

A von Willebrand alvadási faktor analízise

Doktori tézis

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

1. BEVEZETÉS

A von Willebrand betegség (VWB) a leggyakoribb öröklött vérzékenység a humán populációban. A betegséget az endothel sejtek és a megakaryocyták által termelt von Willebrand faktor (VWF) mennyiségének és/vagy működésének a zavara okozza. 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. E laboratóriumi tesztek a közelmúltban jelentős fejlődésen mentek át, számos új teszt jelent meg, melyek egymáshoz való viszonya egyelőre tisztázatlan. Végül fontos megjegyezni, hogy a VWF aktivitás és struktúra vizsgálata nem csak a vérzékenység, hanem más betegségek, pl. daganatos betegségek prognózisának megítélésében is növekvő szerepet kezd kapni.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Dolgozatunk elsődleges célkitűzése a von Willebrand faktor minél teljesebb megismerése, laboratóriumi diagnosztika elemeinek/működésüknek javítása és fejlesztése, valamint ezen elemek felhasználása a legszélesebb körben. Törekvésünk két fontos lépése a VWF aktivitások nagy mintaszámú vizsgálata, az eredmények statisztikai értékelése és értelmezése, valamint a faktor multimer analízisének használata a von Willebrand betegségen kívül is.

2.1. A von Willebrand faktor thrombocytakötő aktivitásának vizsgálata (COMPASS-VWF Study)

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 szenzitivitás, precízió és korreláció. 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.

2.2. 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 thrombocytaszámát, VWF:Ag szintjét és ADAMTS-13 aktivitását, a von Willebrand faktor UL-VWFM jelenlétét/hiányát, illetve ezen markerek egymásra hatását, prothrombotikus effektivitását 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 dolgozatunkban a kutatásnak erre a részére koncentrálnak.

3. MÓDSZEREK

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

95 mintát vontunk be vizsgálatunkba (52 normál donor és 43 VWB minta). 8 nemzetközi centrum laboratóriumában (Anglia, Németország 3, Olaszország 2, USA, Magyarország) végezték a méréseket a különböző aktivitási tesztekkel, eltérő platformokon. Az elvégzett tesztek eredményeit összesítettük és statisztikailag értékeltük. A tesztek a következők voltak:

VWF:RCo: BC Von Willebrand Reagent (Siemens), Laboratórium 1-6.

VWF:GPIbR: IL HemosIL[®] Von Willebrand Factor Ristocetin Cofactor Activity (Instrumentation Laboratory, Bedford, USA), Laboratórium 1, 2, 3 és 5; és IL HemosIL[®] AcuStar Von Willebrand Factor Ristocetin Cofactor Activity, Laboratórium 1, 2, 3 és 5.

VWF:GPIbM tesztek: INNOVANCE[®] VWF Ac (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany), Laboratórium 1-4; és in house ELISA metodika, Laboratórium 6.

VWF:Ab tesztek: IL, HemosIL[®] von Willebrand Factor Activity, Laboratórium 1, 2 és 5.

3.2. A multimer analízis hasznosítása - CRC betegekben

232 vastagbél carcinomás (CRC) beteg került bevonásra a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinikáján, melyből 55-nek (a magas VWF/alacsony ADAMTS-13, illetve alacsony VWF/magas ADAMTS-13 csoportba osztva a korreláltathatóság miatt) végeztünk multimer analízist. Kezelésük megkezdése és közben kerültek a vérminták levételre és fagyasztásra a mérésekig.

3.2.1. Laboratóriumi vizsgálatok és statisztikai analízis

A laboratórium ADAMTS-13 aktivitás meghatározást végzet FRETs-VWF73 segítségével melyhez a kalibrációs görbeként standard humán plazma és normál véradó donorok mintáiból hígított mintája szolgált.

A VWF:Ag szint mérése EDTAs mintából történt ELISA módszerrel, többszörös antitestes jelöléssel WHO VWF:Ag standard ellen kalibrálva. A vérkép és tumormarkerek mérése rutin diagnosztikai mérésekkel készült. A statisztikai tesztek értékelése és demonstrálása ebben az esetben is megtörtént.

A multimer analízis és denzitometriás elemzés a laboratóriumban használatos protokoll szerint készült. 1,2^{w/v} %-os SDS-agaróz gélen normál poolozott plazma kontroll mellett, overnight futtatuk a mintákat. Western-blott és kétszeres antitestes jelöléssel, kemilumineszcenz előhívás után géldokumentációs rendszerben (AlphaInnotech) leolvastuk a denzitometriás görbéket majd a tripleteket számolva vizsgáltuk a szokatlanul nagy molekulású multimerek jelenlétét és mennyiségét.

4. EREDMÉNYEK

4.1. COMPASS-VWF study

Az 5 összehasonlított tesztből, az VWF:Ab (IL) és VWF:GPIbM (Innovance[®] Act.) szignifikánsan magasabb, az in-house ELISA metodika pedig alacsonyabb értéket adott, azaz az azonosságot képviselő egyenes kiesett a 95%-os konfidencia intervallumból.

Noha a számadatok szignifikáns eltérést adnak, ezeknek klinikai következményük nincs.

Annak megítélésére, hogy a kapott kis vizsgálati különbségek egy 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 minden laborban, ebben az összehasonlításban viszont a VWF:RCo aktivitásnál találtuk a legnagyobb kilengést, azonban ezek a differenciák itt sem bizonyultak klinikailag relevánsnak.

2 résztvevő laboratórium (Laboratórium 1-4) a VWF:RCo és VWF:GPIbM (Innovance Act) teszteket dupla kalibrálással is elvégezte az összes mintán, a rutinban, a tesztekhez használt Siemens Standard Human Plasmával, valamint az SSC Calibrator Plasmával. Az eredmények szinte tökéletesen megegyeznek.

A mérési eredményekből számolt LLOD értékek, valamint a gyártó által javasolt érték közel azonosak teszteként. Bizonyos modifikációknak köszönhetően azonban több laboratórium a gyártótól alacsonyabb értékekkel dolgozik (10 IU/dL gyári érték vs 4 IU/dL módosított protokollal).

A legjobb szenzitivitása az in-house ELISA, illetve az AcuStar VWF:GPIbR tesztnak volt (0-0,5 IU/dL).

A vizsgált új tesztek többsége a VWF:RCo által mutatottaktól nagyobb teljesítményt mutatott (12-16 CV%). Amint az várható volt, az alacsony tartományban (azaz a VWB mintákban) a variabilitás nagyobb volt, mint a normál mintáknál (13-26 CV%).

A normál minták eredményeiből számolt, külön-külön tesztekre vonatkoztatott referencia tartományok között szignifikáns eltérést nem találtunk.

Az egyéni mintákat megvizsgálva az alábbi eltéréseket találtuk:

- Az összes ELISA alapú metodika fals magas eredményt adott 2B altípusú betegeknél.
- p.V1665E mutációra a VWF:Ab tesztek adtak magasabb értékeket
- Hibásan alacsony VWF aktivitás a ristocetint használó tesztnél p.P1467S mutációk esetén (kivéve az AcuStar VWF:GPIbR)
- Fals értékek homozigóta p.C2362F esetén, illetve 1 Vicenza betegnél a hétből, a VWF:GPIbR (HemosIL) teszttel

4.2. UL-VWFM analízise CRC betegekben

A mintákat két csoportban mértük, 1. csoport: n=28 minta a legmagasabb VWF:Ag szinttel (1604 ng/ml) és legalacsonyabb ADAMTS-13 aktivitással (52%), 2. csoport: n=27 a legalacsonyabb VWF:Ag szinttel (183 ng/ml), és legmagasabb ADAMTS-13 aktivitással (97%). 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 ($p<0,01$).

5. 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), mely e 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).
- Precizitásban 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 mutációt normálra méri, minden más ristocetint alkalmazó teszt fals alacsony eredményt ad ebben az esetben
- Bemutattuk, hogy az általunk végzett VWF multimer analízis nem csak a VWB tipizálására

használható, hanem daganatos betegek prognózisának megítélésében is fontos lehet

- 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, ami a prognózissal is korrelált

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

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)

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)