multimer mintázat mellett, csökkent (5-40%) FVIII szint figyelhető meg, mely alapján gyakran összekeverik férfiak esetében az A hemofiliával (115). Mutációk a VWF FVIII kötő régióját a D'-D3 domént érintik (exon 18-27) (**13. ábra**), sok esetben rontva az elektrosztatikus interakciót a VWF és FVIII között (116). Az egyik ritka, de a legsúlyosabb mutáció az E787K, ahol a FVIII szint <1% alatti, a leggyakoribb pedig a 20. exonban lévő R854Q (117, 115). Az esetek felében a betegek homozygoták az érintett mutációra, 10%-ban compound-heterozygoták kettő 2N mutációra nézve, 40%-ban pedig a 2N mutáció egy második ismeretlen mutációra compound-heterozygota. A heterozygota betegek laborparaméterei a normál értékekhez közeli és vérzéseik enyhébbek (111).





**13. ábra:** A VWB megoszlásának sematikus ábrája a VWF domének között (176)

### 2.1.3.3. 3-as típusú VWB

A von Willebrand betegség legsúlyosabb és legritkább formája a 3-as típus. Az 1-es típushoz hasonlóan a VWF kvantitatív zavara lép fel, azonban itt a faktorszintek 5% alatt maradnak, mivel a homozigóta vagy compound-heterozygota null allél mutációk miatt nem fejeződik ki a faktor. Öröklődése autoszomális recesszív, családi halmozódások figyelhetők meg, ahol szülők vagy magasabb szintű felmenők között gyakran valamilyen fokú rokonság áll fent. Kutatások szerint a leggyakoribb mutációk a nonsense mutációk (30%), kis deléciók (20%), nagy deléciók (10%), splice site mutációk (10%) és a kis insertiók (10%). A mutációk mintegy ötöde a 28. exont érinti a maradék 80% eloszlik a teljes génen (118). A többi típushoz hasonlóan sérülést szenvedhet a dimerizáció, multimerizáció, illetve a clearance is (119-122). Homozigóta nagy deléciók esetében megfigyeltek alloantitest (inhibitor) képződést, azonban ez a fenomén a magyar 3-as típusú VWB populációban nincs jelen (123, 124, 122).

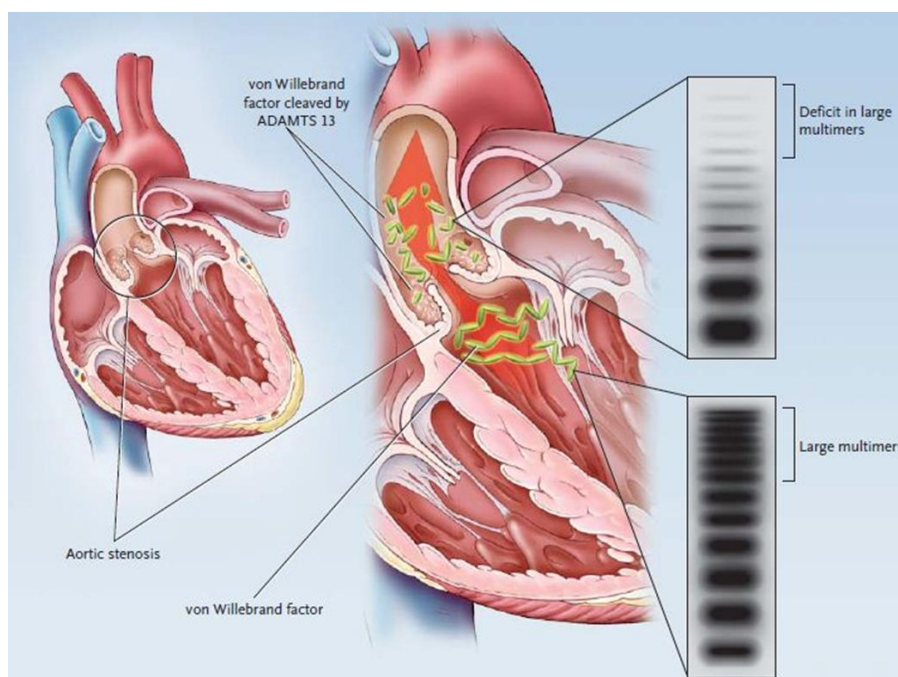
### 2.1.3.4. Különlegességek

#### Thrombocytá típusú von Willebrand betegség (PT-VWD)

A valójában nem direktben a VWF-ban megjelenő betegség, autoszomális dominánsan öröklődő zavar, melyet a GPIBA génben megjelenő gain-of-function mutáció okoz, így a thrombocytá GPIIb/IIIa receptora fokozottan érzékennyé válik a VWF A1 doménjével való kapcsolódásra (tulajdonképpen reverz 2B VWB) (125). A 2B típusú VWB-hez hasonló tünetek jelentkeznek a PT-VWD betegeknél is, közepes fokú vérzések és thrombocytopenia (a thrombocytá+VWF komplex gyorsabban ürül ki a szervezetből) (126, 127).

## A szerzett von Willebrand szindróma (AVWS)

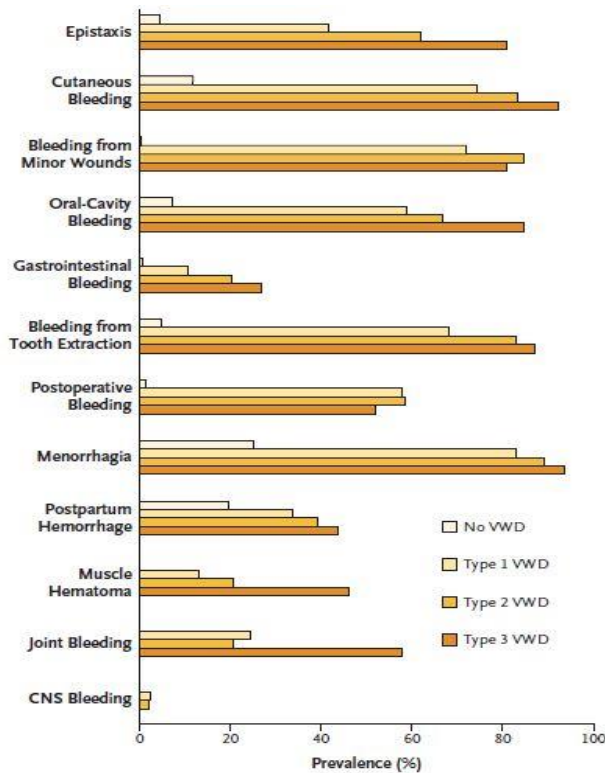
A AVWS egy ritka (inkább ritkán felismert) vérzékenység, melynek oka a VWF működésének szerzett deficienciája (128). Előidéző alapbetegségei a különböző lympho- és myeloproliferatív (pl.: MGUS, CML, esszenciális thrombocytemia) hematológiai megbetegedések, cardiovascularis elváltozások (pl.: aorta stenosis, LVAD – Left Ventricular Assist Device), autoimmun betegségek (pl.: SLE), valamint nem csoportosítható megbetegedések (pl.: fertőzés mediálta, gyógyszer indukálta, vagy idiopátiás) (129-132). A betegség kialakulása általánosan négyféleképpen történhet a faktort alapulvéve: a; csökkent szintézis (pl.: súlyos hypothyroidismus), b; inhibitor csökkenti (B-sejtes lymphoma, myeloma multiplex), c; HMWM adszorpciója (essentialis thrombocytaemia), d; nagy nyíróerő indukálta proteolízis (műszív, műbillentyű) (133-138) (**14. ábra**). A szerzett von Willebrand szindróma diagnosztikája, az öröklött VWB-hoz hasonló tünetek miatt nehézkes, azonban a megfelelő családi anamnézis felvétele és a kiváltó alapbetegség felismerése nagyban segítheti a klinikust (139, 140).



**14. ábra:** Az aorta stenosis miatt megváltozó rheológiai viszonyokban a VWF fokozott ADAMTS-13 hasításnak van kitéve, így hiányzik a HMWM ezekben a betegekben (137)

#### 2.1.4. A betegség tünetei

A betegség klinikai megjelenése és a vérzések erőssége eltér a három típusban, valamint korrelál a mért faktorszintek értékeivel. Az 1-es típus 25-30 IU/dL értékei mellett a vérzések közepes erősségűek, míg a jelentősen csökkent 2-es illetve 3-es típusban jóval erősebb, életet veszélyeztetők is lehetnek (113, 141). Legjellemzőbbek az orr-, bőr- és nyálkahártyavérzések, melynek legsúlyosabb formája lehet a gastrointestinalis vérzés is. A beteg első tünetei közé tartozhat a könnyen szerzett bőrvérzés és a foghúzás után hosszan elhúzódó vérzés, illetve tonsillectomia alatt/után erősödő vérzés (18. ábra). Az esetek nagy számában fordul elő valamilyen műtéti beavatkozás utáni postoperatív vérzés. A nő betegek 60%-ban a menorrhagia az egyik legfontosabb tünet, mely vashiányos anaemiát is okoz (142). Terhesség alatt vérzések ritkán jelennek meg, ugyanis a terhesség emeli a VWF szintet, azonban a post-partum VWF csökkenés miatt, a vérzés elkerülésére szükséges lehet a kismamák VWF értékeinek monitorozása és faktorpótlása. 2B altípusban a szokásosnál is nagyobb thrombocytopeniát figyeltek meg terheseknél (143-146).



15. ábra: A vérzések megoszlása típusonként Eikenboom szerint (17)

### **2.1.5. Epidemiológia**

A betegség epidemiológiája több tényezőtől is függ, például a geográfiai elhelyezkedéstől (déli országok emelkedő incidenciája), a betegséget felismerő klinikustól és a beteg mintáját elemző laboratóriumtól (pl.: tesztek cut-off értékeinek meghatározása), de legfőképpen a VWB definíciójától. A hemosztázis centrumokban, tisztán a tünetek megjelenése alapján az incidencia 23-110/1 millió lakosra tehető (147). Azonban, ha ezt a meghatározást kiterjesztjük és a tünettől rendelkező betegek mellett a rokonokat is vizsgáljuk, valamint a vérvéseket nem produkáló, azonban alacsony VWF értékű „betegeket” is bevonjuk, akkor az eredmény eléri az 1%-ot (vs. előző érték max 0,01%) (148, 149). Általánosságban elmondható, hogy a betegség a populáció 1%-ban van jelen (150).

### **2.1.6. A VWB laboratóriumi diagnosztikája**

A betegség laboratóriumi diagnosztikája és a VWF analízise összetett feladat, melyek jelentős részét csak speciális laboratóriumok, illetve hemosztázis centrumok végzik. A teljes és részletes vizsgálati paletta az alapvető (FVIII:C) teszteket, melyeket a legtöbb magyar laboratórium végez(hetné), a nehezebben kivitelezhető és értékelhető teszteket (VWF:GPIbB változatai, VWF:CB és a valódi RIPA), valamint a legbonyolultabb, speciális felszerelést és képzett személyzetet igénylő (multimer analízis, VWF:FVIII) vizsgálatokat tartalmazza. A továbbiakban egy „ideális” von Willebrand faktor vizsgálati panel elemeivel, azok diagnosztikai értékeivel és lehetőségeivel foglalkozunk, amely magába foglalja az antigén szintet, a kollagénekötési aktivitást, a GPIb kötési aktivitást (és annak változatait), a multimer analízist, a FVIII kötési aktivitást, valamint az FVIII koncentrációt is. Végül néhány mondatban érintjük a kiegészítő teszteket is (VWFpp, RIPA, PFA-100).

#### **2.1.6.1. A VIII. faktor szint**

A von Willebrand betegség diagnosztikájának legelső lépése (az aPTI mérés után) a VIII. alvadási faktor szintjének a meghatározása. A legáltalánosabban elterjedt, teljesen automatizált mérési módszer az egylépcsős koagulációs vizsgálat, mely a beteg plazmáját a FVIII-ra nézve deficiens plazmával keveri, majd az előre meghatározott és bemért

kalibrációs görbéről (idő és abszorbancia arányában) „leolvasva” adja meg a FVIII szintjét (151). Az utóbbi években elterjedt a kétlépcsős FVIII vizsgálat, ami egy kromogén alapú teszt. Ennek automatizáltsága szintén megoldott, és maga a teszt szükséges is az új FVIII készítmények monitorozásához, azonban az egylépcsős teszthez képest lényegesen drágább, a reagens stabilitása sokkal gyengébb, valamint az itt tárgyalt VWB diagnosztikához jelenleg nem ad plusz információt (152, 153). A FVIII szintje a VWF típusaiban változik, az 1-es típusban mérsékelt 30% körülinek mondható, a 3-as típusban 5% alatti, ezekben korrelál a többi VWF értékkel, a 2-es típusban variábilis, nem feltétlen ad patológiásan alacsony értéket. Ez alól kivételt képez a már részletezett 2N altípus, ahol a FVIII értéke az A hemofiliás betegek értékeihez hasonló, gyakran egyszámjegyű, a specifikus aktivitás (FVIII/VWF:Ag) pedig <0,6 értéként határozható meg (154, 116).

#### 2.1.6.2. von Willebrand antigén szint

Amikor a klinikusban felmerül a VWB gyanúja, a FVIII mérés mellett a VWF szintjének a meghatározása alapvető lépés. A kereskedelmi forgalomban kapható és jól automatizált teszteknek két fő ága létezik: a latex alapú immunológiai tesztek (LIA), valamint az ELISA tesztek. A LIA teszteknel egy latex gyöngyöt mesterségesen VWF ellenes antitesttel fednek be, ami hozzátapad a beteg mintájában lévő VWF-hoz. Az így kapott agglutináció okozta fotometriai (immunturbidimetria) változásokból az alvadási automata szoftvere kiszámolja a protein szintjét a beteg plazmájában. Bizonyos LIA tesztek hátránya, hogy interferálhatnak a beteg mintájában lévő magas rheumafaktorral, így adva fals magas értéket, ami egy 1-es vs. 2-es típusú VWB diagnózisának felállításakor jelentős nehézséget okozhat (155). Ennek a diagnosztikai hátrányosságnak a kiküszöbölésére lehet alternatíva a VWF:Ag meghatározásához az ELISA alapú teszt, melynek elmélete megegyezik bármelyik más elem kimutatásához használt ELISÁéval. A 96 lyukú microplate tálca lyukai VWF ellenes antitesttel vannak fedve, erre kerül a standard sor és kontrollok mellé a beteg mintája, majd többszörös mosási és elsődleges, illetve másodlagos antitestes jelölések után, a standard sor adta kalibrációs görbéről leolvasható a VWF antigén szintje (156, 157). A legkisebb detektálási alsó határértékkel (LLOD: 0,5%), legkisebb „inter-assay” variabilitással (CV:~5%) a legújabb kemilumineszcenz technika (CLIA) rendelkezik (isoluminollal jelölt, hidrogén-

peroxidokkal katalizált folyamat)(158). Ez a teszt azonban még csak egyetlen gyártó egyetlen platformján érhető el, ennek megfelelően az ára is magasabb az elérhető konvencionális tesztekénél (159, 160). LIA mellett a teszt gyorsasága és könnyebb indíthatósága szól, mivel ELISA tesztek általában a laboratóriumok nem indítanak sürgősséggel, és a mérési idejük is több órát vesz igénybe.

A VWB-ben az antigén szint, betegségtípustól függően, a normáltól a detektálhatatlanig terjedhet. 3-as típusban a FVIII:C-val párhuzamban 5 IU/dL alatti eredményeket kapunk, azonban a 2-es típusban gyakran normál, közel normál érték is előfordulhat. Ezeknek az eredményeknek megfelelően a specifikus aktivitások 2-es típusban 0,6 alatti értéket mutatnak (161).

#### 2.1.6.3. von Willebrand kollagénkötési aktivitás

A kollagénkötési aktivitás egyike azon teszteknek, amit a magyar hemosztázis laboratóriumok kevés kivételtől eltekintve (már például a DE Klinikai Központ, DPC, SE) nem mérnek, ennek oka valószínűleg a tesztek standardizálatlansága, finanszírozatlansága, illetve sokszor az IVD minősítés hiánya. Azonban ahhoz, hogy a faktor zavart működésének lehető legnagyobb részét lefedjük vizsgálati panelünkkel, ajánlott a kollagénkötést is vizsgálni. A legelterjedtebb tesztek ELISA alapúak, ahol a microplate kollagénnel van fedve, amihez a beteg VWF-a hozzátapad, (kóros esetben nem tapad) majd többszörös mosási, jelölési szakasz után megtörténik a spektrofotometriás jel detektálása, illetve az eredmények leolvasása a kalibrációs görbéről, kontrollok mellett (162, 163). A VWF:CB tesztek kiválasztásánál és felhasználásánál fontos kérdés a fedő kollagén típusa. A legtöbb kereskedelmi forgalomban kapható ELISA teszt I-es vagy III-as típusú kollagénnel van fedve humán vagy placenta eredetből, esetleg mindkettővel kevert formában (95%/5%). Ennek jelentősége abban áll, hogy bizonyos mutációval rendelkező betegek szelektíven kapcsolódnak a kollagénnel. Például a R1399H mutációval rendelkező 2-es típusú VWB faktora a VI-s típusú kollagénnel, míg az R1315C mutációval rendelkező 2-es típusú VWB faktora a IV-es típusú kollagénnel nem kapcsolódik, ezért a betegek vérzéses tüneteket mutatnak (164-166). Ezen betegpopulációk azonban Magyarországon nem fordulnak elő, javarészt az USA afro-amerikai von Willebrand betegek között jelennek meg. A legújabb fejlesztésű kollagénkötési teszt a CLIA rendszerben, szintén csak egy platformon érhető el, ennek

érzékenysége a legjobb az elérhető tesztek közül (158, 167). A VWF:CB teszt használatának potenciális haszna a betegség típusok/altípusok differenciálásában van. 1-es, 3-as típusban és a 2N altípusban, mivel sem thrombocytakötő, sem kollagénkötő aktivitás nem sérült, ezért a többi mért VWF értékkel arányosan kell csökkennie (3-as típusban gyakran detektálhatatlanul alacsony), így a specifikus (VWF:CB/VWF:Ag) aktivitás itt  $\approx 1$ . 2-es típusú betegekben, azon belül is a 2A és 2B altípusban, ahol a HMWM erősen csökkent ott a kollagénkötési aktivitás is alacsony lesz, hiszen a HMWM hiányában a VWF hemosztatikus aktivitás erősen redukált, a specifikus aktivitás 0,6 alatt marad. A 2M altípusban, ahol mutációk érinthetik a kollagén kötést, normál vagy alacsony érték lehet (168)

#### 2.1.6.4. von Willebrand faktor thrombocytakötő aktivitás

A VWB diagnosztikájában az antigén szint vizsgálata mellett a legelterjedtebb mérési módszer a faktor thrombocytakötő képességének különböző metodikákkal történő mérése. Annak ellenére, hogy a legtöbb faktorkoncentrátum adagolásának is ez az érték az alapja, a thrombocytakötő aktivitás a leginkább variábilis, labor-, reagens-, automata- és személyzetfüggő módszer, a multimer analízis mellett (169, 170). Ezen problémák és az így kialakult diagnosztikai bizonytalanságok miatt, a reagens gyártók többféle úton fejlesztették a reagenseiket, melyek így, bár a végponton egyeznek, eltérő hatásmechanizmus mentén mérik a VWF thrombocytakötő képességét. Ezek után nyilvánvalóan nem lehet őket továbbra is a konvencionális ristocetin kofaktor aktivitásnak (VWF:RCo) nevezni, többek között azért sem, mert több reagens már nem is tartalmaz ristocetint. Ezért 2014-ben a Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság (ISTH) megalkotott egy új nomenklatúrát, melyet a dolgozat további részében használni fogunk (171).

**1. táblázat:** Az új VWF aktivitási nomenklatúra (171)

VWF aktivitás rövidítése	Leírás
VWF:RCo	Minden teszt, ami ristocetint és thrombocytát használ
VWF:GPIbR	Minden teszt, ami ristocetin indukálta VWF kötődést és vad típusú rekombináns GPIb fragmentet használ
VWF:GPIbM	Minden teszt, ami spontán VWF kötődést és gain-of-function mutáns GPIb fragmentet használ
VWF:Ab	Minden teszt, ami monoklonális antitestet használ az, ami a VWF A1 epitópba kötődik be

von Willebrand ristocetin kofaktor aktivitás

A ristocetin kofaktor aktivitás a thrombocytakötő vizsgálatok ősanja, melyet elsődlegesen csak a von Willebrand aktivitásnak neveztek (lévén más nem volt). Elve, hogy az előzetesen antibiotikumnak szánt ristocetin bekötődik a VWF-ba ezzel olyan konformáció változást idéz elő, hogy az A1 domén kötni tudja a thrombocytát (ahogy már tárgyaltuk, a natív faktor nem képes kötni a thrombocyta GPIb $\alpha$  receptorát, csak ha a folyadékáramlás megváltoztatja a VWF szerkezetét) (172, 173). A mérés nehézségét és pontatlanságát, a ristocetin pontos dózisének meghatározása mellett, a thrombocyták minősége adja, melyek lehetnek formalin fixáltak, liofilizáltak, valamint natívak.

A VWF:RCo a fent említett reagens problémák miatt a mérések standardizálása nehézkes (ristocetin minősége LOT-onként is változhat), alacsony szenzitivitással és nagy szórással (~10%) bír, alsó mérési határa pedig 10% (az eredeti protokoll módosításával ez csökkenthető), ami megakadályozza a súlyos VWB differenciálását. Az elérhető tesztek itt is automatizáltak, legelterjedtebbek az thrombocyta agglutinációs és ELISA alapú tesztek (174, 175).

Ristocetin indukálta GPIb kötés

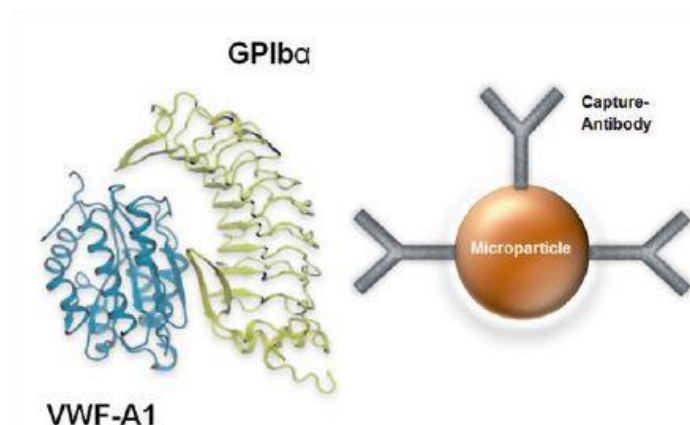
Bár a rendszerben még szerepel a ristocetin, de kivettek egy fontos változót, a thrombocytát, amit pedig magával a GPIb fragmenssel helyettesítettek, innen kapta az



elnevezést is VWF:GPIbR. Ezt a fragmenst pedig hozzá lehet kötni egy ELISA platehez, egy latex vagy egy mágneses partikulumhoz és agglutinációs, immunturbidimetriás, illetve kemilumineszcenzs metodikával a kötés aktivitását számszerűsíteni lehet (176). Ezzel a módosítással a LLOD-t 0,5%-ra lehet leszorítani, valamint a CV értéket is 5% körülire csökkentették (177, 178). Két dologgal azonban még mindig számolni kell, az egyik még mindig a ristocetin, a másik pedig a GPIb fragmens, melynek származási helye gyártóról gyártóra változik (179).

#### Gain-of-function mutáns GPIb kötés

További fejlesztés és előrelépés az aktivitás meghatározásában, ha kivesszük az utolsó variábilis elemet, a ristocetint a reagensből. Erre megoldás a gain-of-function mutáns GPIb (VWF:GPIbM) aktivitás, ahol a thrombocyta fragmensbe olyan mutációkat „építettek” be, mellyel ristocetin nélkül is képes kötődni (a PT-VWD-hez hasonlóan) az intakt VWF-hoz (természetesen a patológiás VWF-t ezt sem köti), valamint érzéketlenné vált a fals alacsony értéket adó polymorfizmusokra (180). Ezt a mutáns fragmenst latexhez, valamint micoplate tálcához is lehet rögzíteni, és így a szokásos immunturbidimetriás és ELISA protokollok alapján elvégezhetőek a mérések (181-183). A VWF:GPIbM aktivitás LLOD 2%, a CV értéke pedig: 2-5% között mozog (180, 184, 185).



**16. ábra:** A VWF:GPIbM hatásmechanizmusa. Az anti-GPIb antitesttel fedett mikropartikulum kötődik a gain-of-function mutáns GPIb-hez. Ez a komplex spontán kötődik a VWF A1 doménhez (184)

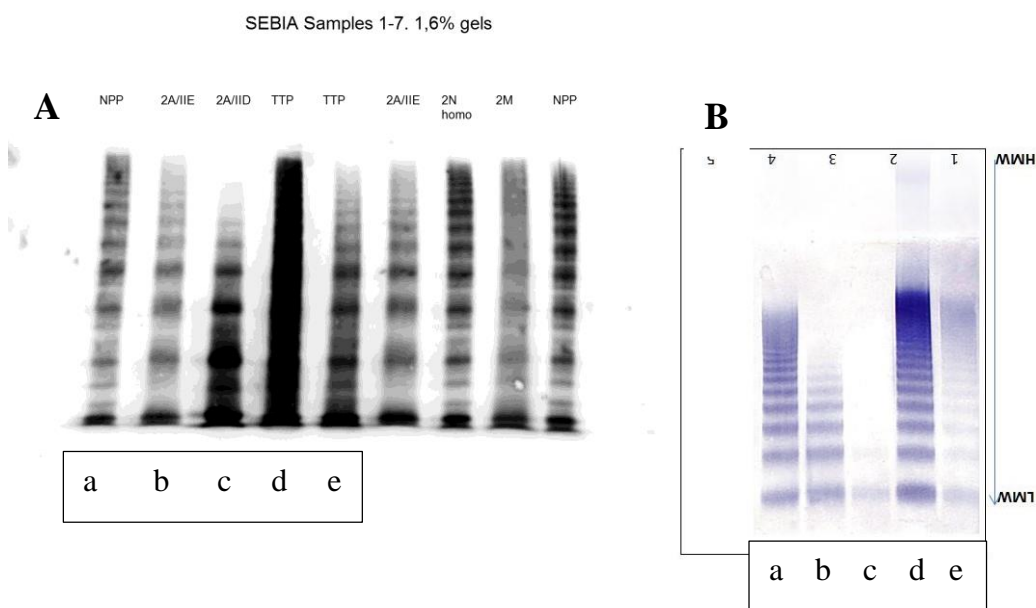
## Monoklonális antitest alapú aktivitás

A rendszerben használt monoklonális antitest, ami után a nevét is kapta (VWF:Ab) a VWF A1 doménjébe kapcsolódik be, ristocetin hozzáadása nélkül. A teszt LIA rendszer, előnye a viszonylagos olcsósága, gyorsasága és kezelőbarát felhasználási módja. Azonban több kutatásban megfigyelték, hogy a teszt nem elég érzékeny, bizonyos mutációval rendelkező betegeket fals normál értékkel ad (2M altípus, G1324A mutáció), valamint érzéketlen a HMWM vesztésére. Detektálási limitje 12-19%. Önmagában nem javasolt a használata (186-189).

### 2.1.6.5. von Willebrand faktor multimer analízis

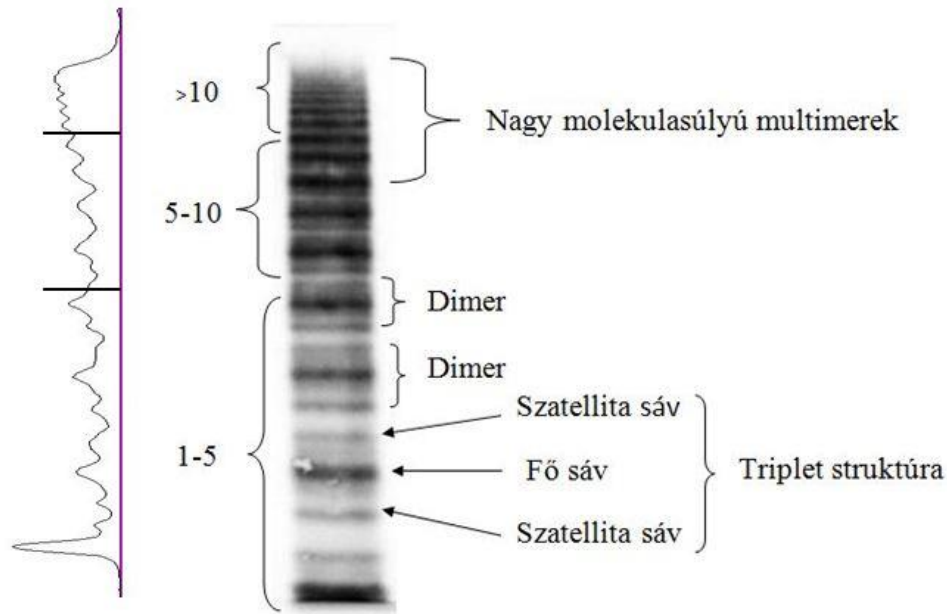
A VWF multimer struktúrájának vizuális megjelenítése/analízise a legnehezebben kivitelezhető és értékelhető vizsgálat a VWB vizsgálati palettáján, azonban véleményünk szerint nagyon fontos kiegészítő eleme annak. Standardizátlansága, eszközigénye és szakképzett, precíz munkaerőigénye miatt nem csak Magyarországon, de a világ többi laboratóriumának is csak nagyon elenyésző részében végzik (vagy végzik diagnosztikai értékkel). A szakirodalomban számos protokollt lehet találni a vizsgálatra, melyeket a különböző laborok a magukénak vallanak, azonban köztük szinte nincs kettő, amely megegyezne egymással, ezért itt csak nagy általánosságban érintjük a tesztet, saját módszerünk részletezésére a dolgozat „Anyag és módszer” részében kerül sor (190-193). Amiben a legtöbb protokoll egyezik, az a vizsgálat gélelektroforetikus része, a beteg mintáját egy pre-analitika mintaelőkészítő (legtöbbször denaturáló) fázis után adott koncentrációjú SDS (nátrium lauril szulfát) gélbe injektálják, majd adott áramerősséggel, adott ideig futtatják, hogy a multimer struktúra tömegénél fogva szétváljon egymástól alacsony-közepes-nagy molekulásúlyú multimerekre. A minta futtatása után következhet a mintázat jelölési fázisa (esetleg Western-blot szakasz), illetve a kapott multimer leolvasása (akár számszerű megjelenítése) és értékelése (194). Optimálisan a minták futtatása két különböző koncentrációjú gélben történik, a magasabb koncentráció (1,6-2%) a triplet struktúra vizsgálatára, az alacsonyabb (1-1,2%) pedig a HMWM+UL-HMWM jelenlétének/hiányának bizonyítására alkalmas. Ebből a rövidített leírásból és a laboratóriumokban (reményeink szerint) legkevésbé sem használatos „valamilyen- valamennyi” szakszavakból érzékelhető a multimer protokollok sokszínűsége. A szakasz elején felsorolt nehézségekre próbál megoldást nyújtani egy elektroforézissel is

foglalkozó reagens gyártó cég, mely automatizálta a multimer analízist (195, 196). A rendszer előre gyártott gélekkel, pufferekkel, beépített leolvasóval és saját értékelő szoftverrel rendelkezik. Előnyei (gyorsaság, könnyebb kezelhetőség) ellenére, haszna (még) leginkább a szűrő fázisban lehet, ugyanis a triplet struktúrát nem tudja pontosan megjeleníteni. A cég 2014-ben felkérte a laboratóriumunkat, hogy mintákkal és mérésekkel teszteljük a rendszerüket, ennek az összemérésnek az eredményeit mutatja a **17. ábra**, ahol látható, hogy az általunk használt multimer analízis metodika jóval precízebb, diagnosztikusan jobban használható eredményt ad. Minden hátrányát és nehézségeit figyelembe véve az ok, amiért mégis úgy gondoljuk, hogy a multimer analízisnek helye van a VWB diagnosztikai palettán, az a segítsége az altípusok és a variánsok pontos meghatározásában, amikor az alapvető, eddig tárgyalt laborértékek és ráták nem segítenek. Ennek jó példája az európai 1-es típusú VWB újra elemzése, ahol az előzetesen 1-es típusnak tipizált betegek 38%-ában a multimer analízis alapján más (2A, 2M) típusba sorolták át a betegeket (197).



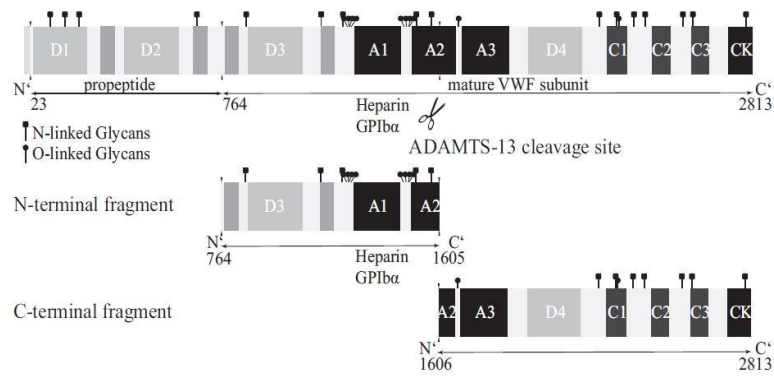
**17. ábra:** Összemérésünk eredményéből válogatott 2 gél képe. 'A' panel: a saját metodikánkkal készült futtatás. 'B' panel: Az automatizált multimer analízis rendszer. Az a-b-c-d-e jelölések ugyanazokat a mintákat jelentik mindkét panelben

Ha közelebbről vizsgáljuk egy normál plazmából készült multimer analízis képét (**18. ábra**), akkor több sávot láthatunk egy fő sávot és 2 szatellita sávot, melyek egységesen a faktor triplet struktúráját adják.



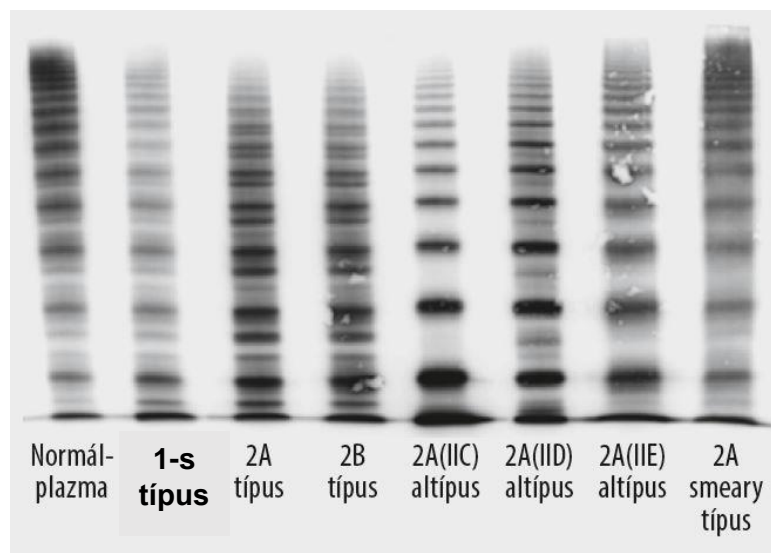
**18. ábra:** Normál plazma VWF multimer képe, jelölve a fő sávokkal és a denzitometriás képpel (saját anyag)

Magas koncentrációjú SDS gélben a triplet struktúra pontosabban tanulmányozható, itt megfigyelhető, hogy a szatellita sávok migrációja a gélben eltérő. Ennek magyarázata, hogy az ADAMTS-13 enzim egyenlőtlenül hasítja a faktort (tehát nem pontosan a faktor felében hasít) így két eltérő nagyságú termék keletkezik (198). Kiszámolható a hasítási hely ismeretében, hogy a lassabb szatellita (egy dimer és egy fél monomer) 545 kDa, míg a gyorsabb triplet (1,5 monomer) 360 kDa nagyságú (199) (**19. ábra**).



**19. ábra:** Az egyenlőtlenül hasított VWF képe (domén szerkezettel) (198).

A triplet struktúra felépítésének vizsgálata fontos a különböző dimerizációs, multimerizációs és clearance zavarokban, például a 2A/IID és a 2A/IIE típusú VWB-ben, ahol a multimer analízis képe tipikus a variánsra (**20. ábra**). Ahogy a normál plazma ábráján is látható, a dimerek segítségével számszerűen is jellemezhető a faktor minősége, valamint ezek denzitometriásan megállapított százalékos aránya viszonylagosan állandó a normál plazmában, 40% a LMWM, 35% MMWM és 25% a HMWM mennyisége. Így denzitometriás elemzés segítségével például számszerűen is megállapítható (normál minta ellenében) a mintában esetlegesen jelenlevő UL-VWFM mennyisége (százalékban) is (200-202).



**20. ábra:** Tipikus példák multimer mintázatokra.  
<http://www.vwf.group.shef.ac.uk/multimer.html>

#### 2.1.6.6. von Willebrand faktor FVIII kötő aktivitás

Ha a mért VWF értékek normál tartományban vannak, az FVIII:C viszont kórosan alacsony, így a FVIII/VWF:Ag specifikus aktivitás  $<0,6$  felmerülhet a 2N típusú VWB gyanúja, különösen abban az esetben, ha a beteg nőnemű. A klinikai tünetek gyakran segítenek elkülöníteni a 2N altípust az A hemofiliától, ha azonban a diagnosztizáló orvosnak kétségei maradnak, akkor elrendelhet FVIII kötő vizsgálatot (VWF:FVIII). A teszt ELISA technikán alapul, elérhető kereskedelmi forgalomban is. A tálcához VWF ellenes antitest van kötve, amihez hozzátapad a beteg mintájában lévő VWF. A mintát a VWF:Ag-re nézve 10%-ra kell kihígítani, hogy a kötés optimális és összehasonlítható legyen. Inkubáció után ismert mennyiségű FVIII-at adunk a tálcához, ami a vizsgált minta VWF-hoz kötődik (vagy éppen nem kötődik), majd további jelölési és mosási lépések után fotométerben leolvastatjuk a tálcát standard sor és kontrollok mellett. A kapott eredmény megmutatja a mintában lévő VWF FVIII kötő képességét. A normál egészséges (vagy nem 2N VWB) mintában a kötés 40% feletti eredményt ad, 20-40% között beszélhetünk heterozygota 2N betegről, 20% alatt pedig feltételezhetően homozygota 2N-ről van szó. Ugyanez a metodika in-house technikával is végrehajtható, annak manuális mivolta és hosszú coatolási, inkubálási idői és reagensigénye miatt a gyári kit felhasználóbarátnak mutatkozik (203, 204).

#### 2.1.6.7. von Willebrand faktor propeptid szint

A propeptid és az érett VWF fél-életideje jelentősen eltér egymástól, a propeptidé mindössze 2 óra, míg a VWF 8-12 óra, ezért a propeptid szint (VWFpp) és a VWFpp/VWF:Ag specifikus aktivitás használható a VWF szekréció és clearance monitorozására, valamint ezen defektusokkal rendelkező VWB tipizálására (205, 206). A teszt ELISA alapú, a propeptid ellenes antitesttel coatolt microplate tálcához adjuk a beteg mintáját, majd a jelölés és mosás után fotométerben kalibrációs görbe alapján leolvassuk az értékeket (207).

#### 2.1.6.8. Ristocetin indukálta thrombocytá aggregáció

A RIPA teszt fontossága a VWB diagnosztikán belül a 2B altípus és a PT-VWB identifikálására szolgál. A tesztre külön thrombocytá aggregométer szolgál, a kivitelezés nehézségét a friss thrombocyták előállítására és a megfelelő dozírozású ristocetin okozta az

első néhány generációs teszteknel. 2B típusú VWB esetében az alacsony ristocetin dózisu RIPA magas értékkel jelentkezik, a 2B VWB patomechanizmusa miatt (extrém mértékben kapcsolódik a VWF a thrombocytához külső aktiválási erök nélkül). Az újabb fejlesztések révén nem feltétlenül szükséges frissen mosott thrombocytát használni a vizsgálathoz, már megoldott a teljes vérből is ristocetin indukálta aggregáció, impedimetriás elven (208-211).

#### 2.1.6.9. von Willebrand faktor ellenes antitest detektálása

A VWF ellenes antitestek vizsgálata jelenleg még nem annyira kidolgozott, mint az FVIII ellenes inhibitoroké, ennek oka lehet, hogy sokkal ritkább az antitestek megjelenése VWB-nél, mint a hemofiliákban. Kereskedelmi forgalomban készen kapható reagens nincs is erre a meghatározásra, azon kevés laboratóriumok, ahol foglalkoznak anti-VWF inhibitor méréssel, ott in-house metodikákat használnak. Ezen metodikák lehetnek az anti-FVIII ellenes inhibitor meghatározásnál megismert, beteg minta és normál plazma keverékéből származó titrálási módszerek, valamint ELISA technikák, miszerint a microplate tálcához tisztított VWF-t rögzítenek, a beteg mintáját hozzáadják, majd jelölések után fotometriás detektálással meghatározzák az inhibitor mértékét (212-216).

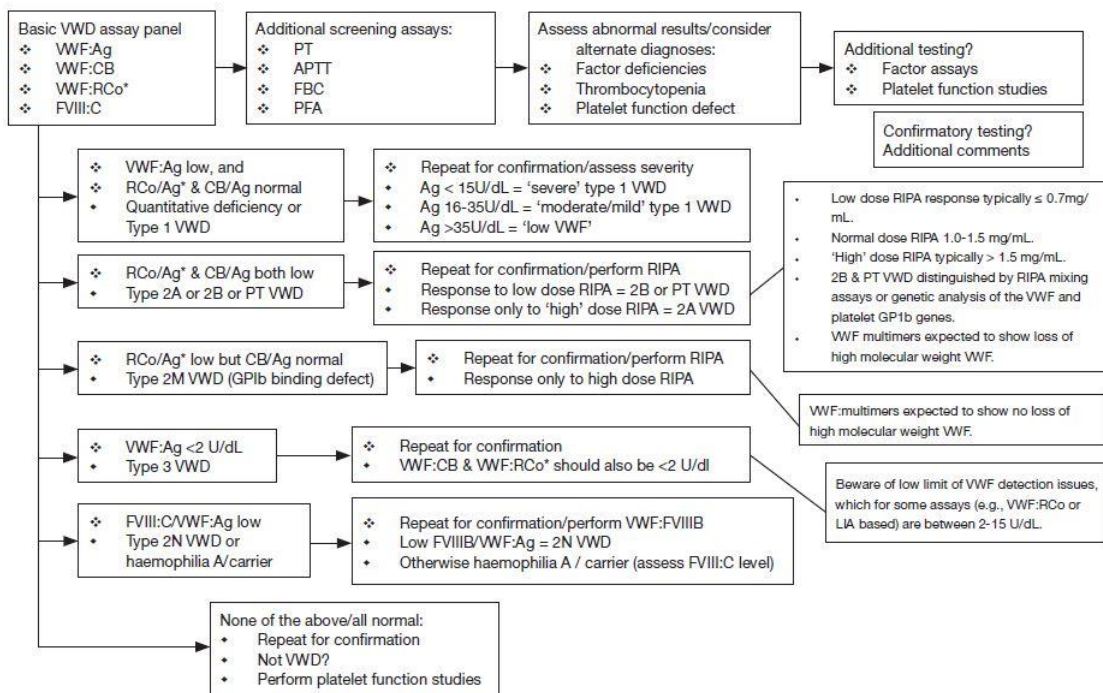
#### 2.1.6.10. PFA-100

A thrombocytá funkció analízis széles körben elterjedt, sokszor szűrőtesztként használva a von Willebrand diagnosztikában (217-219). Az automata a vizsgált beteg Na-citráttal alvadásgátolt mintáját (800 µl, teljes vér) egy ADP-vel vagy epinefrinnel aktivált membránon nagy nyíróerővel nyomja át, majd az aggregátum kialakulásáig eltelt időt méri. VWB-ben típustól függően eltérő eredményeket adhat a mérés.

#### 2.1.6.11. Diagnosztikai algoritmus és specifikus aktivitások

A von Willebrand betegség labordiagnosztikai tesztjeinek sűrűjében segíthet eligazodni, ha mesterségesen specifikus aktivitásokat alkotunk a mért értékeinkből. A specifikus aktivitásokat mindig a VWF:Ag szintre vezetjük vissza, így kialakíthatjuk a következő párokat: VWF:RCo/Ag, VWF:CB/Ag, FVIII:C/Ag. A betegség 1-es és 3-as típusában értelemszerűen a specifikus aktivitásoknak 1 körüli értéknek kell lennie (mivel a kapott

eredményeink egységesen csökkentek), amennyiben a mért értékünk az adott teszthez rendelt LLOD alatt van, úgy értelme sincs aktivitást számolni (például 3-as típus). 2A és 2B altípusban a HMWM vesztesége miatt a VWF:RCo/Ag és VWF:CB/Ag értéke <0,6. 2M altípusban leggyakrabban a GPIb kötés roncsolódott, ezért a VWF:CB/Ag értéke 0,6 fölött marad, míg a VWF:RCo/Ag értéke kisebb lesz 0,6-tól. A 2N VWB esetében pedig a FVIII:C/Ag-nek kell abnormálisan alacsonynak lenni. (220-225, 185, 226, 227). Az általunk használt diagnosztikai algoritmust a 21. ábra mutatja.

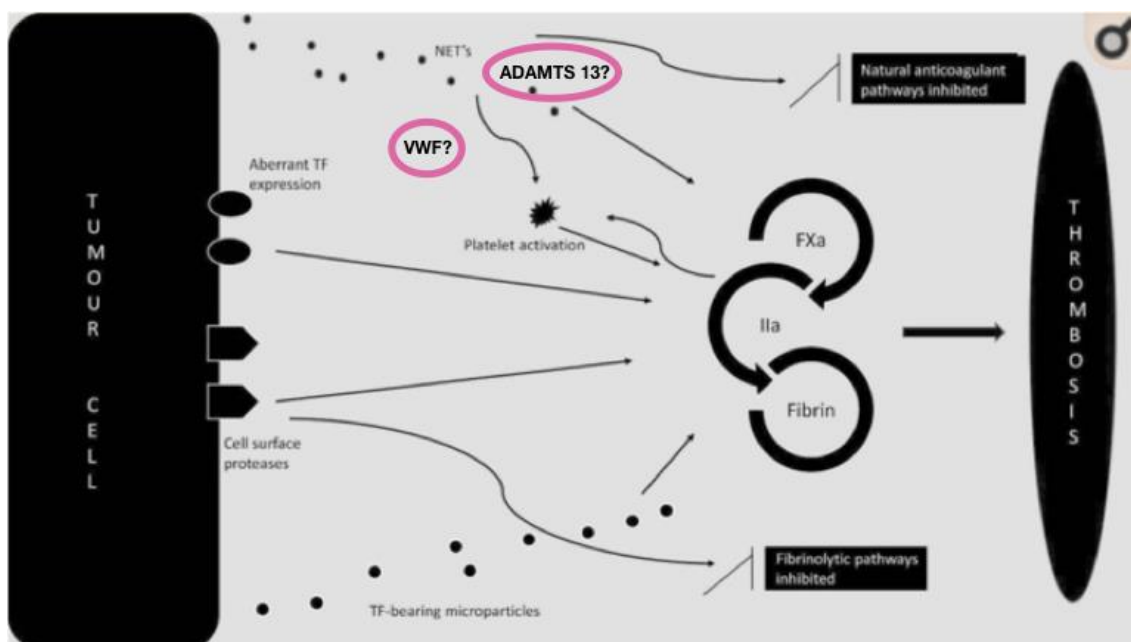


21. ábra: Az általunk használt VWB diagnosztikai algoritmus (223)



### 2.1.7. A VWF szerepe a daganatok fenntartásában és a metasztázis képzésben, különös tekintettel a colorectalis carcinomára

A daganatban szenvedő betegek morbiditása és túlélése szempontjából döntő jelentőségűek a thromboemboliás szövődmények. A XIX. század óta ismert jelenség a daganatos betegségekben megjelenő thrombosisok ill. migráló felületes thrombophlebitisek gyakorisága (Trousseau jelenség). A daganatos betegek esélye a thrombosisra legalább 5-6-szoros a populációhoz viszonyítva, de az előrehaladott daganatok esetében ez az arány sokkal nagyobb. Természetesen a daganatokhoz szövődő thrombosisnak számos oka van. Prothrombotikus állapotot eredményez a daganat által kifejtett vénás kompresszió, a daganat betörése az erekbe, a különböző vénás kanülök alkalmazása, és a kemoterápiában alkalmazott gyógyszerek nagy része is. Ezen felül a véralkodási rendszer prokoaguláns eltérései nagyban hozzájárulnak a thromboemboliák létrejöttéhez. Nagy jelentőséget tulajdonítanak a tumorsejtek aberráns szöveti faktor expressziójának, és a daganatból származó micropartikelumok keringésbe kerülésének. De a daganat indirekt hatásainak pl. a gyulladási reakció részeként a neutrophil degranuláció nyomán létrejövő neutrophil extracelluláris csapdák (NETS) kialakulásának is egyre nagyobb szerepét ismerték fel a tudósok az alvadási rendszer aktiválódásában. A **22. ábra** összefoglalja a daganatokban kialakuló thrombotikus mechanizmusokat.



**22. ábra:** A thrombosis kialakulása daganatos betegségekben. Módosítva (231)

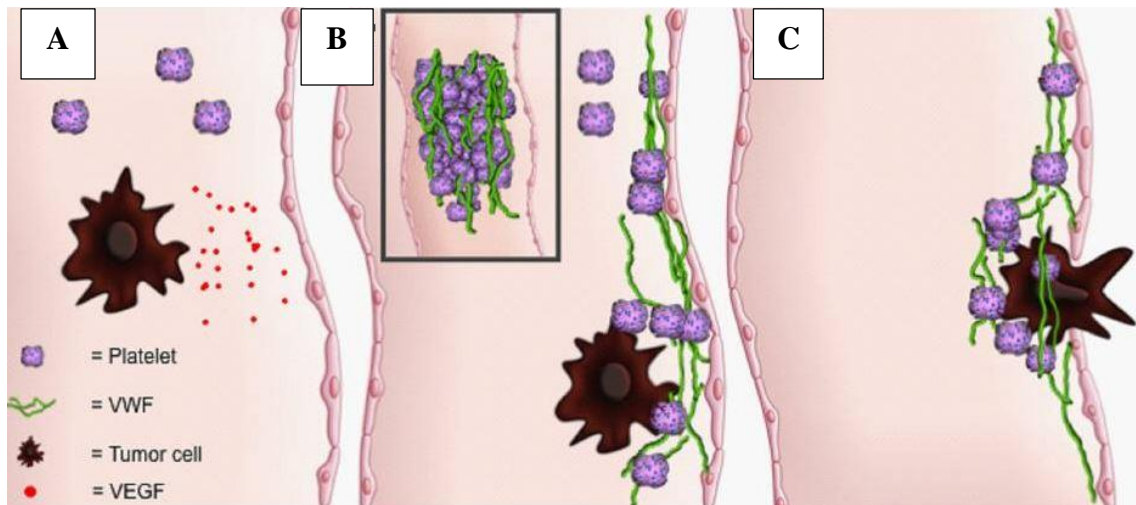
Az alvadási rendszeren belül a primer hemosztázisnak is nagy szerepe van a tumor-indukált thrombosisok kialakulásában. Régóta ismert a thrombocyták szerepe a metasztázis képződésben (228, 229), és egyre több adat van a daganatsejtek és thrombocyták direkt kölcsönhatására. A VWF a thrombocytá  $\alpha$ -granulumban tárolódik, így az összekötő kapocs és mediátor szerepét is betöltheti. Logikus tehát a feltételezés, hogy e kölcsönhatásokban a VWF-nak fontos szerepe lehet. Bár több vizsgálat több daganatféleségben is bizonyította, hogy statisztikai összefüggés van az emelkedett VWF és a thromboembóliká, valamint a metasztatikus betegség között, korábban senki nem vizsgálta a VWF multimer szerkezete és e szövődmények összefüggését. A tumor képződésekor beinduló különböző aktivációs (pl.: thrombin mediálta) útvonalak mind az  $\alpha$ -granulumból, mind az endothel sejtek Weibel-Palade testjeiből expresszálják a VWF-t (230-232, 228).

Az aktivált thrombocytákhoz kapcsolódó tumorsejtek képesek komplexet alkotni (a tumor sejteken esetlegesen a GPIIb<sub>3</sub> receptor is megjelenhet bizonyos típusú tumorokban), melyhez a hemosztatikusan aktív VWF kapcsolódni képes. Ez két különböző dolgot eredményezhet, az egyik a fokozott thrombosis készség, valamint az érpályában tovább szállított komplex kikötésével a metasztázis képzés (232).

Természetesen a statisztikai összefüggés nem jelent ok-okozati összefüggést. Nem világos, hogy az emelkedett VWF szint egy eleve agresszívebb daganat által megzavart endothel reakciójának következménye, markere csupán, vagy az emelkedett szint valóban szerepet játszik a daganat viselkedésének agresszivitásában. Hasonlóképpen nem tisztázott az ADAMTS-13 fehérje szintjének és aktivitásának pontos hozzájárulása a daganatsejtek és a primer haemostasis kölcsönhatásához.

A colorectalis carcinoma világszerte az egyik vezető halálok. A halálozás egyik fő komponense a metasztatikus betegség. A metasztázisok kialakulásának mechanizmusa intenzíven kutatott, de egyelőre nem tisztázott terület, melyben a haemostasis rendszernek szintén fontos szerepe lehet. E kérdések pontosabb megértése érthetően igen fontos a

daganat-biológia jobb megértésében, és mindebben fontos szerepe lehet a VWF szerkezetét és aktivitását tükröző teszteknek.



**23. ábra:** VWF közvetítette tumor metasztázis képződés. **A:** a keringő tumor sejtek VEGF-t választanak ki. **B:** a VWF kilökődik az endothel sejtekből. **C:** a VWF közvetíti és köti a thrombocytákat és a tumor sejteket (232)

### **3. CÉLKITŰZÉSEK**

Dolgozatom elsődleges célkitűzése a von Willebrand faktor minél teljesebb megismerésére, a laboratóriumi diagnosztika elemeinek/működésük javítására és fejlesztésére, valamint ezen elemek minél szélesebb körben való felhasználására irányuló munkánk bemutatása. Törekvésünk két fontos lépése a VWF aktivitások nagy mintaszámú vizsgálata, az eredmények statisztikai értékelése és értelmezése, valamint a VWF multimer analízis használata a von Willebrand betegségen kívül is.

#### **3.1. A von Willebrand faktor thrombocytakötő aktivitásának vizsgálata (COMPASS-VWF Study)**

Ennek a betegségnek a laboratóriumi diagnosztikájának egyik legrégebbi és legfontosabb alapköve a VWF thrombocytakötő vizsgálata. Kutatásunk, célja a kereskedelmi forgalomban elérhető, automatizált, legszélesebb körben elterjedt aktivitások tesztelése normál és ismert genotípusú, már tipizált von Willebrand beteg mintákon. Igyekeztünk a tesztek és a platformokat úgy kiválasztani, hogy a rutin diagnosztika képviseltesse magát, de természetesen jelen legyenek a legújabb vizsgálati eszközök és technikák is. A kapott eredményeket a gold standardnak tekintett VWF:RCo értékeivel összehasonlítva, statisztikai próbákkal értékeltük és meghatároztuk a laboratóriumi tesztek jellemző, alapvető paramétereit, például szenzitivitást, precíziót és korrelációt. A kutatásban résztvevő nemzetközi laboratóriumok, nagy rutinnal rendelkeznek a nagy mintaszámú VWF vizsgálatokban. A vizsgálatokat és a minták organizációját a Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság Tudományos Standardizációs Bizottsága támogatta és segítette.

#### **3.2. von Willebrand faktor multimer analízisének hasznosítása**

A von Willebrand faktor multimer analízisének fontos szerepe van a VWB tipizálásában, azonban kvantifikálhatósága miatt egyéb területeken is használható. Vastagbél-carcinomás betegek mintáinak thrombocyták számát, VWF:Ag szintjét és ADAMTS-13 aktivitását, a von Willebrand faktor UL-VWFM jelenlétét/hiányát, illetve ezen markerek egymásra hatását, prothrombotikus aktivitását és prognosztikai jelentőségét vizsgáltuk a betegség különböző stádiumaiban. Laboratóriumunk a betegek és a választott

kontrollok mintáinak VWF multimer analízisét, és a kapott mintázat denzitometriás elemzését végezte, így dolgozatomban a kutatásnak csak erre a részére összpontosítok, a kutatás egyéb eredményeit nem használom fel, nem mutatom be, csak érintőlegesen, így a multimer analízishez köthető és abból levonható következtetéseket ismertetem.

## 4. MÓDSZEREK

### 4.1. A VWF aktivitások összehasonlítása, azaz a COMPASS-VWF study (Comparison of Assays to Measure VWF Activity)

#### 4.1.1. Beteganyag

Vizsgálatunkban 95 mintát elemeztünk 2013-2014 között, 53 egészséges véradóktól származó „normál mintát”, melyet az Országos Vérellátó Szolgálat segítségével gyűjtöttünk thrombocyta ferezisen résztvevő önkéntes donoroktól, 38 genetikailag karakterizált VWB beteg mintát (Giancarlo Castaman, ill. saját minták) és 4 rekombináns (3-as típusú VWB plazmában oldott, p.P1467S és p.D1472H polymorfizmussal rendelkezik, Robert Montgomery laboratóriumából, Milwaukee) mintát. A minták részleteit az **2. táblázat** tartalmazza. A vizsgálandó plazmákat 3,2% Na-citráttal alvadásgátolt teljes vérből szeparáltuk, dupla centrifugálással (1. centrifugálás: 10 min. 3500 rpm, 2. centrifugálás: 15 min. 4000 rpm, 25°C-on), így kapva thrombocyta-szegény plazmát.

**2. táblázat:** A VWB minták mutációinak típusai és megoszlásuk típusok és altípusok szerint

Normál minta	VWB minta						Rekombináns minta
	1	2A	2B	2M	2N	3	
53	11	10	2	3	6	6	4
<b>1-es típus</b>					<b>n</b>	<b>Multimer</b>	
R1205H					2	1	
R1205H - M740I					7	1	
C236F - IVS13-3C>A					2	1 (smeary)	
<b>2A / IIA</b>					<b>n</b>	<b>Multimer</b>	
C1272D					1	IIA / 2B	
V1665E					3	IIA / 2B	

C2362F - C2362F	1	2A (smeary)
C2362F - DelEx 4-5	1	2A (smeary)
C2362F - delC Leu907fs	1	2A (smeary)
Y1321D	1	IIA / 2B
<b>2A/IIIE</b>	<b>n</b>	<b>Multimer</b>
C1130F	3	IIIE
<b>2B</b>	<b>n</b>	<b>Multimer</b>
R1341Q	1	IIA / 2B
R1308C	1	IIA / 2B
<b>2M</b>	<b>n</b>	<b>Multimer</b>
C1315L	1	1 (smeary)
R1315C	1	2 (smeary)
<b>2N</b>	<b>n</b>	<b>Multimer</b>
R854D	1	Normál
R854D - R854D	1	Normál
R854Q	1	Normál
R854Q - R854Q	3	Normál

A mintákat 2 ml-ként eppendorf csövecskékben aliquotoltuk, vakosítottuk, jelöltük, fagyasztottuk és szárazjégen 7 nemzetközi laboratóriumba (a laboratóriumokat 1-7ig számoztuk) küldtük szét. A vizsgálatban résztvevő laboratóriumok a **3. táblázatban** láthatók.

### 3. táblázat: A vizsgálatban résztvevő laboratóriumok listája

Anglia (London)	Haemostasis Research Unit, University College London
Magyarország (Budapest)	DPC Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet Semmelweis Egyetem III. sz Belgyógyászati Klinika
Németország (Hamburg)	Laboratory of Hemostasis, University Hospital Hamburg
Németország (Hamburg)	University Medical Center, Hamburg-Eppendorf
Németország (Marburg)	Department of Assay Development, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Olaszország (Firenze)	Center for Bleeding Disorders, Careggi University Hospital
Olaszország (Milánó)	Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, A. Bianchi Bonomi Hemophilia and Thrombosis Center
U.S.A (Milwaukee)	MFRC, Medical College of Wisconsin, Milwaukee

A 7. és 8. laboratóriumba kiolvadva érkeztek meg a minták, ezért az ő eredményeiket kizártuk a vizsgálatból.

#### 4.1.2. Reagensok és műszerpark

A VWF:RCo konvencionálisan használt „gold-standardnak” gondolt tesztet, melyhez a többi vizsgálatot hasonlítottuk, mind a 6 résztvevő laboratórium használta. A reagenseket igyekeztünk úgy válogatni (természetesen alkalmazkodva a résztvevő laborok lehetőségeihez), hogy azok kereskedelmi forgalomban legszélesebb körben elérhetőek legyenek, lefedjék az aktivitások vizsgálati palettáját, valamint a legrelevánsabb automata és reagens gyártók képviseltessék magukat, így a vizsgálatból levont következtetések nagyobb hatásúak lehetnek. A bevont tesztek megoszlása a vizsgálóhelyek között, valamint a használt analizátorok vizsgálatonként:



VWF:RCo alap teszt:

- BC Von Willebrand Reagent (Siemens), Laboratórium 1-6
  - Siemens BCS XP, Laboratórium 1-5
  - Sysmex<sup>®</sup> CS-5100 (Sysmex, Kobe, Japan), Laboratórium 1-4
  - ACL 9000 Instrumentation Laboratory, Laboratórium 6

VWF:GPIbR tesztek:

- IL HemosIL<sup>®</sup> Von Willebrand Factor Ristocetin Cofactor Activity (Instrumentation Laboratory, Bedford, USA), Laboratórium 1, 2, 3 és 5
  - ACL TOP500 platform (Instrumentation Laboratory), Laboratórium 1, 2, 3 és 5
- IL HemosIL<sup>®</sup> AcuStar Von Willebrand Factor Ristocetin Cofactor Activity, Laboratórium 1, 2, 3 és 5
  - ACL AcuStar platform, Laboratórium 1, 2, 3 és 5

VWF:GPIbM tesztek:

- INNOVANCE<sup>®</sup> VWF Ac (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany), Laboratórium 1-4
  - Siemens BCS XP és Sysmex<sup>®</sup> CS-2000i (Sysmex, Kobe, Japan) Laboratórium 1-4
- in house ELISA metodika, Laboratórium 6

VWF:Ab tesztek:

- IL, HemosIL<sup>®</sup> von Willebrand Factor Activity, Laboratórium 1, 2 és 5
  - ACL TOP500 platform (Instrumentation Laboratory), Laboratórium 1, 2 és 5

A tesztekhez használt kalibrátorok: Siemens Standard Human Plasma, IL Calibration Plasma, valamint az ACL AcuStar egyedi kitenként változó kalibrátora. A Laboratórium 1-4 a VWF:GPIbR és VWF:GPIbM teszteket duplikált kalibrálással végezte, [SSC Plasma Standard Lot #4, Anthony Hubbard (NIBSC, UK) felajánlása] hogy vizsgálja a kalibrátorok hatását a mérésekre.

### 4.1.3. Adatelemzés

A mérések lefutása után, a vizsgálóhelyek elektronikus úton visszaküldték az összes eredményt laboratóriumunknak. A minták vakosítását feloldottuk, majd az eredményeket egy nagy összegző táblázatba soroltuk laboratóriumok, mérési metodikák, reagensek és mintatípusok (normál, 1-es, 2-es típus stb) szerint. A statisztikai méréseket az 'R' programcsomaggal végeztük, amivel a teljes adathalmazt először „letisztítottuk” a Grubbs-féle teszttel (ahol  $p < 0,01$ ), azaz a kieső eredményeket kizártuk a további elemzésből, ez mindössze 0,7%-a az összes adatnak, melyek javarészt a VWF:RCo mérés eredményeiből származnak (**6. táblázat**).

A tesztek összehasonlítására Passing & Bablok regressziót és Bland-Altman metodikát használtunk, a 95%-os konfidencia intervallummal a regressziók általános adatait adtuk meg, úgymint slope, intercept, korrelációs koefficiens. Az intra-laboratóriumi variációs koefficienst és így a precizitást, valamint a szenzitivitást (LLOD – lower limit of detection) is megadtuk minden egyes tesztre laboratóriumonként és összesítve is. Ahol a mért érték a LLOD alatt volt ott a limit felét adtuk meg eredményként.

Miután a tesztek összességükben vizsgáltuk, a kapott eredmények alapján az egyes betegminták vizsgálati eredményeit szétválasztottuk, hogy szisztematikus különbségeket keressünk a VWF aktivitási vizsgálati típusok között. Minden egyes teszt és minta esetében a vizsgálati eredmények közötti súlyozott százalékos távolságot vizsgáltuk a következő képlettel,  $100 * (\text{Átlag}^{\text{teszt}} - \text{Átlag}^{\text{többi}}) / \text{Átlag}^{\text{többi}}$ , ahol az 'átlag<sup>teszt</sup>' a különböző laboratóriumokban a VWF aktivitási vizsgálatokkal kapott eredmények átlaga, és az 'átlag<sup>többi</sup>' pedig a VWF aktivitások átlaga, amelyet az adott vizsgálati módszeren kívüli összes teszttel kaptunk. A százalékos távolság formulát úgy terveztük, hogy kifejezze a súlyozott eltérést bármely minta VWF aktivitás eredményeinek átlaga és ugyanennek a mintának a többi teszttel kapott eredményeinek átlagától. Amint az a képletből látható, a százalékos távolság 0% olyan értékek esetében, amelyek megegyeznek a többi vizsgálat átlagával, és -100% 0 IU/dl érték esetén, függetlenül a többi vizsgálat tényleges értékétől. A cut-off értéket önkényesen 105%-ra tettük azoknál az értékeknél, amelyek magasabbak voltak a többi méréssel kapott átlagától, és -70%-ra, ahol pedig alacsonyabbak. Ezek a cut-off értékek 11 VWF aktivitást azonosítottak, amelyek közül háromról kiderült, hogy álpozitív (vagy nem szisztematikusan eltérő vagy

eltérő, de klinikailag értelmetlen módon). A cut-off értékek nullához való közelítése, csak az álpozitív minták számát növelte anélkül, hogy több valódi pozitív mintát azonosított volna (az adatokat nem mutatjuk).

\**Megjegyzés:* a minták egyéni vizsgálata során a 8. laboratórium VWF:GPIbR és VWF:GPIbM in-house ELISA eredményeit is ábrázoltuk.

## **4.2. A multimer analízis hasznosítása - CRC betegekben**

### **4.2.1. Beteganyag**

A kutatásba 2011 és 2013 között 232 vastagbél carcinomás (CRC) beteg került bevonásra a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinikáján. Kezelésük megkezdése előtti EDTÁval, illetve Na-citráttal alvadásgátolt és szeparált vérmintájukat  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tárolták a laboratóriumi tesztek megkezdéséig. A nemek aránya 138:94 a férfiak javára, az átlag életkor pedig 68.5. Diagnózis után a betegek a szakmai előírásoknak megfelelő kemoterápiás kezelést kapták meg. A medián utókövetés 46,42 hónap volt. Thrombotikus eseménynek a következő történések számítottak: mélyvénás thrombosis, tüdőembólia, artériás érelzáródás infarktussal és thrombophlebitis. A 232 betegből 55 beteg került kiválasztásra a multimer analízishez, ennek oka a CRC betegcsoporttal történő jobb korrelálthatóság, ehhez az 55 beteget 2 markánsan elkülönülő csoportra osztották, az egyik a magas VWF:Ag szint/alacsony ADAMTS-13 aktivitás csoportja, a második csoport ennek az ellentéte, az alacsony VWF:Ag szint/magas ADAMTS-13 csoport, ezek eredményei a **9. táblázatban** láthatók. A „magas”, illetve „alacsony” jelző kialakítása a VWF:Ag és ADAMTS-13 aktivitásnál, külön statisztikai meghatározás alapuló értékek alapján történt, ezek értékei szintén a 8. táblázatnál találhatóak.

### **4.2.2. Laboratóriumi vizsgálatok és statisztikai analízis**

Az ADAMTS-13 meghatározás FRETs-VWF73 segítségével történt a gyártó protokollja alapján némi módosítással. A citrátos plazmát 1:20 arányban hígították mintahígító pufferben (5 mmol/l Bis-Tris, 25 mmol/CaCl<sub>2</sub>, 0.005% Tween 20, pH 6.0) majd keverték 5  $\mu\text{mol/l}$  FRETs-VWF73 substrát oldattal (20  $\mu\text{l}$  minden lyukban egy 384-lyukas tálcán). A fluoreszcensziát minden 2 percben mérte a microplate leolvasó  $37^{\circ}\text{C}$ -on 1 órán

keresztül. A kalibrációs görbe standard humán plazma és normál véradó donorok mintáiból hígított kalibrátorból készült.

A VWF:Ag szint mérése EDTAs mintából (három hígítással) történt ELISA módszerrel, elsődleges jelöléssel, majd HRP jelölt másodlagos poliklonális nyúl anti-human VWF antitesttel (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) és TMB szubsztráttal WHO VWF:Ag standard ellen kalibrálva.

A vérkép és tumormarkerek (CEA, CA 19-9) mérése a Roche Integra 800 analizátoron és a Cell-Dyn 3500 hematológiai automatán történtek.

A statisztikai tesztek értékelése és demonstrálása az IBM SPSS Statistics 20 és GraphPad Prism 5 szoftverekkel történtek. Az adatokat Spearman's korrelációval, Mann–Whitney U-tesztel, illetve  $\chi^2$  próbával tesztelték. A változók betegségre gyakorolt független hatását és befolyását többváltozós Cox-regresszió hazard modellel vizsgálták és Kaplan–Meier analízissel demonstrálták grafikusan.

#### A VWF multimer analízise

A CRC és kontroll minták von Willebrand faktor multimer analízisét laboratóriumunk végezte a Kutatólabor számára, az általunk rutinban használt protokoll alapján. Az 55 db citráttal alvadásgátolt, kóddal ellátott, fagyasztott mintát alacsony felbontású 1,2 w/v %-os SDS-agaróz gélen futtattuk, hogy a nagy- és extra nagy molekulású multimer jelenléte bizonyítható és elemezhető legyen. A mintákat 37 °C-os vízfürdőben kiolvasztottuk, majd VWF:Ag szintjüknek megfelelően mintahígító pufferben (SDS + Tris puffer + Brómfenol kék) hígítottuk, ezután 60 °C-on, 1 órán át, denaturáltuk a faktort blokk termosztátban. Gélenként 60 ml pH 8,8; 1,2 w/v %-os type VII SDS-agaróz gélt (Sigma Aldrich, low gelling temperature agarose) öntöttünk üveglapok közé, amire 3 órányi 4 °C hűtés után, 40 ml 0,8 w/v %-os gyűjtőgél öntöttünk (pH 6,8 Tris-SDS pufferben, Lonza Seakem HGT(P) agaróz), majd ezt újabb 2 órára 4 °C-os hűtőbe tettük dermedni. Miután a gél mindkét része megdermedt, valamint összeforrt, méretre vágtuk őket, és gélenként 9 mintát és 1 kontrollt (NPP), 130 µl mennyiségben pipettáztunk a gélekbe vágott 1 cm-es lyukakba. 3 liter elektrolit pufferrel (Tris+Glicin+SDS) töltöttük fel a futtatókádakat gélenként és egy éjszakán keresztül (17-18 óra, amíg a brómfenolkék

dye-front eléri a gél végét) 56V feszültséggel indítottuk az elektroforezist. A futtatás után a géleket Western-blot metodikával blotoló pufferben (6 liter pH 7,4; 0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 4 órán át nitrocellulóz membránba (45  $\mu\text{m}$  Whatman Protran Nitrocellulose Membrane, Sigma Aldrich) blotoltuk, majd a membránokat 15 percen keresztül blokkoltuk 1,5%-os UHT tejben. Blokkolás után szintén tejben jelöltük a membránokat nyúl anti-humán-VWF (Dako, 1:2000 hígításban) antitesttel, majd másnap reggelig hűtőben tároltuk őket, lezárt dobozban. Az első antitest maradékát 3x10 percig mostuk le a membránokról, majd másodlagos antitesttel (Bio-Rad Western Blotting Grade Affinity Purified Goat anti-Rabbit IgG HRP) is megjelöltük a membránokat, szintén tejben 90 percen keresztül. A membránokat a 1,5 óra letelte után 3x10 percig mostuk le tejben, ezután csapvizes öblítés következett. A multimer mintázatot kemilumineszcensz reagenssel hívtuk elő (Chemiluminescent Peroxidase Substrate for Western Blotting, Sigma Aldrich) és az Alpha Innotech (FluorChem Ltd) géldokumentációs rendszerben olvastuk le és elemeztük denzitometriásan (AlphaView program). A denzitometriás elemzésekhez a normál plazma értékeit vettük alapul, UL-VWF-ként pedig a 15-nél magasabb számú triplet értékekkel számoltunk.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. COMPASS-VWF

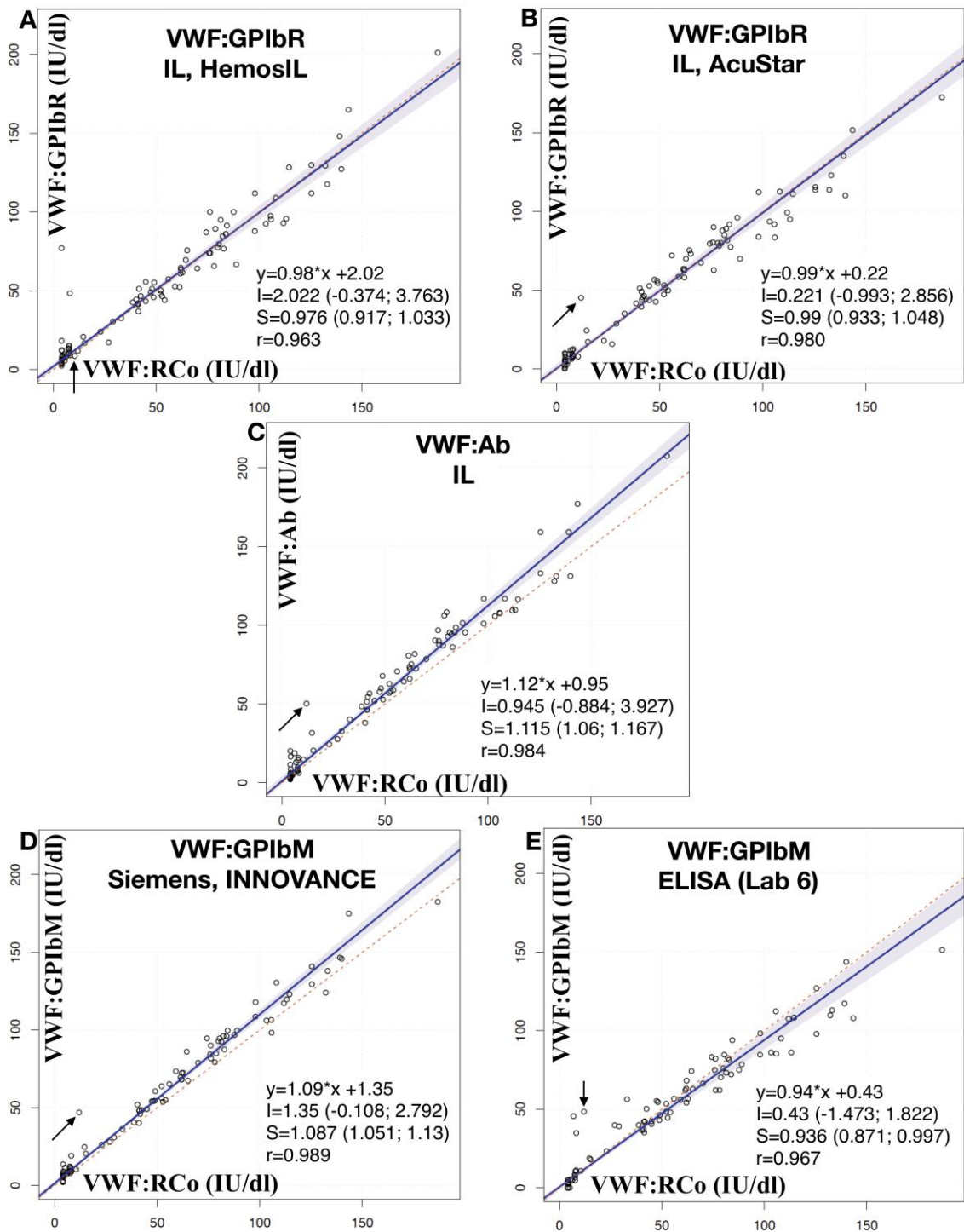
Az összemérésben kapott értékek statisztikai elemzését a könnyebb érthetőség kedvéért grafikusán ábrázoltuk, illetve pontokba szedtük őket.

#### 5.1.1.1. Tesztek korrelációja

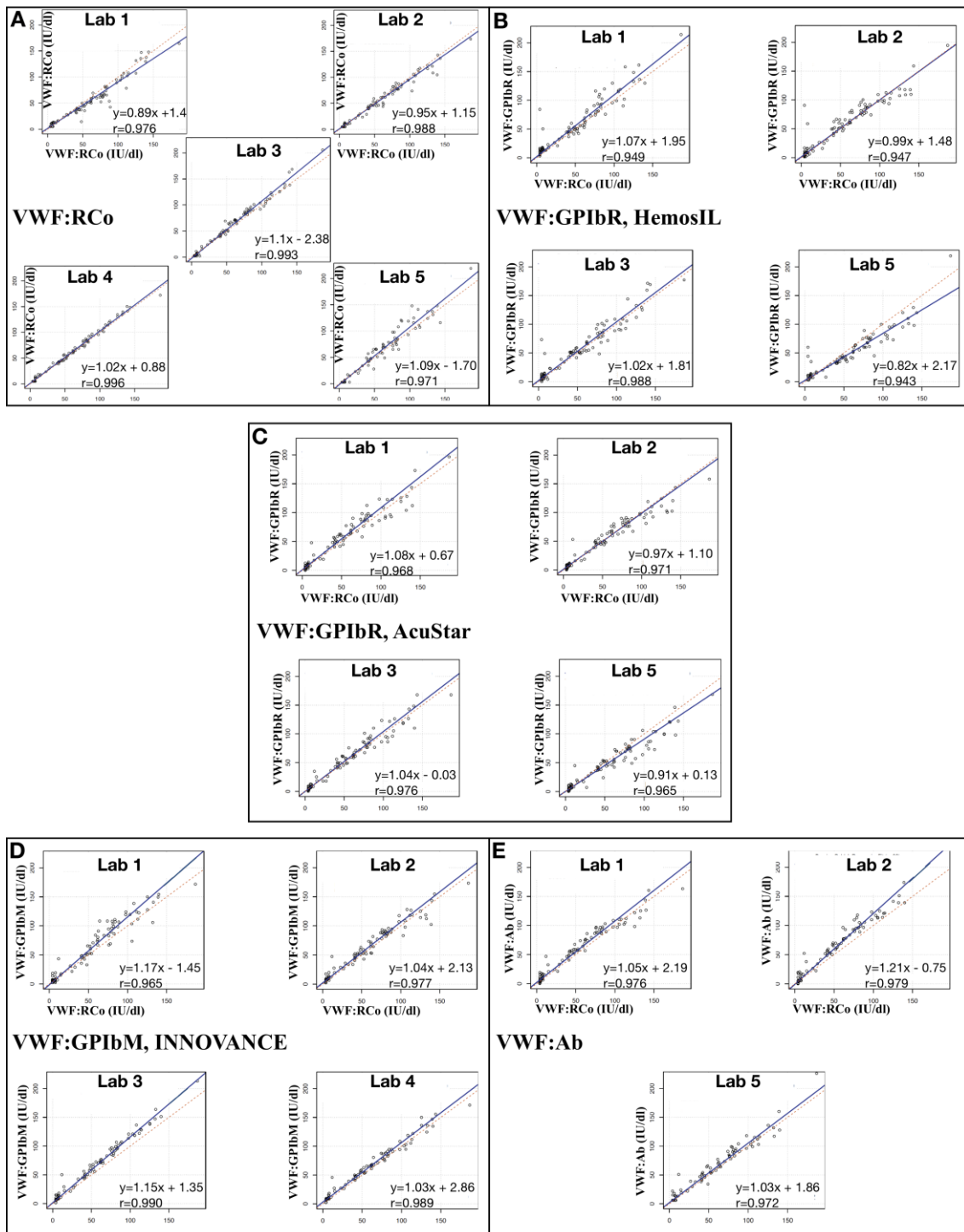
Minden teszt eredménye jól korrelált a standard VWF:RCo aktivitással mért értékekkel. A kapott r-értékeket ( $p < 0,001$ ) az egyenesek mellett tüntettük fel. Az 5 összehasonlított tesztből, az VWF:Ab (IL) és VWF:GPIbM (Innovance<sup>®</sup> Act.) szignifikánsan magasabb, az in-house ELISA metodika pedig alacsonyabb értéket adott, azaz az egyenlőségi egyenes kiesett a 95%-os konfidencia intervallumból. Noha a számadatok szignifikáns eltérést adnak, ezeknek klinikai következményük nincs (**24. ábra**).

#### 5.1.1.2. Laboratóriumok összehasonlítása

Annak megítélésére, hogy a kapott, kis vizsgálati különbségek az adott laboratóriumhoz kapcsolódó technikai problémák eredményei-e, minden laboratórium eredményeit külön is elemeztük. Megfigyelhető volt, hogy a VWF:Ab és VWF:GPIbM tesztek továbbra is szignifikáns eltérést mutattak, ebben az összehasonlításban viszont a VWF:RCo aktivitásnál találtuk a legnagyobb eltérést, azonban ezek a differenciák itt sem bizonyultak klinikailag relevánsnak (**25. ábra**).



**24. ábra** Az összes (n=95) minta Passing-Bablok regresszió analízise. A pöttyök egy-egy mintának az összes laborból származó átlag eredményei. **A** panel: VWF:GPIbR (IL); **B** panel: AcuStar VWF:GPIbR; **C** panel: VWF:Ab teszt; **D** panel: VWF:GPIbM (Innovance Act); **E** panel: in-house ELISA teszt. Kék egyenes: az illesztett regressziós egyenes. Szaggatott vonal: egyenlőségi egyenes. I = intercept, S = slope, r = korrelációs koefficiens. A nyíl a p.P1467S mutációval rendelkező rekombináns mintát jelzi



**25. ábra** Az összes minta (n=95) külön laboratóriumokra vonatkozó Passing-Pablok regresszió analízise. **A** panel: VWF:RCo eredmények az egyes laborokban vs. the VWF:RCo össz labor átlageredmények. **B** panel: VWF:GPIbR (IL), **C** panel AcuStar VWF:GPIbR teszt (IL). **D** panel VWF:GPIbM (Innovance Act), **E** panel VWF:Ab teszt (IL). Kék egyenes: az illesztett regressziós egyenes. Szaggatott vonal: egyenlőségi egyenes. I = intercept, S = slope, r = korrelációs koefficiens.



#### 5.1.1.3. Normál minták

A normál és VWB mintákat külön is elemeztük Bland-Altman analízissel, ami különbségeket mutatott az újabb tesztek és a VWF:RCo között, a VWF aktivitási értékek függvényében. A VWF:Ab és VWF:GPIbM tesztek továbbra is konzisztensen eltérést mutatnak az alacsony és normál értékeknél, a normál tartományban egy kissé nagyobb az eltérés. Míg a VWB minták jelentős része az alapvonal körül helyezkedik el, ahogyan az várható is volt, addig néhány 2N típusú VWB minta a VWF:GPIbR teszteknel jobban eltért, azonban ennek szintén nincs diagnosztikus következménye (**26. ábra**)

#### 5.1.1.4. A kalibrátorok hatása

2 résztvevő laboratórium (Laboratórium 1-4) a VWF:RCo és VWF:GPIbM (Innovance Act) tesztek dupla kalibrálással is elvégezte az összes mintán, abból a célból, hogy megvizsgáljuk: az esetleges eltérések nem a kalibrációs különbségekből adódnak-e. A rutinban a tesztekhez használt Siemens Standard Human Plasmát, és az SSC Calibrator Plasmát hasonlítottuk össze. Ahogy az a **27. ábrán** látható, az eredmények szinte tökéletesen megegyeznek.

#### 5.1.1.5. Szenzitivitás

Az **4. táblázatban** láthatóak a mérési értékekből számolt LLOD értékek, valamint a gyártó által javasolt érték. Bizonyos modifikációknak köszönhetően több laboratórium a gyártótól alacsonyabb értékekkel dolgozik. A legjobb szenzitivitása az in-house ELISA, illetve az AcuStar VWF:GPIbR tesztnek volt.

#### 5.1.1.6. Precizitás

A vizsgált új tesztek többsége a VWF:RCo által mutatottaktól nagyobb teljesítményt mutatott (**5. táblázat**). Amint az várható volt, az alacsony tartományban (azaz a VWB mintákban) a variabilitás nagyobb volt, mint a normál mintáknál.

#### 5.1.1.7. Referencia tartományok meghatározása

Minden egyes tesztre külön-külön, az összes laboratórium mérése alapján meghatároztuk a normál referencia tartományt 95% és 99% konfidencia intervallum mellett (**28. ábra**).

#### 5.1.1.8. Szisztematikus hibák

A módszerekben leírt súlyozott százalékos távolságtesztet használva tizenegy mintát azonosítottunk, melyek egy vagy több vizsgálattal is, jelentősen eltérő VWF aktivitást mutattak a többi vizsgálathoz képest (**29. ábra és 7. táblázat**). Ezek közül három a következő okok miatt álpozitívnak bizonyult: (i) Bár a GPIbR (HemosIL latex agglutináció) magasabb volt a T(1)-10 minta esetében, mint bármely más vizsgálattal mérve, ez egyetlen kiugróan magas mérésnek köszönhető az 5. laboratóriumban (**7. táblázat**), és nem a teszt szisztematikus eltérése okozta. A mintánkénti alacsony mérésszám miatt, ezt a kilógó pontot a kezdeti statisztikai analízisünk kizáratlanul hagyta. (ii) A T(2)-4 klinikailag értelmetlen jelentéktelen különbségeket mutatott a különböző vizsgálati módszerekkel mért értékek között. A súlyozott százalékos távolságmérésünk alapján választottuk ki, mivel az in-house ELISA vizsgálat nulla értékét és a VWF:GPIbR minimálisan magas értékét kombináltuk. A **7. táblázat** alapján egyértelmű, hogy az eltérés nem szisztematikus metodológiai különbség következménye. (iii) Végül a T(2)-17-et szintén csak technikai nehézség miatt került be, nem szisztematikus hiba, ahogy a **7. táblázatból** is látszik. Ezért a három hibásan kiválasztott mintát kizártuk a további elemzésből, és a 8 mintavételre koncentráltunk (**29. ábra és 7. és 8. táblázat**). Számos különböző mintázatot azonosítottunk a tesztek között, amelyeket az alábbiakban felsorolunk.

Hibásan magas aktivitás eredmények 2B típusú VWB-ben ELISA teszttel.

Két 2B típusú VWB mintát vizsgáltunk: T(2)-2 p.R1341Q heterozigóta mutációval és T(2)-15 p.R1308C heterozigóta mutációval. A standard VWF:RCo aktivitással 6-8 és 7-12 IU/dL eredményt kaptunk, ugyanúgy mint a forgalomban kapható új tesztekkel is közte a VWF:GPIbM Innovance aktivitással is, ami rekombináns GPIb ligandot használ két gain-of-function mutációval, mely spontán VWF kötődést idéz elő. Mind a három ELISA teszt, kettő VWF:GPIbM és egy VWF:GPIbR aktivitás, jóval magasabb értéket mért (**7. táblázat**).

Hibásan magas VWF:Ab eredmény a p.V1665E mutációnál.

Három p.V1665E pont mutációval rendelkező 2A típusú VWB mintáját vizsgáltuk, T(2)-7, T(2)-8 és T(2)-9. Mind a három esetben a VWF:Ab teszt konzisztensen magas

eredményt adott a többi teszthez képest (7. és 8. táblázat). Az VWF:Ab inszenzitívnek mutatkozott a p.V1665E mutáció okozta alacsony eredmények detektálására.

Hibásan alacsony VWF aktivitás a ristocetint használó teszteknel p.P1467S mutációk esetén (kivéve az AcuStar VWF:GPIbR).

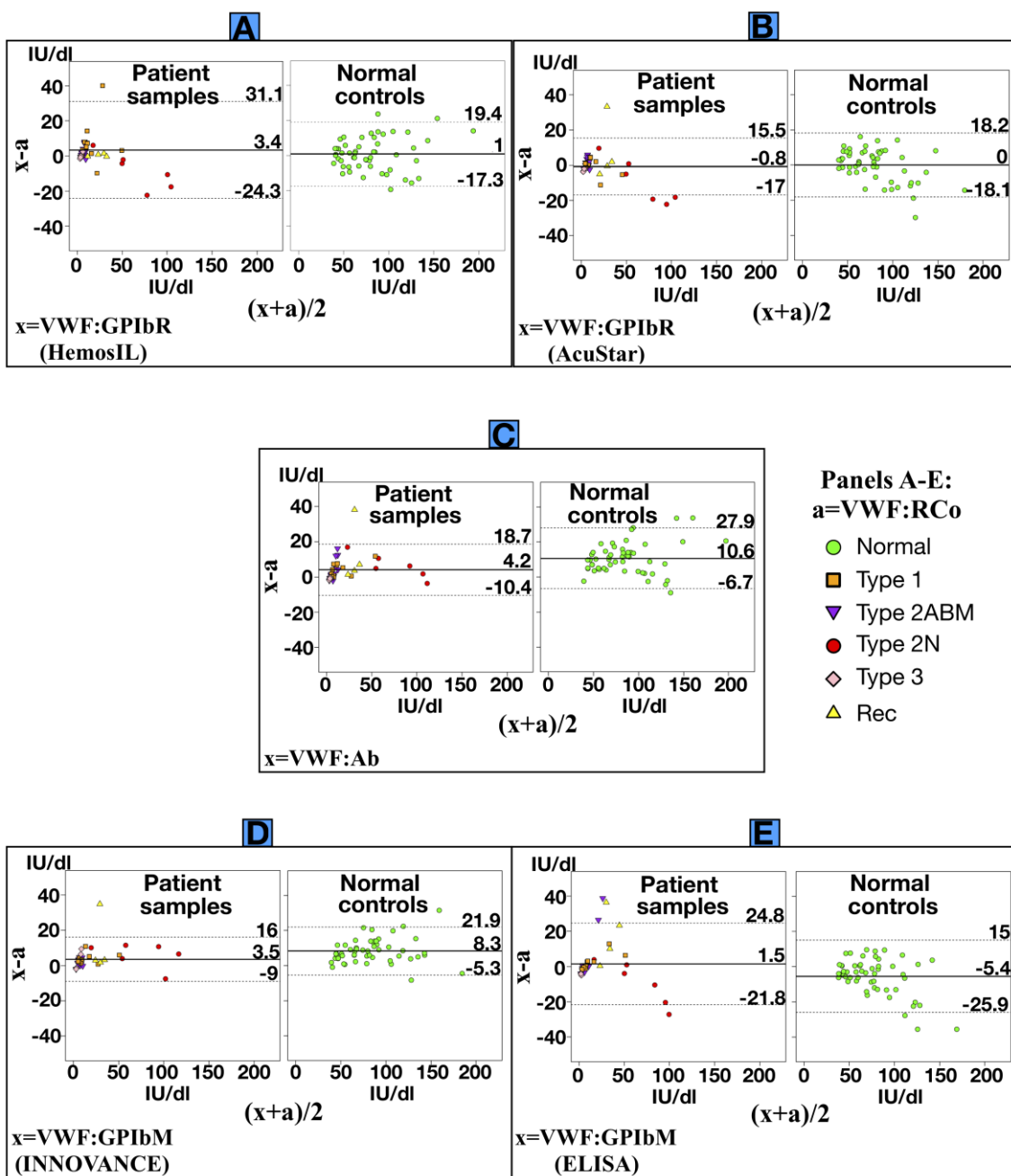
Az egyik jól ismert kritika a VWF:RCo tesztekkel kapcsolatban, hogy a p.P1467S polymorfizmussal rendelkező betegek esetében fals alacsony értéket adnak, pedig ez a mutáció nem ronsolja a faktor hemosztatikus funkcióit, csak a ristocetint kötő helyet érinti. A ristocetint nem használó tesztek normál értékeket adtak a VW-Rec-01 rekombináns mintára. Meglepő módon a szintén ristocetint használó, AcuStar VWF:GPIbR teszt nem vétett hibát

Fals normál érték a homozigóta p.C2362F esetén a VWF:GPIbR (HemosIL) tesztel.

A T(2)-10 minta 2M (smeary) típusú VWB homozigóta p.C2362F mutáció miatt. Másik két beteg, a T(2)-11 és T(2)-17 hemizigóta p.C2362F és egy null allél kombinációjaként (del exon 4-5, és delC Leu970fs), de nem mutattak a T(2)-10hez hasonló eltérést.

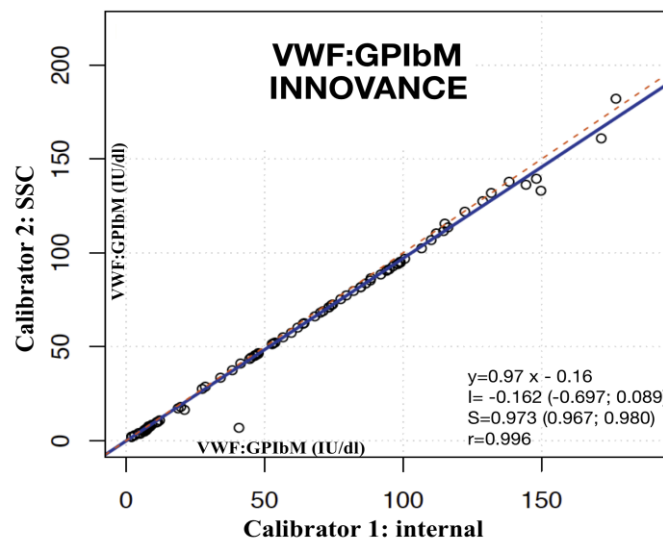
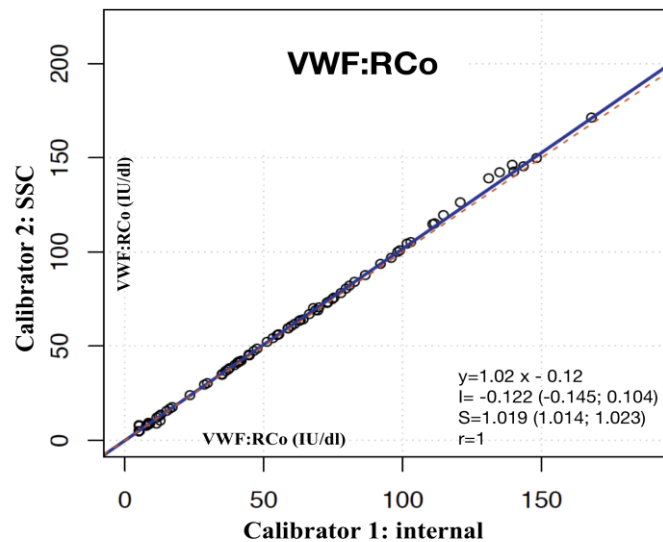
Fals magas VWF:GPIbR (HemosIL) érték 1 Vicenza betegnél a hétből.

A T(1)-11 minta Vicenza típusú VWB p.R1205H & p.M740I mutációval. A többi Vicenza beteg nem mutatott eltérést.



26. ábra A normál (n=53) és VWB minták (n=42) Bland-Altman analízise. A Bland Altman analízis két teszt összehasonlítására alkalmas. Ugyanazon minta két teszttel kapott eredményét kivonja egymásból (x-a) és elosztja a két mérés átlagával  $[(x + a)/2]$ , ahol 'a' a VWF:RCo aktivitás eredménye 'x' pedig a hasonlító teszt méréseinek az átlaga. **A** panel: VWF:GPIbR (IL), **B** panel: AcuStar VWF:GPIbR teszt (IL), **C** panel: VWF:Ab teszt (IL), **D** panel: VWF:GPIbM (Innovance Act), **E** panel: in-house ELISA metodika. A zöld köröcskék jelentik a normál mintákat, a piros köröcskék a 2N VWB minták, a narancssárga négyzet az 1-es típusú VWB mintája, a lila négyzet a 3-as típusú beteg mintája, a kék háromszög a 2A-2B-2M mintáját. a sárga háromszög pedig a

rekombináns mintát mutatja. A rekombináns minták vad típusú VWF-t, valamint p.P1467S és p.D1472H mutációt tartalmaznak.



**27. ábra** A kalibrátorok hatásának vizsgálata. A tesztek saját (Standard Human Plasma), illetve az ISTH-SSC kalibrátorával mért értékeinek összehasonlítása. A köröcskék az két résztvevő laboratórium (1 és 4) méréseinek az átlaga mintáknént. Kék egyenes: az illesztett regressziós egyenes. Szaggatott vonal: egyenlőségi egyenes. I = intercept, S = slope, r = korrelációs koefficiens.

**4. táblázat:** A tesztek szenzitivitása. Minden laboratóriumhoz külön megadtuk, tesztenként, az értékekből számolt, illetve a gyártó által javasolt (gyj) detektálás alsó határát. NK: nem készült, NE: nem elérhető, L1-L6: Laboratórium 1-6

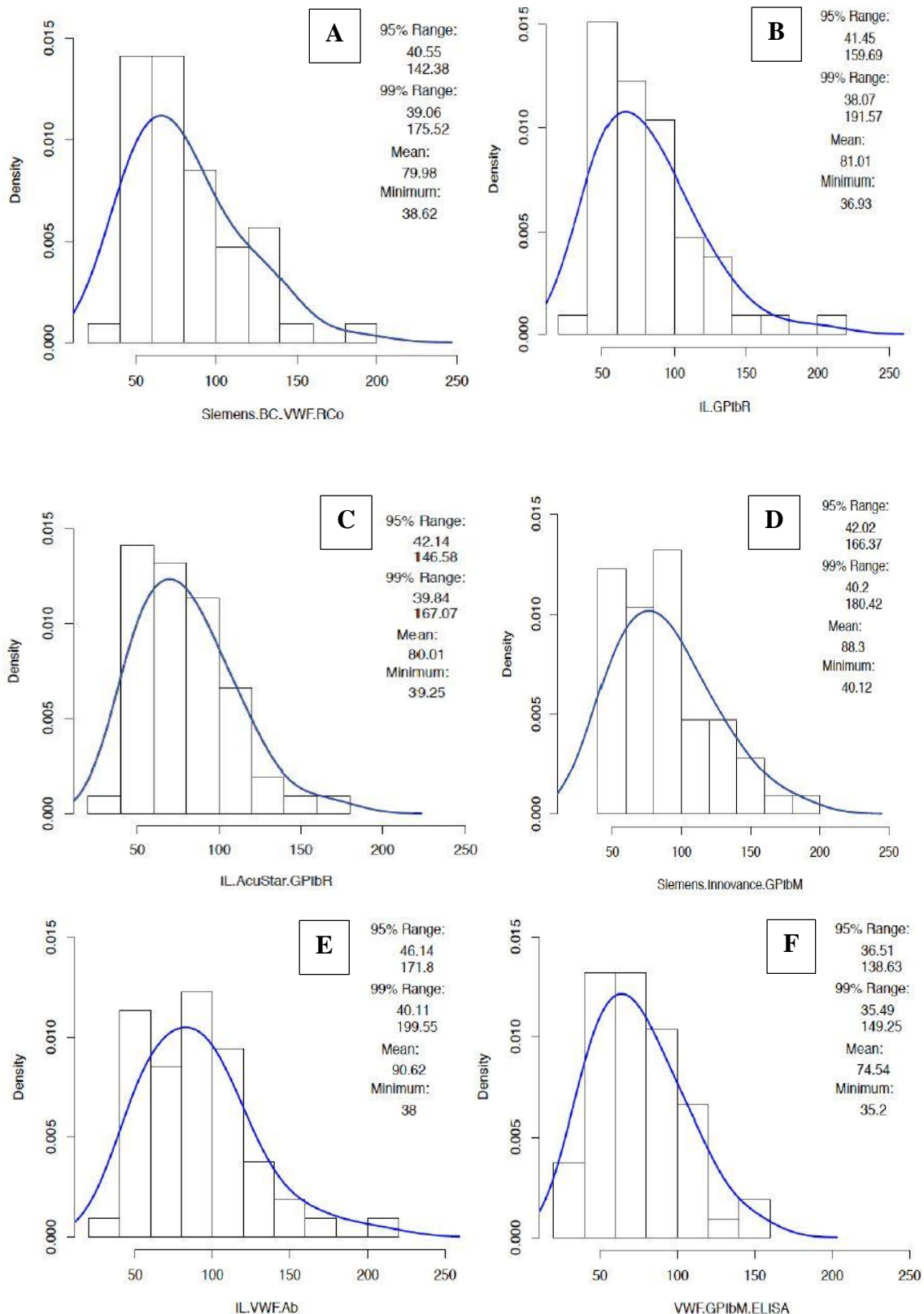
	VWF:RCo (IU/dL)	VWF:GPIbR HemosIL (IU/dL)	VWF:GPIbR AcuStar (IU/dL)	VWF:Ab (IU/dL)	VWF:GPIbM Innovance Act (IU/dL)	VWF:GPIbM ELISA (IU/dL)
gyj	10	7	0,5	19	4	NE
L1	10	3	0,5	1	4	NK
L2	9,9	1	0,5	0	4	NK
L3	4	4,4	0,5	NK	3	NK
L4	10,11	NK	NK	NK	4	NK
L5	6	6	0,5	12	NK	NK
L6	NK	NK	NK	NK	NK	0

**5. táblázat:** A vizsgált tesztek pontossága variációs koefficiensként (CV%) kifejezve

CV%	VWF:RCo	VWF:GPIbR HemosIL	VWF:GPIbR AcuStar	VWF:Ab	VWF:GPIbM Innovance Act
Minden minta	15,8	20,4	12,1	12,2	13,1
Normál minta	12,8	14,2	11,4	9,1	9,3
VWB minta	25,8	29	13,1	17	19,5
Mérések száma mintánként	5	4	4	3	4

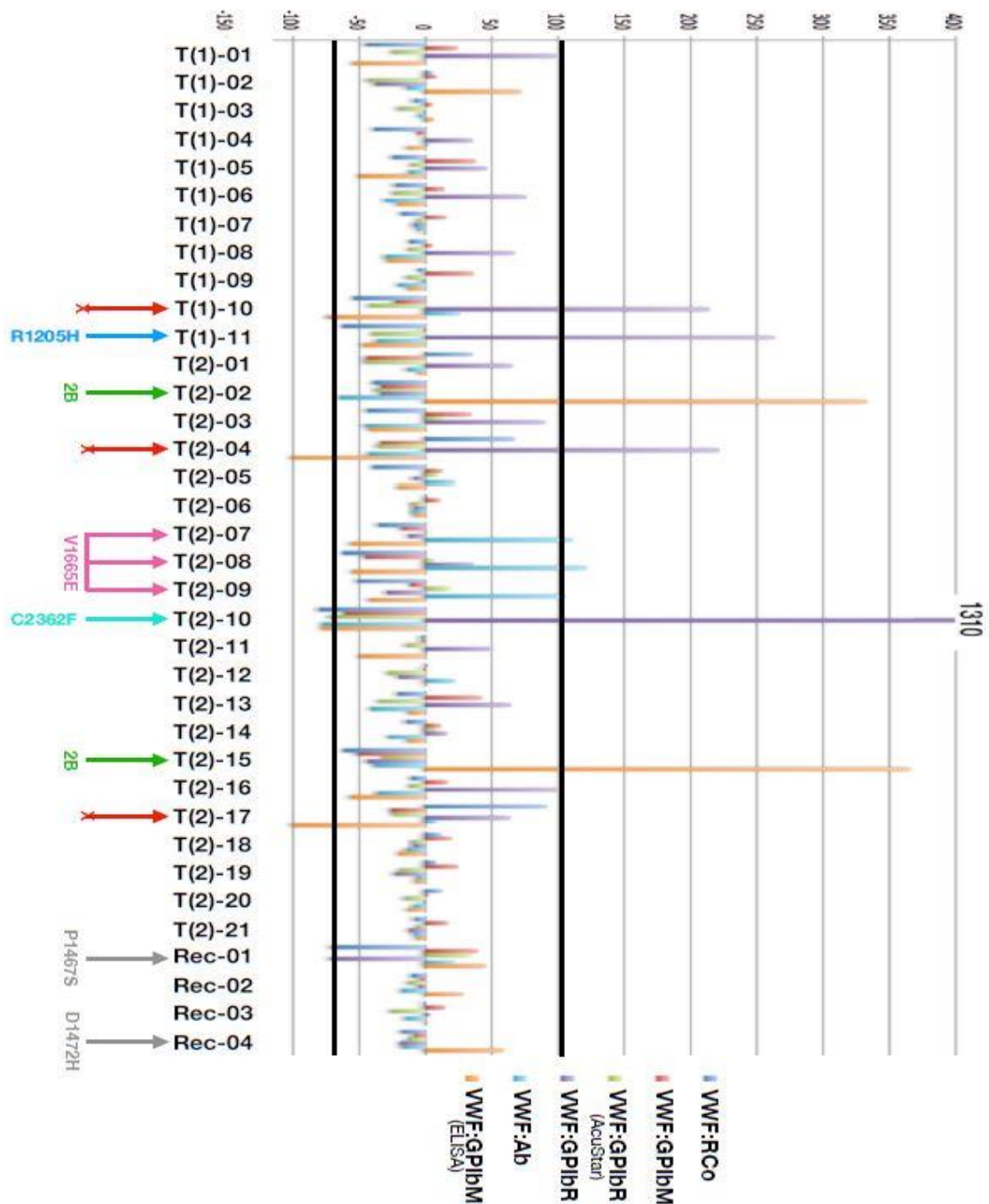
**6. táblázat:** Az outlier (piros) értékek jellemzése. N: normál minta; rWT: rekombináns minta.

	VWF:RCo						VWF:GPIbR (HemosIL latex aggl.)		VWF:GPIbR (HemosIL AcuStar)		VWF:GPIbM (INNOVANCE)			VWF:Ab	
	N	N	1	N	1	1	2N	N	2B	N	rWT	3	N	N	
<b>L1</b>	<b>53.3</b>	137.4	5.7	49.6	<10	<b>14.3</b>	16	36.6	12.5	<b>76.6</b>	<b>55.5</b>	<b>73</b>	44.7	160.3	
<b>L2</b>	81.4	142.8	4.0	59	<9.9	53.1	17.2	42.2	<b>24.1</b>	33.6	29	11	<b>92</b>	194.1	
<b>L3</b>	90.4	138.1	5.1	51.6	<4	69.0	20.4	<b>75.4</b>	5.2	44.9	21.5	15	ND	ND	
<b>L4</b>	92.3	141.5	ND	56.8	<10.1	55.6	16.4	ND	ND	42.7	27.2	8.4	ND	ND	
<b>L5</b>	121	<b>263</b>	<b>48</b>	<b>28</b>	<b>22</b>	ND	<b>&lt;6</b>	32	11	ND	ND	ND	38	<b>50</b>	



**28. ábra** A referencia tartományok meghatározása a 95% és 99% konfidencia intervallum mellett. Csak a normál minták eredményeit vettük figyelembe, megadtuk az átlag, illetve a minimális értéket is. **A** panel: VWF:RCo, **B** panel: VWF:GPIbR (IL), **C** panel: AcuStar

VWF:GPIbR, **D** panel: VWF:GPIbM (Innovance Act), **E** panel: VWF:Ab (IL), **F** panel: VWF:GPIbM in-house ELISA teszt



**29. ábra** Az átlagtól való súlyozott százalékos távolság. Magyarázat: lásd a módszerek leírásánál.



**7. táblázat** Szisztematikus és nem szisztematikus hibák jellemzése (piros jelölés: kilógó értékek)

Beteg azonosító	VWD típus & mutáció	VWF:RC o (IU/dl)	VWF:GPIbR HemosIL (IU/dl)	VWF:GPIbR AcuStar (IU/dl)	VWF:GPIbR ELISA (IU/dl)	VWF:Ab (IU/dl)	VWF:GPIb M INNOVANC E (IU/dl)	VWF:GPIbM ELISA1 (IU/dl)	VWF:GPIbM ELISA2 (IU/dl)
<b>xT1-10</b>	1 R1205H	4.0	<b>18.3</b>	4.9	3.9	11.4	6.3	2.4	3.5
<b>T1-11</b>	1 R1205H	8.0	<b>48.2</b>	12.4	7.9	15.7	19.0	11.1	10.2
<b>T2-2</b>	2B R1341Q	8.1	8.8	8.3	<b>31.8</b>	6.0	8.8	<b>34.6</b>	<b>56.2</b>
<b>xT2-4</b>	2M Y1312D	4.0	<b>6.2</b>	1.8	4.5	2.0	1.9	<b>0.0</b>	< 1.6
<b>T2-7</b>	2A V1665E	6.2	8.0	9.1	13.1	<b>18.6</b>	7.6	4.4	6.8
<b>T2-8</b>	2A V1665E	4.0	12.1	9.9	2.2	<b>20.1</b>	5.6	0.0	10.5
<b>T2-9</b>	2A V1665E	4.3	6.0	9.2	14.1	<b>16.3</b>	7.3	5.0	5.9
<b>T2-10</b>	2M C2362F	4.0	<b>77.0</b>	5.6	1.6	5.6	7.6	4.5	7.0
<b>T2-15</b>	2B R1308C	6.8	9.6	11.5	<b>36.1</b>	12.7	8.4	<b>45.6</b>	<b>69.0</b>
<b>xT2-17</b>	2M C2362F	4.0	3.6	1.9	< 1.6	3.1	1.9	<b>0.0</b>	< 1.6
<b>R-1</b>	P1467S	<b>11.9</b>	<b>11.6</b>	45.3	<b>5.1</b>	50.1	46.7	48.3	80.4
<b>R-4</b>	D1472H	32.9	32.6	34.8	18.7	40.0	36.1	56.3	38.9

**8. táblázat** Az egyes laboratóriumok egyedi méréseit a rendszeres eltérésekhez kiválasztott átlagértékekre mutatjuk be. NK: nem készült

MINTA: TESZT:	T1-10 GPIbR	T1-11 GPIbR	T2-4 GPIbR	T2-7 Ab	T2-8 Ab	T2-9 Ab	T2-10 GPIbR	R1 RCo	R1 GPIbR
	<b>x</b>		<b>x</b>						
<b>Lab1</b>	10.1	50.0	N/A	17.6	18.9	15.8	84.1	11.7	13.0
<b>Lab2</b>	6.5	58.8	5.7	20.2	19.5	18.0	90.6	10.4	16.2
<b>Lab3</b>	12.4	48.8	7.0	NK	NK	NK	73.3	2.0	4.2
<b>Lab4</b>	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	18.2	NK
<b>Lab5</b>	44.0	35.0	6.0	18	22.0	15.5	60.0	17.0	13.0
<b>Mean</b>	<b>18.3</b>	<b>48.2</b>	<b>6.2</b>	<b>18.6</b>	<b>20.1</b>	<b>16.3</b>	<b>77.0</b>	<b>11.9</b>	<b>11.6</b>

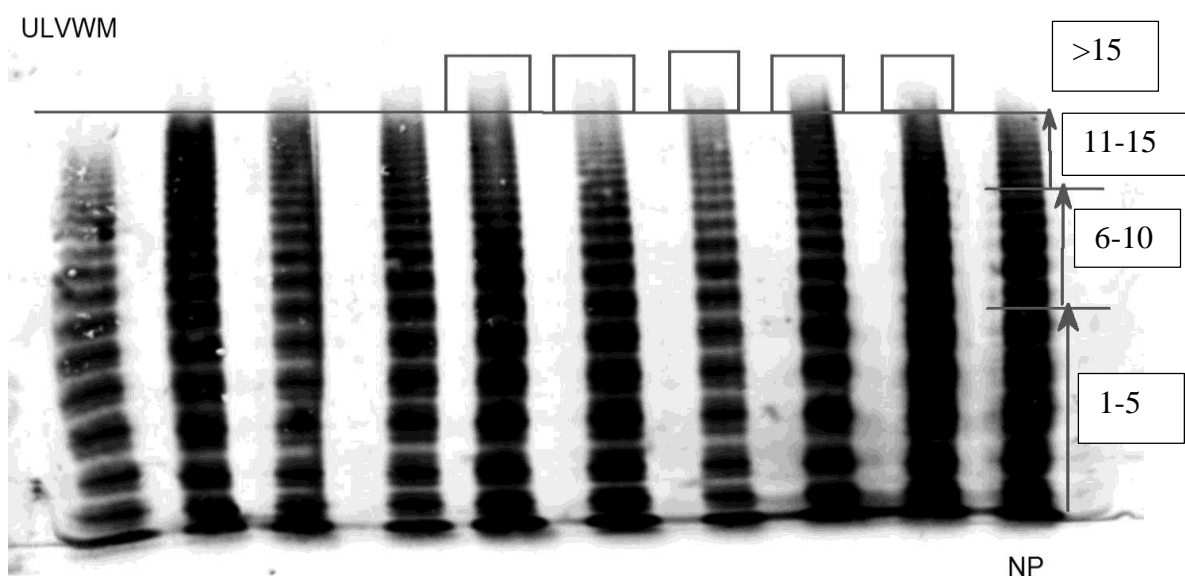
## 5.2. UL-VWFM analízise CRC betegekben

Az 55 mintát 6 külön 1,2 %<sub>v</sub> %-os SDS-agaróz gélen futtattuk, minden gélen egy normál kontrollal. A mintákat a már említett két csoportban mértük, 1. csoport: n=28 minta a legmagasabb VWF:Ag szinttel és legalacsonyabb ADAMTS-13 aktivitással, 2. csoport: n=27 a legalacsonyabb VWF:Ag szinttel, és legmagasabb ADAMTS-13 aktivitással. A vizsgált minták eredményeit a **9. táblázat** foglalja össze.

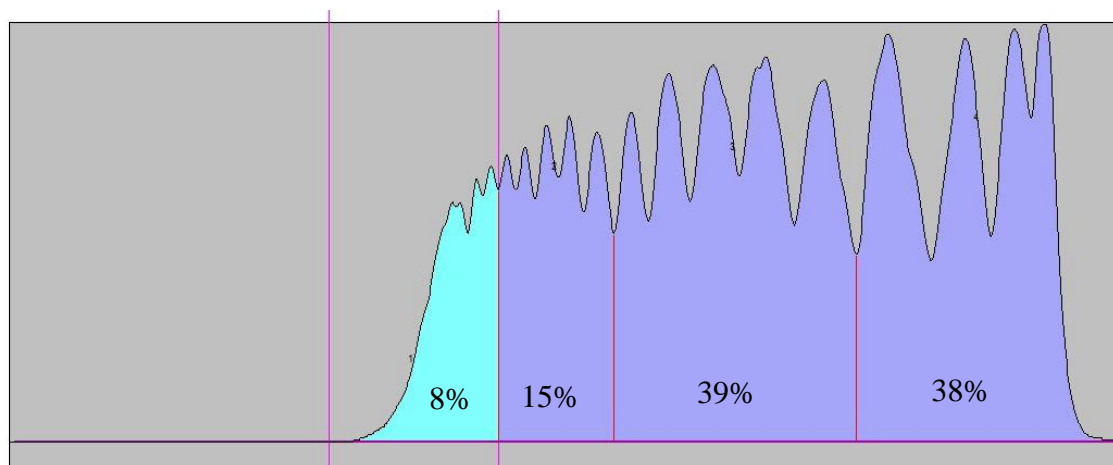
**9. táblázat** A multimer analízissel vizsgált minták eredményei. <sup>a</sup> Magas VWF/alacsony ADAMTS-13 csoport, ahol VWF:Ag >305,6 ng/mL, ADAMTS-13 aktivitás ≤66,53%; alacsony VWF/magas ADAMTS-13 csoport, ahol VWF:Ag ≤ 305,6 ng/mL, ADAMTS-13 activity >66,53% .<sup>b</sup> Chi<sup>2</sup> teszt vagy Mann–Whitney t-teszt. <sup>c</sup> Medián és interquartilis tartomány vagy szám és százalék.

	Magas VWF/alacsony ADAMTS-13 aktivitás <sup>a</sup>	Alacsony VWF/magas ADAMTS-13 aktivitás <sup>a</sup>	<i>p</i> <sup>b</sup>
Esetszám	28	27	
ADAMTS-13 aktivitás(%)	52 (46-60) <sup>c</sup>	97 (87-109)	<0,0001
VWF:Ag (ng/ml)	1604 (1137–2971)	183 (143–217)	<0,0001
UL-VWFM jelenléte (n)	18 (66.7%)	9 (32.1%)	0,01

A minták előhívásakor túlexponálva jelenítettük meg az ultra-nagy multimereket, majd a normál plazmára vetítettük mindegyiket (n=55) a denzitometriás elemzéshez, ez alapján az 1. csoportban a minták 67%-ban mutattunk ki UL-VWF multimert, míg a 2. csoportban csak 32%-ban, ami statisztikailag szignifikáns eltérés ( $p < 0,01$ ), megjelenítésük a **30.** és **31. ábrán** látható.



**30. ábra** 9 CRC minta elemzése normál poolozott plazma kontroll mellett (NP). A négyszögek jelölik az UL-VWFM-t.



**31. ábra** A vizsgálati anyagból választott, UL-VWFM-t tartalmazó minta denzitometrikus képe és elemzése. Az 1-5 oligomer sáv (az 1-2 szétválasztása ritkán sikerül, ezért duplán számolandó) megoszlása: 38%; 6-10: 39%; 11-15: 15% és a >15 oligomer (ami a tényleges szokatlan nagy molekulásúly) 8%

## 6. MEGBESZÉLÉS

### 6.1. COMPASS-VWF

A várakozásoknak megfelelően az újabb tesztek [VWF:GPIbR HemosIL latex agglutinációs teszt (178), a HemosIL AcuStar teszt, VWF:GPIbM Siemens Innovance Act. Siemens (175, 181, 182, 233, 234), VWF:Ab IL teszt (235, 236)] eredményei közelítettek a régóta referenciának használt és gold-standardnak tartott VWF:RCo teszthez, így hasonlóan jól teljesítettek. A VWF:Ab és VWF:GPIbM statisztikailag szignifikánsan és konzisztensen eltérő eredményeket adott, az összes résztvevő laboratóriumban (meredekebb regressziós egyenessel), azonban ezek az eltérések klinikai és biológiai következményekkel nem járnak. Ha az eltérést számszerűsítjük, akkor például, ha a VWF:RCo teszttel 20 IU/dL értéket kapunk, az a VWF:GPIbM aktivitással 23 IU/dL, illetve, ahol a VWF:RCo eredménye 100 IU/dL, az a VWF:GPIbM tesztnél 110 IU/dL értéket jelent, ami diagnosztikailag nem ad eltérő végeredményt. A VWF:Ab esetében hasonlóan alakultak az értékek, VWF:Ab teszt 20 IU/dL vs. 23 IU/dL és 100 IU/dL vs. 113 IU/dL. Ahhoz, hogy a lehetséges technikai hibákat kiszűrjük és a megjelent statisztikai eltérések okát feltárjuk, a tesztek külön-külön laboratóriumként is megvizsgáltuk, és a mérési eredményeket analizáltuk, ugyanis annak az esélye minimális, hogy minden labor ugyan annál a tesztnél kövessen el mérési vagy minta előkészítési hibát. Megállapítottuk, hogy a különbségek következetesek voltak az összes résztvevő laboratóriumban, ami arra utal, hogy az eltéréseket a tesztek közötti metodikai differenciák adják, ezt támasztja alá az az eredmény is, hogy az eltérések mind a beteg, mind pedig a normál minták eredményeinél megjelentek. Érdekesség, hogy a VWF:GPIbM metodikánál hasonló különbséget már más kutatások is bemutattak (237, 238), azonban ezek a hibák nem mindenhol jelentek meg (234). Az eltérések oka még nem tisztázott, és ahogy már említettük, a kis diszkrpanciák nem járnak klinikai következményekkel, azonban a laboratóriumi gyakorlatban lehet jelentősége, például tesztek összehasonlításánál, újonnan bevezetendő vizsgálatok tesztelésénél, valamint külső körkontrollok értékelésénél. Ahogy az 1.ábrán látható, néhány minta eltérő eredményeket adott a különböző tesztekben, amely a tesztek metodikájából eredhet.

Például a rekombináns mutáns p.P1467S minta mindegyik ristocetint használó tesztben fals alacsony aktivitást mutat (239), nem úgy a VWF:GPIbM és VWF:Ab vizsgálatokkal, azonban a többi minta esetében a különbségek kialakulásának/megjelenésének az oka még ismeretlen.

A **4. táblázatban** látható, hogy az új tesztekhez képest a VWF:RCo szenzitivitása rosszabb, a legtöbb labor esetében (ahol az eredeti, nem egy átdolgozott speciális protokollt használnak) 10 IU/dL körül mozog. A két legérzékenyebb tesztnek az in-house ELISA VWF:GPIbM és a kemilumineszcenzus detektálási platformon és elvvel működő AcuStar VWF:GPIbR vizsgálatok bizonyultak, mindkét teszt 1 IU/dL alatt is képes detektálni. A VWF:GPIbM és a VWF:GPIbR metodikák LLOD tartománya 3–4 IU/dL és 3–6 IU/dL, míg a VWF:Ab mérések a legkevésbé szenzitívek (LLOD, 19 IU/dL). A VWF aktivitás egyik legfontosabb jellemzője a szenzitivitás, melynek fejlődése az újonnan megjelenő tesztek legfőbb értéke, ugyanis egy közepesen erős és súlyos VWB diagnosztikájához elengedhetetlen a minél alacsonyabb értékek pontos mérése is.

Bár ebben a vizsgálatban az általánosan használt validálási és inter-laboratóriumi validálási technikát (1 minta mérése több napon keresztül, egy platformon, számos replikátummal vs. a vizsgálatunk sok minta, több platform de kevés replikátum) követtük, mégis módszerünk tükrözi a „valóságos” mérési körülményeket. Ahogy az irodalom is jelzi, ez oka lehet a magasabb CV értékeknek is, mely CV értékek a patológiás tartományban magasabbak, mint a normálban. A HemosIL VWF:GPIbR kivételével minden új vizsgálat jobb reprodukálhatóságot mutatott, mint a VWF:RCo teszt, annak ellenére, hogy a VWF:RCo mérésszáma nagyobb volt (öt vs. négy). A HemosIL kissé magasabb koeficiens értékét nem tudjuk megmagyarázni, ez a különbség a korábbi vizsgálatokban nem volt kimutatható.

Elvileg a különböző kalibrátorok használata a különböző laboratóriumokban potenciálisan megmagyarázhatná az eltérések egy részét. Egységes kalibrátorként az SSC VWF kalibrátor plazmáját használtuk. Az SSC plazma korlátozott hozzáférhetősége miatt azonban csak két laboratórium használta kiegészítőként (2 teszthez). A két kalibrátor közel azonos eredményt hozott, ezért nem gondoljuk, hogy a kalibrátorok hozzájárultak a megfigyelt eltérésekhez.

Bár optimális esetben minden laboratórium meghatározza az általa használt tesztek referencia tartományát és sokszor a gyártó is tesz rá javaslatot, mi is meghatároztuk az 53 normál minta aktivitási értékeinek felhasználásával (**28. ábra**). Bár itt is találtunk némi differenciát a tesztek között, azonban a normál tartományok megoszlása között statisztikai szignifikáns különbség nem volt kimutatható. Ami megfigyelhető a Gauss-görbéken, hogy nem adják tökéletesen vissza a normál eloszlás megszokott képét, hanem enyhe jobbra tolódás látható a magasabb aktivitási értékek felé. Ezt a képet a VWF-al foglalkozó kutatók több populációban megfigyelték, azonban ennek az okát máig nem sikerült megfejteni (240).

**Hibásan magas eredményt adnak az ELISA tesztek 2B típusú VWB-ben.** A VWF:GPIbM (241) teszt mutáns GPIb receptort használ, ami így a thrombocyta típusú (pseudo-) VWB-t imitálja, ahol a gain-of-function mutáció spontán (azaz ristocetin nélkül) kötődést hoz létre a VWF és GPIb között. Az tudott, hogy a 2B típusú betegekben a VWF:GPIbM/VWF:Ag emelkedett a VWF:RCo/VWF:Ag arányhoz képest. Egy 32 2B típusú VWB-t vizsgáló kutatás azt javasolja az emelkedett VWF:GPIbM/VWF:VWFRCo ráta használható lenne a 2B betegek azonosítására (242). Mindkét kutatás ELISA rendszerrel használta a VWF:GPIbM tesztet, szerintük a GPIbM fals negatívitás oka, hogy a GPIb mutáns receptor túl erőteljesen köt be a 2B típusú betegek amúgy is fogékony faktorába. Saját eredményeink szerint azonban nem a gain-of-function mutáns jelenléte vagy hiánya okozza a rossz értéket, hanem maga az ELISA metodika. Ezt alátámasztja, hogy csak ELISA tesztben jött ki valótlan eredmény, ráadásul a GPIbR teszt, ahol szintén fals érték jött ki, nem is a mutáns GPIb-vel dolgozik; valamint a latex alapú GPIbM teszt, mely mutáns a normális alacsony értéket mutatta. Annak megválaszolása azonban, hogy az ELISA tesztekkel mért magas értékek mechanizmusa mi, még válaszra vár.

**Hibásan magas VWF:Ab eredmény a p.V1665E mutációnál.**

A VWF:Ab aktivitás antitestje direktben köt be a VWF A1 doménjébe. Valószínűsíthető, hogy az antitest felülete a mutáció okozta konformáció változásra érzéketlen. Érdekeség, hogy egy másik tanulmányban, ugyanezt a mutációt 2B altípusra határozták meg a VWF:GPIbM/VWF:RCo arány alapján, nálunk ugyanez az érték nem mutatkozik (243).

### **Fals értékek homozigóta p.C2362F esetén, illetve 1 Vicenza betegnél a hétből, a VWF:GPIbR (HemosIL) teszttel.**

Ezekben az esetekben nem találtunk egyedi magyarázatot a tesztek viselkedésére. Feltételezésünk szerint ezeknél a mutációkkal kapcsolatban nincs általános hiba a tesztekben. Valószínűsíthetően a mintákban van valamilyen interferáló tényező, ami zavarja a mérést, például reumafaktor vagy heterofil antitest jelenléte (180). Sajnos a minták limitált száma miatt további méréseket nem tudtunk végezni, így ezt a feltételezést nem tudtuk bizonyítani.

### **Hibásan alacsony VWF aktivitás a ristocetint használó teszteknel p.P1467S mutációk esetén (kivéve az AcuStar VWF:GPIbR).**

Feltételezhető, hogy az AcuStar metodikájában és reagenseinek különbségében áll az eltérés oka. Sajnos a gyártó nem ad ki információt a reagenseiről, de feltételezzük, hogy nagyobb (jóval nagyobb?) mennyiségű ristocetint tartalmaz, mint a többi gyártó tesztjei. Bár a mutáció a ristocetin kötőhelyét érinti, az esetleges extrém dózis feltehetően „áttöri” ezt az inhibíciót, ezért kapunk normál értéket.

## **6.2. Az UL-VWFM CRC betegekben**

Előző tanulmányok vizsgálták majd bizonyították is a VWF szerepét a különböző típusú tumorok működésében és propagálásában, valamint a VWF-thrombocita kapcsolódás elősegítette, metasztázisok megjelenésében (244). Ismert, hogy a VWF nagy és ultra nagy molekulásúlyú multimerjei hemosztatikusan a legaktívabbak, így patológiás esetben thrombotikus eseményeket is okozhatnak és okoznak is (245). A különböző útvonalon történő aktiváció után, emelkedett szintű VWF megjelenése tumoros betegekben már bizonyított fenomén (246). Jelen kutatás, a korábbi megfigyelésekkel összhangban, bemutatta és megerősítette, hogy az alacsony ADAMTS-13 aktivitás (átlag 72.28%) és az extrém magas VWG:Ag szint (átlag 677.86 ng/mL) mellett megjelenő UL-VWFM mennyisége statisztikailag szignifikánsan növekszik a vizsgált beteg populációban,

magával hozva az emelkedett aktivitással járó thrombózisokat, így csökkentve a CRC betegek túlélési esélyeit.

A multimer analízis denzitometriás eredményeit a VWF:Ag és ADAMTS-13 aktivitással korreláltattuk az „alacsony ADAMTS-13/magas VWF” és a „magas ADAMTS-13/alacsony VWF” csoportokban a thromboembóliás szövődmények tekintetében. Statisztikailag szignifikánsan magasabb a thrombotikus esetek száma (20/28 beteg, 74,1%) az ultra-nagy von Willebrand multimerrel rendelkező csoportban (alacsony ADAMTS-13/magas VWF csoport), míg a másik csoport eredménye (7/27 beteg, 25%). A vizsgálatok csak CRC-s betegekben történtek, egészséges kontroll csoport vagy más daganattípusú csoport nem került bevonásra.

A kutatás egyéb eredményeit fel nem használva, csak általánosan érintve elmondható, hogy a vizsgálat bizonyította a nemzetközi szakirodalom eredményeit, azonban egyedülállóan nagy betegszámmal dolgozott. A teljes 232 fős vizsgált populációra elmondható, hogy a magas thrombocyta szám, magas VWF:Ag szint, valamint az alacsony ADAMTS-13 aktivitás szignifikánsan rontja a beteg túlélési esélyeit és csökkenti a thrombotikus esemény nélküli betegség lefolyását.

A teljes betegcsoportot a CRC stádiumai szerint három csoportra bontva (1+2., valamint 3. és 4. stádiumú betegek), a thrombocytaszám és VWF:Ag szint fokozatos emelkedését észleltük, míg az ADAMTS-13 aktivitás fokozatosan csökkent. Ez a különbség statisztikailag is szignifikáns az 1+2 és 3 vs. 4 csoportban. Ugyanezen megállapításokat lehet tenni a vizsgált paraméterek és a thrombotikus események tekintetében is (nagyjából megegyező ~2 Hazard Ratio-val).

Összefoglalva, elmondhatjuk, hogy a VWF multimer analízis hasznos eszköznek bizonyult e betegcsoport prognózisának megítélésében.



## 7. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatásaink főbb eredményei pontokba szedve:

- Laboratóriumunk nagy mintaszámos (n=95) nemzetközi kutatást vezényelt le, majd publikálta az eredményeket és a levont következtetéseket. Egyedi az ilyen nagyságú összemérés, melyet a Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság is támogatott.
- Bemutattuk, hogy a „gold-standard” VWF:RCo eredményeihez hasonlítva statisztikailag szignifikáns, de klinikailag jelentéktelen eltérések jellemzik, az új tesztek (VWF:Ab és VWF:GPIbM), melyek módszerek sajátossága, ezért az eltérések minden laboratóriumban jelen vannak.
- Szenzitivitásukat vizsgálva megállapítottuk, hogy az AcuStar VWF:GPIbR tesztje adja a legjobb eredményt (<0,5 IU/dL LLOD), míg az eredeti VWF:RCo a legrosszabbat (~10 IU/dL).
- Precizitásában szintén az AcuStar VWF:GPIbR tesztje adta a legalacsonyabb variációs koefficiens értéket (CV%) 12,1% eredménnyel.
- Az eredmények közül, súlyozottan vizsgálva a kilógó értékeket, bemutattuk, hogy a résztvevő összes ELISA metodika hibásan magasabbra méri a 2B altípusú VWB értékeit.
- Az AcuStar VWF:GPIbR teszt az egyedüli a ristocetint használó tesztek közül, amelyik a p.P1467S mutációval rendelkező VWB értékeit normál szintűre méri, minden más teszt fals alacsony eredményt ad ebben az esetben.
- Bemutattuk, hogy az általunk végzett VWF multimer analízis nem csak a VWB tipizálására használható.
- 55 beteg CRC beteg denzitometriás eredményeinek statisztikai értékelésével bizonyítottuk az UL-VWFM jelenlétét és szignifikáns emelkedését a magas eredményű VWF:Ag és alacsony ADAMTS-13 aktivitású csoportban.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásainkban több, különböző oldalról és módszerrel vizsgáltuk a von Willebrand faktor és a von Willebrand betegség laboratóriumi diagnosztikájának fejlesztési és felhasználási lehetőségeit. Elsődlegesen egy nagy, nemzetközi összemérésben, 8 laboratóriumban 53 normál, egészséges, illetve 42, genetikailag is bizonyítottan, von Willebrand beteg mintáját vizsgáltuk a kereskedelmi forgalomban elérhető aktivitási tesztekkel, melyeket a „gold standard” VWF:RCo aktivitással hasonlítottunk össze. A kiválasztott tesztekben először a mérési mechanizmusok egymástól való eltéréseit értékeltük, statisztikai módszerekkel megerősítve, majd a kapott eredmények és differenciák tükrében az egyedi beteg mintáknál észlelt eltéréseket tanulmányoztuk. A nyolc labor összesített eredményei alapján elmondható, hogy bár minor különbségek tapasztalhatók a különböző aktivitások között, melyek ugyan statisztikailag is szignifikánsak, azonban ezeket az eltéréseket a napi rutinra kivetítve nem kapunk klinikailag is releváns hibákat. Elmondható, hogy összességében minden teszt „jól szerepelt” (érzékenység és precizitás tekintetében is) az összemérésünkben, minden vizsgálat lényegében korrelált az eredeti, standardnak használt ristocetin kofaktor aktivitással. Az egyéni eltéréseket elemezve több konzekvens hibát tapasztaltunk, i) minden ELISA alapú mérés eltévesztette a 2B altípusú VWB-ket, melynek oka valószínűleg magában az ELISA technikában rejlik, ii) a p.P1467S mutációt fals alacsonyra mérte minden ristocetint használó teszt, az AcuStar VWF:GPIbR kivételével. Laboratóriumunk egyik különlegessége a precízen művelt VWF multimer analízis, melynek fontos szerepe van a VWB diagnosztikában. Ezt az analízist használtuk vastagbél tumoros betegek mintáinak elemzésében is, bizonyítva a hemosztatikusan extrémén aktív, extra nagy multimerok jelenlétét a betegekben. Denzitometriás eljárással számszerűsítettük a multimerok megoszlásának mértékét, a normál plazmához viszonyítva, így nem csak szubjektíven ítélni lehet meg a mintázat, hanem matematikailag és statisztikailag is. Ezeket az értékeket is felhasználva, bizonyítottuk, hogy a vizsgált CRC betegpopulációban a kiválasztott tesztek eredményei (ADAMTS-13 aktivitás, VWF szint, UL-VWFM szint) prognosztikus értékűek lehetnek. Mindent összevetve, kutatásaink a VWF diagnosztikus vizsgálatainak és felhasználási területeinek bővítését, illetve ismereteink gyarapítását szolgálták.

## 9. SUMMARY

In our research, we examined the development and use of the laboratory diagnostics of von Willebrand factor and von Willebrand's disease from different sides and methods. Primarily, in a large international study, in 8 laboratories, 53 normal, healthy, and 42 genetically proven, von Willebrand disease patients were tested on commercially available activity tests compared to the "gold standard" VWF:RCo activity. In the selected tests, we first evaluated the differences in the measurement mechanisms, confirmed by statistical methods, and then, in the light of the results and differences obtained, the differences observed in individual patient samples were studied. On the basis of the combined results of the eight laboratories, although there were minor differences between the different activities, which were statistically significant, however, these differences were not clinically relevant for the daily routine. We can say, overall, all tests were "done well" (in sensitivity and precision) in our comparison, all of the studies correlated with the original, standard used, ristocetin cofactor activity. Analyzing individual differences, we found several consistent errors: (i) all ELISA-based measurements have lost the subtype 2B VWD, probably due to ELISA method itself; ii) the p.P1467S mutation was measured false low for all testing using ristocetin except AcuStar VWF:GPIbR. One of the specialties of our laboratory is precisely performed VWF multimer analysis, which plays an important role in VWD diagnostics. This analysis was also used to analyze samples of patients with colon cancer, demonstrating the presence of extra large multimers in patients. Densitometry was used to quantify the distribution of multimers relative to normal plasma, so that the pattern can not be judged subjectively, but mathematically and statistically. Using all these values, we also demonstrated that the results of the selected tests (ADAMTS-13 activity, VWF level, UL-VWFM level) in the CRC patient population can be predictive. Our research has helped to expand the range of diagnostic tests for VWF and to increase our knowledge.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JCJ, Favaloro EJ, Hill FGH, Holmberg L, Ingerslev J, Lee CA, Lillicrap D, Mannucci M, Mazurier C, Meyer D, Nichols WL, Nishino M, Peake IR, Rodeghiero F, Schneppenheim R, Ruggeri ZM, Srivastava A, Montgomery RR, Federici AB, Working Party Von W. (2006) Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4: 2103-2114.
2. Lassila R, Lindberg O. (2013) Erik von Willebrand. *Haemophilia*, 19: 643-647.
3. Von Willebrand EA. (1999) Hereditary pseudohaemophilia. *Haemophilia*, 5: 223-231; discussion 222.
4. Zimmerman TS, Ratnoff OD, Powell AE. (1971) 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*, 50: 244-254.
5. Nyman DE, Blömbäck M, Frants RR, Wahlberg P. (1981) Recent investigations of the first bleeder family in Åland (Finland) described by von Willebrand. *Thromb Haemost*, 45: 4.
6. Ginsburg D, Handin RI, Bonthron DT, Donlon TA, Bruns GA, Latt SA, Orkin SH. (1985) Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science*, 228: 1401-1406.
7. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Lester-Mancuso TL, Le Beau MM, Sorace JM, Sadler JE. (1991) Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry*, 30: 253-269.
8. Goodeve AC. (2010) The genetic basis of von Willebrand disease. *Blood Reviews*, 24: 123-134.
9. Zhou YF, Eng ET, Zhu J, Lu C, Walz T, Springer TA. (2012) Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood*, 120: 449-458.

10. Katsumi A, Tuley EA, Bodo I, Sadler JE. (2000) Localization of disulfide bonds in the cystine knot domain of human von Willebrand factor. *J Biol Chem*, 275: 25585-25594.
11. Marti T, Rosselet SJ, Titani K, Walsh KA. (1987) Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry*, 26: 8099-8109.
12. Voorberg J, Fontijn R, Calafat J, Janssen H, van Mourik JA, Pannekoek H. (1991) Assembly and routing of von Willebrand factor variants: the requirements for disulfide-linked dimerization reside within the carboxy-terminal 151 amino acids. *J Cell Biol*, 113: 195-205.
13. Enayat MS, Surdhar GK, Theophilus BDM, Williams DM, Hill FGH. (1997) A new candidate mutation causing type IID von Willebrand disease in 3 patients in 3 generations of the same family. *Thrombosis and Haemostasis*: P2671-P2671.
14. Schneppenheim R, Brassard J, Krey S, Budde U, Kunicki TJ, Holmberg L, Ware J, Ruggeri ZM. (1996) Defective dimerization of von Willebrand factor subunits due to a Cys->Arg mutation in type IID von Willebrand disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 3581-3586.
15. Zhou YF, Springer TA. (2014) Highly reinforced structure of a C-terminal dimerization domain in von Willebrand factor. *Blood*, 123: 1785-1793.
16. Schneppenheim R, Budde U, Obser T, Brassard J, Drewke E, Krey S, Oldenburg J, Ruggeri ZM, Schwaab R, Ware J. (1999) Von Willebrand factor dimerization defects cause different types of von Willebrand disease. *Blood*, 94: 453a-453a.
17. Leebeek FW, Eikenboom JC. (2016) Von Willebrand's Disease. *N Engl J Med*, 375: 2067-2080.
18. Wagner DD. (1990) Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol*, 6: 217-246.
19. Dang LT, Purvis AR, Huang RH, Westfield LA, Sadler JE. (2011) Phylogenetic and functional analysis of histidine residues essential for pH-dependent multimerization of von Willebrand factor. *J Biol Chem*, 286: 25763-25769.
20. Lippok S, Kolsek K, Lof A, Eggert D, Vanderlinden W, Muller JP, Konig G, Obser T, Rohrs K, Schneppenheim S, Budde U, Baldauf C, Aponte-Santamaria

- C, Grater F, Schneppenheim R, Radler JO, Brehm MA. (2016) von Willebrand factor is dimerized by protein disulfide isomerase. *Blood*, 127: 1183-1191.
21. Mayadas TN, Wagner DD. (1989) In vitro multimerization of von Willebrand factor is triggered by low pH. Importance of the propeptide and free sulfhydryls. *J Biol Chem*, 264: 13497-13503.
  22. Canis K, McKinnon TA, Nowak A, Haslam SM, Panico M, Morris HR, Laffan MA, Dell A. (2012) Mapping the N-glycome of human von Willebrand factor. *Biochem J*, 447: 217-228.
  23. Carew JA, Browning PJ, Lynch DC. (1990) Sulfation of von Willebrand factor. *Blood*, 76: 2530-2539.
  24. Matsui T, Titani K, Mizuochi T. (1992) Structures of the asparagine-linked oligosaccharide chains of human von Willebrand factor. Occurrence of blood group A, B, and H(O) structures. *J Biol Chem*, 267: 8723-8731.
  25. Sporn LA, Chavin SI, Marder VJ, Wagner DD. (1985) Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest*, 76: 1102-1106.
  26. Haberichter SL, Merricks EP, Fahs SA, Christopherson PA, Nichols TC, Montgomery RR. (2005) Re-establishment of VWF-dependent Weibel-Palade bodies in VWD endothelial cells. *Blood*, 105: 145-152.
  27. Valentijn KM, Eikenboom J. (2013) Weibel-Palade bodies: a window to von Willebrand disease. *J Thromb Haemost*, 11: 581-592.
  28. Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, Voorberg J, Eikenboom J. (2011) Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood*, 117: 5033-5043.
  29. Huang RH, Wang Y, Roth R, Yu X, Purvis AR, Heuser JE, Egelman EH, Sadler JE. (2008) Assembly of Weibel-Palade body-like tubules from N-terminal domains of von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 482-487.
  30. Zhou YF EE, Nishida N, Lu C, Walz T, Springer TA. (2011) A pH-regulated dimeric bouquet in the structure of von Willebrand factor. *EMBO J*, 30: 13.
  31. Mannucci PM. (1995) Platelet von Willebrand factor in inherited and acquired bleeding disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 2428-2432.
  32. McGrath RT, McRae E, Smith OP, O'Donnell JS. (2010) Platelet von Willebrand factor--structure, function and biological importance. *Br J Haematol*, 148: 834-843.

33. Fernandez MF, Ginsberg MH, Ruggeri ZM, Batlle FJ, Zimmerman TS. (1982) Multimeric structure of platelet factor VIII/von Willebrand factor: the presence of larger multimers and their reassociation with thrombin-stimulated platelets. *Blood*, 60: 1132-1138.
34. Springer TA. (2014) von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. *Blood*, 124: 1412-1425.
35. Giblin JP, Hewlett LJ, Hannah MJ. (2008) Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Blood*, 112: 957-964.
36. Matsuuchi L, Kelly RB. (1991) Constitutive and basal secretion from the endocrine cell line, AtT-20. *J Cell Biol*, 112: 843-852.
37. Tsai HM, Nagel RL, Hatcher VB, Seaton AC, Sussman, II. (1991) The high molecular weight form of endothelial cell von Willebrand factor is released by the regulated pathway. *Br J Haematol*, 79: 239-245.
38. Holthenrich A, Gerke V. (2018) Regulation of von-Willebrand Factor Secretion from Endothelial Cells by the Annexin A2-S100A10 Complex. *Int J Mol Sci*, 19.
39. Nightingale T, Cutler D. (2013) The secretion of von Willebrand factor from endothelial cells; an increasingly complicated story. *J Thromb Haemost*, 11 Suppl 1: 192-201.
40. Rojo Pulido I, Nightingale TD, Darchen F, Seabra MC, Cutler DF, Gerke V. (2011) Myosin Va acts in concert with Rab27a and MyRIP to regulate acute von-Willebrand factor release from endothelial cells. *Traffic*, 12: 1371-1382.
41. Brandherm I, Disse J, Zeuschner D, Gerke V. (2013) cAMP-induced secretion of endothelial von Willebrand factor is regulated by a phosphorylation/dephosphorylation switch in annexin A2. *Blood*, 122: 1042-1051.
42. Hamilton KK, Sims PJ. (1987) Changes in cytosolic Ca<sup>2+</sup> associated with von Willebrand factor release in human endothelial cells exposed to histamine. Study of microcarrier cell monolayers using the fluorescent probe indo-1. *J Clin Invest*, 79: 600-608.
43. Lam FW, Cruz MA, Parikh K, Rumbaut RE. (2016) Histones stimulate von Willebrand factor release in vitro and in vivo. *Haematologica*, 101: e277-279.

44. Casari C, Du V, Wu YP, Kauskot A, de Groot PG, Christophe OD, Denis CV, de Laat B, Lenting PJ. (2013) Accelerated uptake of VWF/platelet complexes in macrophages contributes to VWD type 2B-associated thrombocytopenia. *Blood*, 122: 2893-2902.
45. van Schooten CJ, Shahbazi S, Groot E, Oortwijn BD, van den Berg HM, Denis CV, Lenting PJ. (2008) Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII in vivo. *Blood*, 112: 1704-1712.
46. Casari C, Lenting PJ, Wohner N, Christophe OD, Denis CV. (2013) Clearance of von Willebrand factor. *J Thromb Haemost*, 11 Suppl 1: 202-211.
47. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. (2015) von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood*, 125: 2019-2028.
48. Rastegarlarlari G, Pegon JN, Casari C, Odouard S, Navarrete AM, Saint-Lu N, van Vlijmen BJ, Legendre P, Christophe OD, Denis CV, Lenting PJ. (2012) Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Blood*, 119: 2126-2134.
49. Saenko EL, Yakhyayev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Sarafanov AG. (1999) Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem*, 274: 37685-37692.
50. Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA, Schiphorst ME, de Groot PG, Sixma JJ, Gros P. (2002) Structures of glycoprotein I $\alpha$  and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science*, 297: 1176-1179.
51. Yee A, Gildersleeve RD, Gu S, Kretz CA, McGee BM, Carr KM, Pipe SW, Ginsburg D. (2014) A von Willebrand factor fragment containing the D'D3 domains is sufficient to stabilize coagulation factor VIII in mice. *Blood*, 124: 445-452.
52. Sadler JE. (1998) Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*, 67: 395-424.
53. Haberichter SL, Jozwiak MA, Rosenberg JB, Christopherson PA, Montgomery RR. (2002) The von Willebrand factor propeptide (VWFpp) traffics an unrelated protein to storage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22: 921-926.



54. Mayadas TN, Wagner DD. (1992) Vicinal cysteines in the prosequence play a role in von Willebrand factor multimer assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 3531-3535.
55. Madabhushi SR, Shang C, Dayananda KM, Rittenhouse-Olson K, Murphy M, Ryan TE, Montgomery RR, Neelamegham S. (2012) von Willebrand factor (VWF) propeptide binding to VWF D'D3 domain attenuates platelet activation and adhesion. *Blood*, 119: 4769-4778.
56. Saenko EL, Scandella D. (1997) The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von willebrand factor. *J Biol Chem*, 272: 18007-18014.
57. Yee A, Oleskie AN, Dosey AM, Kretz CA, Gildersleeve RD, Dutta S, Su M, Ginsburg D, Skiniotis G. (2015) Visualization of an N-terminal fragment of von Willebrand factor in complex with factor VIII. *Blood*, 126: 939-942.
58. Castro-Nunez L, Bloem E, Boon-Spijker MG, van der Zwaan C, van den Biggelaar M, Mertens K, Meijer AB. (2013) Distinct roles of Ser-764 and Lys-773 at the N terminus of von Willebrand factor in complex assembly with coagulation factor VIII. *J Biol Chem*, 288: 393-400.
59. Chiu PL, Bou-Assaf GM, Chhabra ES, Chambers MG, Peters RT, Kulman JD, Walz T. (2015) Mapping the interaction between factor VIII and von Willebrand factor by electron microscopy and mass spectrometry. *Blood*, 126: 935-938.
60. Przeradzka MA, Meems H, van der Zwaan C, Ebberink E, van den Biggelaar M, Mertens K, Meijer AB. (2018) The D' domain of von Willebrand factor requires the presence of the D3 domain for optimal factor VIII binding. *Biochem J*, 475: 2819-2830.
61. Ruggeri ZM. (2003) Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost*, 1: 1335-1342.
62. Ulrichs H, Udvardy M, Lenting PJ, Pareyn I, Vandeputte N, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. (2006) Shielding of the A1 domain by the D'D3 domains of von Willebrand factor modulates its interaction with platelet glycoprotein Ib-IX-V. *J Biol Chem*, 281: 4699-4707.
63. Baronciani L, Federici AB, Beretta M, Cozzi G, Canciani MT, Mannucci PM. (2005) Expression studies on a novel type 2B variant of the von Willebrand factor

- gene (R1308L) characterized by defective collagen binding. *J Thromb Haemost*, 3: 2689-2694.
64. Bonnefoy A, Yamamoto H, Thys C, Kito M, Vermynen J, Hoylaerts MF. (2003) Shielding the front-strand beta 3 of the von Willebrand factor A1 domain inhibits its binding to platelet glycoprotein Iba1. *Blood*, 101: 1375-1383.
  65. Morales LD, Martin C, Cruz MA. (2006) The interaction of von Willebrand factor-A1 domain with collagen: mutation G1324S (type 2M von Willebrand disease) impairs the conformational change in A1 domain induced by collagen. *J Thromb Haemost*, 4: 417-425.
  66. Adachi T, Matsushita T, Dong Z, Katsumi A, Nakayama T, Kojima T, Saito H, Sadler JE, Naoe T. (2006) Identification of amino acid residues essential for heparin binding by the A1 domain of human von Willebrand factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 339: 1178-1183.
  67. Blenner MA, Dong X, Springer TA. (2014) Structural basis of regulation of von Willebrand factor binding to glycoprotein Ib. *J Biol Chem*, 289: 5565-5579.
  68. Luken BM, Winn LY, Emsley J, Lane DA, Crawley JT. (2010) The importance of vicinal cysteines, C1669 and C1670, for von Willebrand factor A2 domain function. *Blood*, 115: 4910-4913.
  69. Zhang Q, Zhou YF, Zhang CZ, Zhang X, Lu C, Springer TA. (2009) Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 9226-9231.
  70. Xu AJ, Springer TA. (2012) Calcium stabilizes the von Willebrand factor A2 domain by promoting refolding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 3742-3747.
  71. Lynch CJ, Lane DA. (2016) N-linked glycan stabilization of the VWF A2 domain. *Blood*, 127: 1711-1718.
  72. Lynch CJ, Lane DA, Luken BM. (2014) Control of VWF A2 domain stability and ADAMTS13 access to the scissile bond of full-length VWF. *Blood*, 123: 2585-2592.
  73. Xiang Y, de Groot R, Crawley JT, Lane DA. (2011) Mechanism of von Willebrand factor scissile bond cleavage by a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13 (ADAMTS13). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 11602-11607.

74. Cruz MA, Yuan H, Lee JR, Wise RJ, Handin RI. (1995) Interaction of the von Willebrand factor (vWF) with collagen. Localization of the primary collagen-binding site by analysis of recombinant vWF a domain polypeptides. *J Biol Chem*, 270: 10822-10827.
75. Romijn RA, Westein E, Bouma B, Schiphorst ME, Sixma JJ, Lenting PJ, Huizinga EG. (2003) Mapping the collagen-binding site in the von Willebrand factor-A3 domain. *J Biol Chem*, 278: 15035-15039.
76. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. (1998) Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*, 94: 657-666.
77. Xu ER, von Bulow S, Chen PC, Lenting PJ, Kolsek K, Aponte-Santamaria C, Simon B, Foot J, Obser T, Schneppenheim R, Grater F, Denis CV, Wilmanns M, Hennig J. (2019) Structure and dynamics of the platelet integrin-binding C4 domain of von Willebrand factor. *Blood*, 133: 366-376.
78. O'Leary JM, Hamilton JM, Deane CM, Valeyev NV, Sandell LJ, Downing AK. (2004) Solution structure and dynamics of a prototypical chordin-like cysteine-rich repeat (von Willebrand Factor type C module) from collagen IIA. *J Biol Chem*, 279: 53857-53866.
79. Sing CE, Alexander-Katz A. (2010) Elongational flow induces the unfolding of von Willebrand factor at physiological flow rates. *Biophys J*, 98: L35-37.
80. Dong JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, Schade AJ, McIntire LV, Fujikawa K, Lopez JA. (2002) ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood*, 100: 4033-4039.
81. Savage B, Sixma JJ, Ruggeri ZM. (2002) Functional self-association of von Willebrand factor during platelet adhesion under flow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 425-430.
82. Schneider SW, Nuschele S, Wixforth A, Gorzelanny C, Alexander-Katz A, Netz RR, Schneider MF. (2007) Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 7899-7903.
83. Springer TA. (2011) Biology and physics of von Willebrand factor concatamers. *J Thromb Haemost*, 9 Suppl 1: 130-143.

84. Akyol O, Akyol S, Chen CH. (2016) Update on ADAMTS13 and VWF in cardiovascular and hematological disorders. *Clin Chim Acta*, 463: 109-118.
85. Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, Chung D. (2001) Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood*, 98: 1662-1666.
86. Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K. (2001) Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem*, 276: 41059-41063.
87. Tsai HM. (1996) Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*, 87: 4235-4244.
88. Mohlke KL, Ginsburg D. (1997) von Willebrand disease and quantitative variation in von Willebrand factor. *J Lab Clin Med*, 130: 252-261.
89. James PD, Notley C, Hegadorn C, Leggo J, Tuttle A, Tinlin S, Brown C, Andrews C, Labelle A, Chirinian Y, O'Brien L, Othman M, Rivard G, Rapson D, Hough C, Lillicrap D. (2007) The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study. *Blood*, 109: 145-154.
90. Miller CH, Haff E, Platt SJ, Rawlins P, Drews CD, Dilley AB, Evatt B. (2003) Measurement of von Willebrand factor activity: relative effects of ABO blood type and race. *J Thromb Haemost*, 1: 2191-2197.
91. Cumming A, Grundy P, Keeney S, Lester W, Enayat S, Guilliat A, Bowen D, Pasi J, Keeling D, Hill F, Bolton-Maggs PH, Hay C, Collins P, Organisation UKHCD. (2006) An investigation of the von Willebrand factor genotype in UK patients diagnosed to have type 1 von Willebrand disease. *Thromb Haemost*, 96: 630-641.
92. Hickson N, Hampshire D, Winship P, Goudemand J, Schneppenheim R, Budde U, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, James P, Peake I, Eikenboom J, Goodeve A, McMdm VWD, groups Z-Vs. (2010) von Willebrand factor variant p.Arg924Gln marks an allele associated with reduced von Willebrand factor and factor VIII levels. *J Thromb Haemost*, 8: 1986-1993.

93. Sandra L. Haberichter DAJ, Paula M. Jacobi. (2013) Upstream Mechanisms Causing Type 1C Von Willebrand Disease (VWD): Contribution Of Defective Von Willebrand Factor (VWF) Multimerization, Regulated Storage, and Secretion. *Blood*, 122.
94. Sadler JE. (2003) Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. *Blood*, 101: 2089-2093.
95. Nichols WL, Hultin MB, James AH, Manco-Johnson MJ, Montgomery RR, Ortel TL, Rick ME, Sadler JE, Weinstein M, Yawn BP. (2008) von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia*, 14: 171-232.
96. Favaloro EJ. (2011) Von Willebrand disease: local diagnosis and management of a globally distributed bleeding disorder. *Semin Thromb Hemost*, 37: 440-455.
97. Laffan MA, Lester W, O'Donnell JS, Will A, Tait RC, Goodeve A, Millar CM, Keeling DM. (2014) 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*, 167: 453-465.
98. Hassenpflug WA, Budde U, Obser T, Angerhaus D, Drewke E, Schneppenheim S, Schneppenheim R. (2006) Impact of mutations in the von Willebrand factor A2 domain on ADAMTS13-dependent proteolysis. *Blood*, 107: 2339-2345.
99. Hampshire DJ, Goodeve AC. (2011) The international society on thrombosis and haemostasis von Willebrand disease database: an update. *Semin Thromb Hemost*, 37: 470-479.
100. Gaucher C, Dieval J, Mazurier C. (1994) Characterization of von Willebrand factor gene defects in two unrelated patients with type IIC von Willebrand disease. *Blood*, 84: 1024-1030.
101. Haberichter SL, Budde U, Obser T, Schneppenheim S, Wermes C, Schneppenheim R. (2010) The mutation N528S in the von Willebrand factor (VWF) propeptide causes defective multimerization and storage of VWF. *Blood*, 115: 4580-4587.

102. Obser T, Ledford-Kraemer M, Oyen F, Brehm MA, Denis CV, Marschalek R, Montgomery RR, Sadler JE, Schneppenheim S, Budde U, Schneppenheim R. (2016) Identification and characterization of the elusive mutation causing the historical von Willebrand Disease type IIC Miami. *J Thromb Haemost*, 14: 1725-1735.
103. Pagliari MT, Baronciani L, Garcia Oya I, Solimando M, La Marca S, Cozzi G, Stufano F, Canciani MT, Peyvandi F. (2013) A synonymous (c.3390C>T) or a splice-site (c.3380-2A>G) mutation causes exon 26 skipping in four patients with von Willebrand disease (2A/IIIE). *J Thromb Haemost*, 11: 1251-1259.
104. Schneppenheim R, Michiels JJ, Obser T, Oyen F, Pieconka A, Schneppenheim S, Will K, Zieger B, Budde U. (2010) A cluster of mutations in the D3 domain of von Willebrand factor correlates with a distinct subgroup of von Willebrand disease: type 2A/IIIE. *Blood*, 115: 4894-4901.
105. Zimmerman TS, Dent JA, Ruggeri ZM, Nannini LH. (1986) Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (types IIC, IID, and IIE). *J Clin Invest*, 77: 947-951.
106. Casonato A, Gallinaro L, Cattini MG, Pontara E, Padrini R, Bertomoro A, Daidone V, Pagnan A. (2010) Reduced survival of type 2B von Willebrand factor, irrespective of large multimer representation or thrombocytopenia. *Haematologica*, 95: 1366-1372.
107. Rayes J, Hommais A, Legendre P, Tout H, Veyradier A, Obert B, Ribba AS, Girma JP. (2007) Effect of von Willebrand disease type 2B and type 2M mutations on the susceptibility of von Willebrand factor to ADAMTS-13. *J Thromb Haemost*, 5: 321-328.
108. Sadler JE. (2005) von Willebrand factor: two sides of a coin. *J Thromb Haemost*, 3: 1702-1709.
109. Casari C, Berrou E, Le Bret M, Adam F, Kauskot A, Bobe R, Desconclois C, Fressinaud E, Christophe OD, Lenting PJ, Rosa JP, Denis CV, Bryckaert M. (2013) von Willebrand factor mutation promotes thrombocytopathy by inhibiting integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *J Clin Invest*, 123: 5071-5081.

110. Ware J. (2013) Thrombocytopathy and type 2B von Willebrand disease. *J Clin Invest*, 123: 5004-5006.
111. Meyer D, Fressinaud E, Gaucher C, Lavergne JM, Hilbert L, Ribba AS, Jorieux S, Mazurier C. (1997) Gene defects in 150 unrelated French cases with type 2 von Willebrand disease: from the patient to the gene. INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease. *Thromb Haemost*, 78: 451-456.
112. James PD, Notley C, Hegadorn C, Poon MC, Walker I, Rapson D, Lillicrap D, Association of Hemophilia Clinic Directors of C. (2007) Challenges in defining type 2M von Willebrand disease: results from a Canadian cohort study. *J Thromb Haemost*, 5: 1914-1922.
113. Castaman G, Federici AB, Tosetto A, La Marca S, Stufano F, Mannucci PM, Rodeghiero F. (2012) Different bleeding risk in type 2A and 2M von Willebrand disease: a 2-year prospective study in 107 patients. *J Thromb Haemost*, 10: 632-638.
114. Larsen DM, Haberichter SL, Gill JC, Shapiro AD, Flood VH. (2013) Variability in platelet- and collagen-binding defects in type 2M von Willebrand disease. *Haemophilia*, 19: 590-594.
115. Schneppenheim R, Budde U, Krey S, Drewke E, Bergmann F, Lechler E, Oldenburg J, Schwaab R. (1996) Results of a screening for von Willebrand disease type 2N in patients with suspected haemophilia A or von Willebrand disease type 1. *Thromb Haemost*, 76: 598-602.
116. Gaucher C, Mercier B, Jorieux S, Oufkir D, Mazurier C. (1991) Identification of two point mutations in the von Willebrand factor gene of three families with the 'Normandy' variant of von Willebrand disease. *Br J Haematol*, 78: 506-514.
117. Mazurier C, Goudemand J, Hilbert L, Caron C, Fressinaud E, Meyer D. (2001) Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14: 337-347.
118. Eikenboom JC. (2001) Congenital von Willebrand disease type 3: clinical manifestations, pathophysiology and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14: 365-379.

119. Ahmad F, Budde U, Jan R, Oyen F, Kannan M, Saxena R, Schneppenheim R. (2013) Phenotypic and molecular characterisation of type 3 von Willebrand disease in a cohort of Indian patients. *Thromb Haemost*, 109: 652-660.
120. Baronciani L, Cozzi G, Canciani MT, Peyvandi F, Srivastava A, Federici AB, Mannucci PM. (2003) Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 30: 264-270.
121. Jokela V, Lassila R, Szanto T, Joutsu-Korhonen L, Armstrong E, Oyen F, Schneppenheim S, Schneppenheim R. (2013) Phenotypic and genotypic characterization of 10 Finnish patients with von Willebrand disease type 3: discovery of two main mutations. *Haemophilia*, 19: e344-348.
122. Mohl A, Marschalek R, Masszi T, Nagy E, Obser T, Oyen F, Sallai K, Bodo I, Schneppenheim R. (2008) An Alu-mediated novel large deletion is the most frequent cause of type 3 von Willebrand disease in Hungary. *J Thromb Haemost*, 6: 1729-1735.
123. Bowman M, Tuttle A, Notley C, Brown C, Tinlin S, Deforest M, Leggo J, Blanchette VS, Lillicrap D, James P, Assoc Hemophilia Clinic D. (2013) The genetics of Canadian type 3 von Willebrand disease: further evidence for co-dominant inheritance of mutant alleles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11: 512-520.
124. Mancuso DJ, Tuley EA, Castillo R, de Bosch N, Mannucci PM, Sadler JE. (1994) Characterization of partial gene deletions in type III von Willebrand disease with alloantibody inhibitors. *Thromb Haemost*, 72: 180-185.
125. Othman M, Kaur H, Favaloro EJ, Lillicrap D, Di Paola J, Harrison P, Gresele P, Subcommittees on von Willebrand D, Platelet P. (2016) Platelet type von Willebrand disease and registry report: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*, 14: 411-414.
126. Bury L, Malara A, Momi S, Petito E, Balduini A, Gresele P. (2019) Mechanisms of thrombocytopenia in platelet-type Von Willebrand Disease. *Haematologica*.
127. Giannini S, Cecchetti L, Mezzasoma AM, Gresele P. (2010) Diagnosis of platelet-type von Willebrand disease by flow cytometry. *Haematologica*, 95: 1021-1024.



128. Michiels JJ, Budde U, van der Planken M, van Vliet HH, Schroyens W, Berneman Z. (2001) Acquired von Willebrand syndromes: clinical features, aetiology, pathophysiology, classification and management. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14: 401-436.
129. Heilmann C, Trummer G, Beyersdorf F, Brehm K, Berchtold-Herz M, Schelling J, Geisen U, Zieger B. (2017) Acquired Von Willebrand syndrome in patients on long-term support with HeartMate II. *Eur J Cardiothorac Surg*, 51: 587-590.
130. Nubret K, Mauriat P, Roubertie F, James C, Tafer N, Ouattara A. (2013) Acquired von Willebrand disease in a child with a ventricular assist device. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 146: e30-32.
131. Taveras Alam S, Alexis K, Sridharan A, Strakhan M, Elrafei T, Gralla RJ, Reed LJ. (2014) Acquired Von Willebrand's Syndrome in Systemic Lupus Erythematosus. *Case Rep Hematol*, 2014: 208597.
132. Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T, Six I, Fabre O, Juthier F, Bauters A, Decoene C, Goudemand J, Prat A, Jude B. (2003) Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *New England Journal of Medicine*, 349: 343-349.
133. Alattar ML, Ciccone M, Gaballa MR, Vitale C, Badoux XC, Manoukian G, Keating MJ, Kroll MH, Ferrajoli A. (2015) Bleeding diathesis associated with acquired von Willebrand Syndrome in three patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 56: 3452-3454.
134. Heilmann C, Geisen U, Beyersdorf F, Nakamura L, Trummer G, Berchtold-Herz M, Schlensak C, Zieger B. (2011) Acquired Von Willebrand syndrome is an early-onset problem in ventricular assist device patients. *Eur J Cardiothorac Surg*, 40: 1328-1333; discussion 1233.
135. Meyer AL, Malehsa D, Budde U, Bara C, Haverich A, Strueber M. (2014) Acquired von Willebrand syndrome in patients with a centrifugal or axial continuous flow left ventricular assist device. *JACC Heart Fail*, 2: 141-145.
136. Qamar H, Lee A, Valentine K, Skeith L, Jimenez-Zepeda VH. (2017) Acquired von Willebrand Syndrome Associated to Secondary IgM MGUS Emerging after Autologous Stem Cell Transplantation for AL Amyloidosis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 9: e2017034.

137. Sadler JE. (2003) Aortic stenosis, von Willebrand factor, and bleeding. *N Engl J Med*, 349: 323-325.
138. Wolfe Z, Lash B. (2017) Acquired von Willebrand Syndrome in IgM Monoclonal Gammopathy as the Presentation of Lymphoplasmacytic Lymphoma. *Case Rep Hematol*, 2017: 9862620.
139. Franchini M, Lippi G. (2007) Acquired von Willebrand syndrome: an update. *Am J Hematol*, 82: 368-375.
140. Mital A. (2016) Acquired von Willebrand Syndrome. *Adv Clin Exp Med*, 25: 1337-1344.
141. Flood VH, Friedman KD, Gill JC, Haberichter SL, Christopherson PA, Branchford BR, Hoffmann RG, Abshire TC, Dunn AL, Di Paola JA, Hoots WK, Brown DL, Leissing C, Lusher JM, Ragni MV, Shapiro AD, Montgomery RR. (2013) No increase in bleeding identified in type 1 VWD subjects with D1472H sequence variation. *Blood*, 121: 3742-3744.
142. de Wee EM, Knol HM, Mauser-Bunschoten EP, van der Bom JG, Eikenboom JCJ, Fijnvandraat K, de Goede-Bolder A, Laros-van Gorkom B, Ypma PF, Zweegman S, Meijer K, Leebeek FWG, Wi NSG. (2011) Gynaecological and obstetric bleeding in moderate and severe von Willebrand disease. *Thrombosis and Haemostasis*, 106: 885-892.
143. Castaman G, Linari S. (2017) Diagnosis and Treatment of von Willebrand Disease and Rare Bleeding Disorders. *J Clin Med*, 6.
144. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G, Goodeve A, Federici AB, Battle J, Meyer D, Fressinaud E, Mazurier C, Goudemand J, Eikenboom J, Schneppenheim R, Budde U, Ingerslev J, Vorlova Z, Habart D, Holmberg L, Lethagen S, Pasi J, Hill F, Peake I. (2006) A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J Thromb Haemost*, 4: 766-773.
145. Xu Y, Deforest M, Grabell J, Hopman W, James P. (2017) Relative contributions of bleeding scores and iron status on health-related quality of life in von Willebrand disease: a cross-sectional study. *Haemophilia*, 23: 115-121.
146. Ziv O, Ragni MV. (2004) Bleeding manifestations in males with von Willebrand disease. *Haemophilia*, 10: 162-168.

147. Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E, Bochkov N, Boulyjenkov V, Ginsburg D, Meyer D, Peake I, Rodeghiero F, Srivastava A. (2000) Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost*, 84: 160-174.
148. Francesco Rodeghiero GC, Enrico Dini. (1987) Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease\_Blood-1987-Rodeghiero-454-9.pdf>. *Blood*, 69: 6.
149. Werner EJ, Broxson EH, Tucker EL, Giroux DS, Shults J, Abshire TC. (1993) Prevalence of von Willebrand disease in children: a multiethnic study. *J Pediatr*, 123: 893-898.
150. Hambleton J. (2001) Diagnosis and incidence of inherited von Willebrand disease. *Curr Opin Hematol*, 8: 306-311.
151. Duncan E, Rodgers S. (2017) One-Stage Factor VIII Assays. *Methods Mol Biol*, 1646: 247-263.
152. Duncan EM, Rodgers SE, McRae SJ. (2013) Diagnostic testing for mild hemophilia a in patients with discrepant one-stage, two-stage, and chromogenic factor VIII:C assays. *Semin Thromb Hemost*, 39: 272-282.
153. Makris M, Peyvandi F. (2014) Assaying FVIII activity: one method is not enough, and never was. *Haemophilia*, 20: 301-303.
154. Favaloro EJ, Mohammed S, Koutts J. (2009) Identification and prevalence of von Willebrand disease type 2N (Normandy) in Australia. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 20: 706-714.
155. Favaloro EJ, Aboud M, Arthur C. (2001) Possibility of potential VWD misdiagnosis or misclassification using LIA technology and due to presence of rheumatoid factor. *Am J Hematol*, 66: 53-56.
156. Favaloro EJ, Bonar RA, Meiring M, Duncan E, Mohammed S, Sioufi J, Marsden K. (2014) Evaluating errors in the laboratory identification of von Willebrand disease in the real world. *Thromb Res*, 134: 393-403.
157. Favaloro EJ, Mohammed S, Patzke J. (2017) Laboratory Testing for von Willebrand Factor Antigen (VWF:Ag). *Methods Mol Biol*, 1646: 403-416.
158. Favaloro EJ, Mohammed S. (2016) Evaluation of a von Willebrand factor three test panel and chemiluminescent-based assay system for identification of, and therapy monitoring in, von Willebrand disease. *Thromb Res*, 141: 202-211.

159. Cabrera N, Moret A, Caunedo P, Cid AR, Vila V, Espana F, Aznar JA. (2013) Comparison of a new chemiluminescent immunoassay for von Willebrand factor activity with the ristocetin cofactor-induced platelet agglutination method. *Haemophilia*, 19: 920-925.
160. Verfaillie CJ, De Witte E, Devreese KM. (2013) 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*, 35: 555-565.
161. Flood VH. (2014) Perils, problems, and progress in laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost*, 40: 41-48.
162. Brown JE, Bosak JO. (1986) An ELISA test for the binding of von Willebrand antigen to collagen. *Thromb Res*, 43: 303-311.
163. Ni Y, Nesrallah J, Agnew M, Geske FJ, Favalaro EJ. (2013) Establishment and characterization of a new and stable collagen-binding assay for the assessment of von Willebrand factor activity. *Int J Lab Hematol*, 35: 170-176.
164. Flood VH, Gill JC, Christopherson PA, Bellissimo DB, Friedman KD, Haberichter SL, Lentz SR, Montgomery RR. (2012) Critical von Willebrand factor A1 domain residues influence type VI collagen binding. *J Thromb Haemost*, 10: 1417-1424.
165. Flood VH, Gill JC, Christopherson PA, Wren JS, Friedman KD, Haberichter SL, Hoffmann RG, Montgomery RR. (2012) Comparison of type I, type III and type VI collagen binding assays in diagnosis of von Willebrand disease. *J Thromb Haemost*, 10: 1425-1432.
166. Flood VH, Schlauderaff AC, Haberichter SL, Slobodianuk TL, Jacobi PM, Bellissimo DB, Christopherson PA, Friedman KD, Gill JC, Hoffmann RG, Montgomery RR, Zimmerman Program I. (2015) Crucial role for the VWF A1 domain in binding to type IV collagen. *Blood*, 125: 2297-2304.
167. Veyradier A, Trossaert M, Lefrancois A, Fressinaud E, Meyer D. (2007) von Willebrand factor collagen binding assay with a commercial kit using type III collagen in von Willebrand disease type 2. *J Thromb Haemost*, 5: 868-870.
168. Flood VH, Lederman CA, Wren JS, Christopherson PA, Friedman KD, Hoffmann RG, Montgomery RR. (2010) Absent collagen binding in a VWF A3 domain

- mutant: utility of the VWF:CB in diagnosis of VWD. *J Thromb Haemost*, 8: 1431-1433.
169. Bolton-Maggs PH, Favaloro EJ, Hillarp A, Jennings I, Kohler HP. (2012) Difficulties and pitfalls in the laboratory diagnosis of bleeding disorders. *Haemophilia*, 18 Suppl 4: 66-72.
170. Hayward CP, Moffat KA, Graf L. (2014) Technological advances in diagnostic testing for von Willebrand disease: new approaches and challenges. *Int J Lab Hematol*, 36: 334-340.
171. Bodo I, Eikenboom J, Montgomery R, Patzke J, Schneppenheim R, Di Paola J, Subcomm Von Willebrand F. (2015) Platelet-dependent von Willebrand factor activity. Nomenclature and methodology: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 13: 1345-1350.
172. Koutts J. (2006) A short history of diagnostic tests for von Willebrand disease: in memory of Barry Firkin (1930 to 2001) and Ted Zimmerman (1937 to 1988). *Semin Thromb Hemost*, 32: 445-455.
173. Rodeghiero F, Castaman G. (1987) 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*, 58: 978-981.
174. Bowyer AE, Shepherd F, Kitchen S, Makris M. (2011) A rapid, automated VWF ristocetin cofactor activity assay improves reliability in the diagnosis of Von Willebrand disease. *Thromb Res*, 127: 341-344.
175. de Maistre E, Volot F, Mourey G, Aho LS, Ternisien C, Briquel ME, Bertrand MA, Tardy B, Frotscher B, Nguyen P, Dumont L, Vandroux D, Hezard N, Trossaert M. (2014) Performance of two new automated assays for measuring von Willebrand activity: HemosIL AcuStar and Innovance. *Thromb Haemost*, 112: 825-830.
176. Federici AB, Canciani MT, Forza I, Mannucci PM, Marchese P, Ware J, Ruggeri ZM. (2004) A sensitive ristocetin co-factor activity assay with recombinant glycoprotein Ibalph $\alpha$  for the diagnosis of patients with low von Willebrand factor levels. *Haematologica*, 89: 77-85.

177. Castaman G, Hillarp A, Goodeve A. (2014) Laboratory aspects of von Willebrand disease: test repertoire and options for activity assays and genetic analysis. *Haemophilia*, 20 Suppl 4: 65-70.
178. Stufano F, Lawrie AS, La Marca S, Berbenni C, Baronciani L, Peyvandi F. (2014) A two-centre comparative evaluation of new automated assays for von Willebrand factor ristocetin cofactor activity and antigen. *Haemophilia*, 20: 147-153.
179. Zhao Y, Gu Y, Ji S, Yang J, Yu Z, Ruan C. (2012) 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*, 88: 439-445.
180. Favaloro EJ, Mohammed S. (2014) Towards improved diagnosis of von Willebrand disease: comparative evaluations of several automated von Willebrand factor antigen and activity assays. *Thromb Res*, 134: 1292-1300.
181. Geisen U, Zieger B, Nakamura L, Weis A, Heinz J, Michiels JJ, Heilmann C. (2014) Comparison of Von Willebrand factor (VWF) activity VWF:Ac with VWF ristocetin cofactor activity VWF:RCo. *Thromb Res*, 134: 246-250.
182. Graf L, Moffat KA, Carlino SA, Chan AK, Iorio A, Giulivi A, Hayward CP. (2014) Evaluation of an automated method for measuring von Willebrand factor activity in clinical samples without ristocetin. *Int J Lab Hematol*, 36: 341-351.
183. Szederjesi A, Baronciani L, Budde U, Castaman G, Lawrie AS, Liu Y, Montgomery R, Peyvandi F, Schneppenheim R, Varkonyi A, Patzke J, Bodo I. (2018) An international collaborative study to compare different von Willebrand factor glycoprotein Ib binding activity assays: the COMPASS-VWF study. *J Thromb Haemost*. 16: 1604-1613
184. Patzke J, Favaloro EJ. (2017) Laboratory Testing for von Willebrand Factor Activity by Glycoprotein Ib Binding Assays (VWF:GPIb). *Methods Mol Biol*, 1646: 453-460.
185. Patzke J, Schneppenheim R. (2010) Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *Hamostaseologie*, 30: 203-206.
186. De Vleeschauwer A, Devreese K. (2006) 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*, 17: 353-358.
187. Favalaro EJ, Henniker A, Facey D, Hertzberg M. (2000) Discrimination of von Willebrand's disease (VWD) subtypes: direct comparison of von Willebrand factor:collagen binding assay (VWF:CBA) with monoclonal antibody (MAB) based VWF-capture systems. *Thromb Haemost*, 84: 541-547.
  188. Murdock PJ, Woodhams BJ, Matthews KB, Pasi KJ, Goodall AH. (1997) 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*, 78: 1272-1277.
  189. Sucker C, Senft B, Scharf RE, Zotz RB. (2006) Determination of von Willebrand factor activity: evaluation of the HaemosIL assay in comparison with established procedures. *Clin Appl Thromb Hemost*, 12: 305-310.
  190. Lopez-Castaneda S, Valencia-Hernandez I, Arean C, Godinez-Hernandez D, Viveros-Sandoval ME. (2018) Von Willebrand Factor: Multimeric Structure and Functional Activity in Patients With Atrial Fibrillation With and Without Oral Anticoagulation. *Clin Appl Thromb Hemost*, 24: 647-654.
  191. Oliver S, Lau KKE, Chapman K, Favalaro EJ. (2017) Laboratory Testing for Von Willebrand Factor Multimers. *Methods Mol Biol*, 1646: 495-511.
  192. Pasotti F, Martini G, Caimi L, Ricotta D. (2013) von Willebrand Factor multimers profiling with a semi-automated system. *Electrophoresis*, 34: 818-824.
  193. Pruthi RK, Daniels TM, Heit JA, Chen D, Owen WG, Nichols WL. (2010) Plasma von Willebrand factor multimer quantitative analysis by in-gel immunostaining and infrared fluorescent imaging. *Thromb Res*, 126: 543-549.
  194. Udvardy ML, Szekeres-Csiki K, Harsfalvi J. (2009) Novel evaluation method for densitometric curves of von Willebrand factor multimers and a new parameter (M(MW)) to describe the degree of multimerisation. *Thromb Haemost*, 102: 412-417.
  195. Crist RA, Heikal NM, Rodgers GM, Grenache DG, Smock KJ. (2018) Evaluation of a new commercial method for von Willebrand factor multimeric analysis. *Int J Lab Hematol*.

196. Favaloro EJ, Oliver S. (2017) Evaluation of a new commercial von Willebrand factor multimer assay. *Haemophilia*, 23: e373-e377.
197. Budde U, Schneppenheim R, Eikenboom J, Goodeve A, Will K, Drewke E, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J, Perez A, Meyer D, Mazurier C, Goudemand J, Ingerslev J, Habart D, Vorlova Z, Holmberg L, Lethagen S, Pasi J, Hill F, Peake I. (2008) Detailed von Willebrand factor multimer analysis in patients with von Willebrand disease in the European study, molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 von Willebrand disease (MCMDM-1VWD). *J Thromb Haemost*, 6: 762-771.
198. Fuchs B, de Witt S, Solecka BA, Kroning M, Obser T, Cosemans JM, Schneppenheim R, Heemskerk JW, Kannicht C. (2013) Distinct role of von Willebrand factor triplet bands in glycoprotein Ib-dependent platelet adhesion and thrombus formation under flow. *Semin Thromb Hemost*, 39: 306-314.
199. Ledford-Kraemer MR. (2010) Analysis of von Willebrand factor structure by multimer analysis. *Am J Hematol*, 85: 510-514.
200. Garam N, Malati E, Sinkovits G, Gombos T, Szederjesi A, Barabas L, Graf L, Kocsis J, Prohaszka Z. (2018) Platelet Count, ADAMTS13 Activity, von Willebrand Factor Level and Survival in Patients with Colorectal Cancer: 5-Year Follow-up Study. *Thromb Haemost*, 118: 123-131.
201. Ott HW, Griesmacher A, Schnapka-Koepf M, Golderer G, Sieberer A, Spannagl M, Scheibe B, Perkhofer S, Will K, Budde U. (2010) Analysis of von Willebrand factor multimers by simultaneous high- and low-resolution vertical SDS-agarose gel electrophoresis and Cy5-labeled antibody high-sensitivity fluorescence detection. *Am J Clin Pathol*, 133: 322-330.
202. Studt JD, Budde U, Schneppenheim R, Eisert R, von Depka Prondzinski M, Ganser A, Barthels M. (2001) Quantification and facilitated comparison of von Willebrand factor multimer patterns by densitometry. *Am J Clin Pathol*, 116: 567-574.
203. Favaloro EJ. (2011) Interaction of factor VIII and von Willebrand factor and the identification of type 2N von Willebrand disease. *Thromb Res*, 127: 2-3.



204. Veyradier A, Caron C, Ternisien C, Wolf M, Trossaert M, Fressinaud E, Goudemand J. (2011) Validation of the first commercial ELISA for type 2N von Willebrand's disease diagnosis. *Haemophilia*, 17: 944-951.
205. Haberichter SL, Castaman G, Budde U, Peake I, Goodeve A, Rodeghiero F, Federici AB, Battle J, Meyer D, Mazurier C, Goudemand J, Eikenboom J, Schneppenheim R, Ingerslev J, Vorlova Z, Habart D, Holmberg L, Lethagen S, Pasi J, Hill FG, Montgomery RR. (2008) 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*, 111: 4979-4985.
206. Nossent AY, V VANM, NH VANT, Rosendaal FR, Bertina RM, JA VANM, Eikenboom HC. (2006) von Willebrand factor and its propeptide: the influence of secretion and clearance on protein levels and the risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost*, 4: 2556-2562.
207. Haberichter SL. (2015) von Willebrand factor propeptide: biology and clinical utility. *Blood*, 126: 1753-1761.
208. Breugelmans J, Vertessen F, Mertens G, Gadisseur A, Van der Planken M. (2008) Multiplate whole blood impedance aggregometry: a recent experience. *Thromb Haemost*, 100: 725-726.
209. Peerschke EI, Castellone DD, Stroobants AK, Francis J. (2014) Reference range determination for whole-blood platelet aggregation using the Multiplate analyzer. *Am J Clin Pathol*, 142: 647-656.
210. Rubak P, Villadsen K, Hvas AM. (2012) Reference intervals for platelet aggregation assessed by multiple electrode platelet aggregometry. *Thromb Res*, 130: 420-423.
211. Schmidt DE, Bruzelius M, Majeed A, Odeberg J, Holmstrom M, Agren A. (2017) Whole blood ristocetin-activated platelet impedance aggregometry (Multiplate) for the rapid detection of Von Willebrand disease. *Thromb Haemost*, 117: 1528-1533.
212. Mohri H, Motomura S, Kanamori H, Matsuzaki M, Watanabe S, Maruta A, Kodama F, Okubo T. (1998) Clinical significance of inhibitors in acquired von Willebrand syndrome. *Blood*, 91: 3623-3629.

213. Rauch A, Caron C, Vincent F, Jeanpierre E, Ternisien C, Boisseau P, Zawadzki C, Fressinaud E, Borel-Derlon A, Hermoire S, Paris C, Lavenu-Bombled C, Veyradier A, Ung A, Vincentelli A, van Belle E, Lenting PJ, Goudemand J, Susen S. (2016) A novel ELISA-based diagnosis of acquired von Willebrand disease with increased VWF proteolysis. *Thromb Haemost*, 115: 950-959.
214. Siaka C, Rugeri L, Caron C, Goudemand J. (2003) A new ELISA assay for diagnosis of acquired von Willebrand syndrome. *Haemophilia*, 9: 303-308.
215. Tiede A, Priesack J, Werwitzke S, Bohlmann K, Oortwijn B, Lenting P, Eisert R, Ganser A, Budde U. (2008) Diagnostic workup of patients with acquired von Willebrand syndrome: a retrospective single-centre cohort study. *J Thromb Haemost*, 6: 569-576.
216. Tiede A, Rand JH, Budde U, Ganser A, Federici AB. (2011) How I treat the acquired von Willebrand syndrome. *Blood*, 117: 6777-6785.
217. Dean JA, Blanchette VS, Carcao MD, Stain AM, Sparling CR, Siekmann J, Turecek PL, Lillicrap D, Rand ML. (2000) von Willebrand disease in a pediatric-based population--comparison of type 1 diagnostic criteria and use of the PFA-100 and a von Willebrand factor/collagen-binding assay. *Thromb Haemost*, 84: 401-409.
218. Kerenyi A, Schlamadinger A, Ajzner E, Szegedi I, Kiss C, Pap Z, Boda Z, Muszbek L. (1999) Comparison of PFA-100 closure time and template bleeding time of patients with inherited disorders causing defective platelet function. *Thromb Res*, 96: 487-492.
219. Quiroga T, Goycoolea M, Munoz B, Morales M, Aranda E, Panes O, Pereira J, Mezzano D. (2004) Template bleeding time and PFA-100 have low sensitivity to screen patients with hereditary mucocutaneous hemorrhages: comparative study in 148 patients. *J Thromb Haemost*, 2: 892-898.
220. Budde U, Drewke E, Mainusch K, Schneppenheim R. (2002) Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost*, 28: 173-190.
221. Favaloro EJ. (2017) Diagnosis or Exclusion of von Willebrand Disease Using Laboratory Testing. *Methods Mol Biol*, 1646: 391-402.

222. Favaloro EJ, Bodo I, Israels SJ, Brown SA. (2014) von Willebrand disease and platelet disorders. *Haemophilia*, 20 Suppl 4: 59-64.
223. Favaloro EJ, Bonar R, Favaloro J, Koutts J. (2011) Diagnosis and management of von Willebrand disease in Australia. *Semin Thromb Hemost*, 37: 542-554.
224. Favaloro EJ, Koutts J. (1997) Laboratory assays for von Willebrand factor: relative contribution to the diagnosis of von Willebrand's disease. *Pathology*, 29: 385-391.
225. Gadisseur A, Hermans C, Berneman Z, Schroyens W, Deckmyn H, Michiels JJ. (2009) Laboratory diagnosis and molecular classification of von Willebrand disease. *Acta Haematol*, 121: 71-84.
226. Roberts JC, Flood VH. (2015) Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol*, 37 Suppl 1: 11-17.
227. Veyradier A, Fressinaud E, Meyer D. (1998) Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *Int J Clin Lab Res*, 28: 201-210.
228. Goubran HA, Stakiw J, Radosevic M, Burnouf T. (2014) Platelet-cancer interactions. *Semin Thromb Hemost*, 40: 296-305.
229. Jurasz P, Alonso-Escolano D, Radomski MW. (2004) Platelet--cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. *Br J Pharmacol*, 143: 819-826.
230. Bauer AT, Suckau J, Frank K, Desch A, Goertz L, Wagner AH, Hecker M, Goerge T, Umansky L, Beckhove P, Utikal J, Gorzelanny C, Diaz-Valdes N, Umansky V, Schneider SW. (2015) von Willebrand factor fibers promote cancer-associated platelet aggregation in malignant melanoma of mice and humans. *Blood*, 125: 3153-3163.
231. Donnellan E, Kevane B, Bird BR, Ainle FN. (2014) Cancer and venous thromboembolic disease: from molecular mechanisms to clinical management. *Curr Oncol*, 21: 134-143.
232. Goubran HA, Kotb RR, Stakiw J, Emara ME, Burnouf T. (2014) Regulation of tumor growth and metastasis: the role of tumor microenvironment. *Cancer Growth Metastasis*, 7: 9-18.

233. Lawrie AS, Stufano F, Canciani MT, Mackie IJ, Machin SJ, Peyvandi F. (2013) A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity. *Haemophilia*, 19: 338-342.
234. Patzke J, Budde U, Huber A, Mendez A, Muth H, Obser T, Peerschke E, Wilkens M, Schneppenheim R. (2014) Performance evaluation and multicentre study of a von Willebrand factor activity assay based on GPIb binding in the absence of ristocetin. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 25: 860-870.
235. Salem RO, Van Cott EM. (2007) A new automated screening assay for the diagnosis of von Willebrand disease. *Am J Clin Pathol*, 127: 730-735.
236. Trossaert M, Ternisien C, Lefrancois A, Llopis L, Goudemand J, Sigaud M, Fouassier M, Caron C. (2011) Evaluation of an automated von Willebrand factor activity assay in von Willebrand disease. *Clin Appl Thromb Hemost*, 17: E25-29.
237. Favaloro EJ, Mohammed S, McDonald J. (2010) Validation of improved performance characteristics for the automated von Willebrand factor ristocetin cofactor activity assay. *J Thromb Haemost*, 8: 2842-2844.
238. Timm A, Hillarp A, Philips M, Goetze JP. (2015) Comparison of automated von Willebrand factor activity assays. *Thromb Res*, 135: 684-691.
239. Flood VH, Friedman KD, Gill JC, Morateck PA, Wren JS, Scott JP, Montgomery RR. (2009) Limitations of the ristocetin cofactor assay in measurement of von Willebrand factor function. *J Thromb Haemost*, 7: 1832-1839.
240. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ, Jr., Montgomery RR. (1987) The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood*, 69: 1691-1695.
241. Flood VH, Gill JC, Morateck PA, Christopherson PA, Friedman KD, Haberichter SL, Hoffmann RG, Montgomery RR. (2011) Gain-of-function GPIb ELISA assay for VWF activity in the Zimmerman Program for the Molecular and Clinical Biology of VWD. *Blood*, 117: e67-74.
242. Stufano F, Baronciani L, Pagliari MT, Franchi F, Cozzi G, Garcia Oya I, Peyvandi F. (2014) Diagnosis of type 2B von Willebrand disease (VWD) using an alternative assay to ristocetin induced platelet agglutination (RIPA). *Thromb Res*, 134: OC-156.

243. Stufano F, Baronciani L, Pagliari MT, Franchi F, Cozzi G, Garcia-Oya I, Bucciarelli P, Boscarino M, Peyvandi F. (2015) Evaluation of an heterogeneous group of patients with von Willebrand disease using an assay alternative to ristocetin induced platelet agglutination. *J Thromb Haemost*, 13: 1806-1814.
244. Lechner K, Obermeier HL. (2012) Cancer-related microangiopathic hemolytic anemia: clinical and laboratory features in 168 reported cases. *Medicine (Baltimore)*, 91: 195-205.
245. Luo GP, Ni B, Yang X, Wu YZ. (2012) von Willebrand factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. *Acta Haematol*, 128: 158-169.
246. Wang WS, Lin JK, Lin TC, Chiou TJ, Liu JH, Yen CC, Chen PM. (2005) Plasma von Willebrand factor level as a prognostic indicator of patients with metastatic colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol*, 11: 2166-2170.

## 11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 11.1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

**Szederjesi A**, Baronciani L, Budde U, Castaman G, Lawrie AS, Liu Y, Montgomery R, Peyvandi F, Schneppenheim R, Varkonyi A, Patzke J, Bodo I. (2018) An international collaborative study to compare different von Willebrand factor glycoprotein Ib binding activity assays: the COMPASS-VWF study. *J Thromb Haemost.* 16: 1604-1613

Impakt Faktor: 4,899 (2017)

Garam N, Malati E, Sinkovits G, Gombos T, **Szederjesi A**, Barabas L, Graf L, Kocsis J, Prohaszka Z. (2018) Platelet Count, ADAMTS13 Activity, von Willebrand Factor Level and Survival in Patients with Colorectal Cancer: 5-Year Follow-up Study. *Thromb Haemost.* 118: 123-131.

Impakt Faktor: 4,952 (2017)

### 11.2. Disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

van den Besselaar AMHP, Chantarangkul V, Angeloni F, Binder NB, Byrne M, Dauer R, Gudmundsdottir BR, Jespersen J, Kitchen S, Legnani C, Lindahl TL, Manning RA, Martinuzzo M, Panes O, Pengo V, Riddell A, Subramanian S, **Szederjesi A**, Tantanate C, Herbel P, Tripodi A (2018) International collaborative study for the calibration of proposed International Standards for thromboplastin, rabbit, plain, and for thromboplastin, recombinant, human, plain. *J Thromb Haemost.* 16(1):142-149

Impakt Faktor: 4,899 (2017)

Kállay K, Kassa C, Réti M, Karászi É, Sinkó J, Goda V, Stréhn A, Csordás K, Horváth O, **Szederjesi A**, Tasnády S, Hardi A, Kriván G (2018) Early Experience With CliniMACS Prodigy CCS (IFN-gamma) System in Selection of Virus-specific T Cells From Third-party Donors for Pediatric Patients With Severe Viral Infections After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Immunother.* 41(3):158-163

Impakt Faktor: 3,826 (2017)

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként témavezetőmnek és lassan 10 éve főnökömnek, Dr. habil Bodó Imre egyetemi docens úrnak szeretném megköszönni a rengeteg segítséget, amit nyújtott végig nemcsak a disszertáció megírásának idején, hanem a teljes alvadási munkásságom alatt, és amiért megszerettette velem a ritka vagy nem is olyan ritka vérzékenységek laboratóriumi diagnosztikáját.

Köszönettel tartozom Dr. Jakab Judit főorvos asszonynak is, akit mentoromnak tekintek, és aki a munkába állásom legelső nagy lépésnél (majd a másodiknál is) mellettem állt, segítségemre volt, és bármikor képes volt a leghisztérikusabb leveleimre is megnyugtatóan válaszolni.

Hálás vagyok eddigi kollégáimnak és a laborok folyamatosan változó személyzetének is.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak, akik végig támogattak a munkában, az azzal együtt járó nehézségekben és tolerálták a távolléteimet.