

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**RITKA HEMOSZTÁZIS KÓRKÉPEK KLINIKAI ÉS
LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATA; ÚJ DIAGNOSZTIKAI
SZEMPONTOK HEMOSZTÁZIS RENDELLENESSÉGEKBE**



DR. BERCZKY ZSUZSANNA

**DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
LABORATÓRIUMI MEDICINA INTÉZET
KLINIKAI LABORATÓRIUMI KUTATÓ TANSZÉK**

DEBRECEN, 2025

TARTALOMJEGYZÉK

1	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
2	BEVEZETÉS.....	10
2.1	A hemosztázis modern koncepciója, pro-és antikoaguláns tényezői	11
2.2	A ritka betegségek definíciója, vizsgálatuk korlátai, tanulmányozásuk lehetőségei.....	13
2.2.1	A ritka, veleszületett vérzékenységek	14
2.2.2	A ritka veleszületett thrombophiliák.....	18
3	CÉLKITŰZÉSEK.....	23
3.1	Vérzékenységek.....	23
3.2	Thrombophiliák.....	23
4	BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	24
4.1	Vizsgálatok haemorrhagias diathesisekben	24
4.1.1	Betegek.....	24
4.1.2	Laboratóriumi vizsgálatok	25
4.2	Vizsgálatok ritka thrombophiliákban.....	28
4.2.1	Betegek.....	28
4.2.2	A ritka thrombophiliák laboratóriumi vizsgálata.....	31
5	EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS.....	38
5.1	Vizsgálatok haemorrhagias diathesisekben	38
5.1.1	XIII-as faktor deficiencia	38
5.1.2	V-ös faktor deficiencia.....	39
5.1.3	X-es faktor deficiencia	40
5.1.4	Hereditaer haemorrhagias teleangiectasia	41
5.1.5	Differenciáldiagnosztika haemorrhagias diathesisekben.....	43
5.2	Vizsgálatok ritka thrombophiliákban.....	45
5.2.1	Az antitrombin deficiencia előfordulása Magyarországon, a p.Leu131Phe (AT Budapest 3) variáns magas gyakorisága; klinikai jellegzetességei	45
5.2.2	Az antitrombin deficiencia laboratóriumi diagnosztikájára szolgáló funkcionális tesztek, elsősorban a hc-anti-FXa és p-anti-FXa tesztek evaluációja	48
5.2.3	Az Antitrombin Budapest 3 mutáció alapító hatása.....	50
5.2.4	A különböző IIHBS antitrombin deficienciák heparin-kötésének vizsgálata, a különbségek felderítése biokémiai és in silico módszerekkel	50

5.2.5	Az Antitrombin Debrecen klinikai, laboratóriumi és biokémiai karakterizálása.....	52
5.2.6	A kilenc új, antitrombin mutáció in vitro vizsgálata	53
5.2.7	Vizsgálatok protein C deficienciában.....	54
6	ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK RITKA HEMOSZTÁZIS RENDELLENESSÉGEKBEN.....	56
6.1	Vérzékenység.....	56
6.1.1	XIII-as faktor deficiencia	56
6.1.2	V-ös faktor deficiencia.....	56
6.1.3	X-es faktor deficiencia	56
6.1.4	Hereditaer haemorrhagias teleangiectasia (Osler-Weber-Rendu kór)	57
6.1.5	Differenciáldiagnosztikai problémák megoldása veleszületett vérzékenységekben komplex speciális hemosztazeológiai vizsgálatokkal.	57
6.2	Thrombophilia	57
6.2.1	Antitrombin deficiencia.....	57
6.2.2	Protein C deficiencia.....	59
7	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	60
8	AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK.....	62
9	AZ ÉRTEKEZÉSBEN NEM TÁRGYALT, A PhD FOKOZAT MEGSZERZÉSE ÓTA MEGJELENT NEMZETKÖZI ÉS HAZAI KÖZLEMÉNYEK.....	65
10	CSOPORTOS (MULTICENTRIKUS) KÖZLEMÉNYBEN SZAKMAI KÖZREMŰKÖDŐ	72
11	SZERKESZTETT FELŐOKTATÁSI TANKÖNYV, SZAKKÖNYV.....	72
12	FELŐOKTATÁSI TANKÖNYV RÉSZEK	72
13	KÖNYVFEJEZET, SZAKTANULMÁNY.....	73
14	TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK.....	75

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5'LP	-	5' hossz polimorfizmus
ACMG	-	„American College of Medical Genetics” (Amerikai Orvosi Genetikai Társaság)
<i>ACVRL1</i>	-	aktív receptor-szerű kináz 1 gén (humán)
AD	-	autoszomalis domináns
ADAMTS13	-	A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin type 1 repeats, member 13 (a von Willebrand faktort hasító proteáz)
<i>ADAMTS13</i>	-	az ADAMTS13 fehérjét kódoló gén (humán)
ALK1	-	aktív receptor-szerű kináz 1
APC	-	aktivált protein C
APTI	-	aktivált parciális tromboplasztinidő
ARDS	-	acut respiratoricus distress syndroma
AT	-	antitrombin
ATBp3	-	Antitrombin Budapest 3 mutáció
ATD	-	antitrombin deficiencia
ATE	-	artériás thromboticus esemény
AVM	-	arteriovenosus malformatio
BID	-	napi kétszeri gyógyszeradagolás
BMP	-	csont morfogén fehérje
bp	-	bázispár
BSA	-	marha szérumalbumin
C4bBP	-	komplement 4b kötő fehérje
CAVM	-	cerebralis arteriovenosus malformatio
cFXIII	-	a sejtekben található (celluláris) XIII-as faktor
CIE	-	keresztezett immunoelektroforézis
CLSI	-	„Clinical and Laboratory Standards Institute” (Klinikai és Laboratóriumi Standardizációs Intézet)
CLSM	-	konfokális lézer szkennings mikroszkóp
cM	-	centiMorgan
CM-AVM1	-	capillaris malformatio- arteriovenosus malformatio syndroma
CV	-	variációs koefficiens
DAB	-	3,3'-diaminobenzidin
des-Gla APC	-	aktivált protein C, melyben nincs gamma- karboxi-glutamát domén
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSF	-	„differential scanning fluorimetry” módszer
DSSP	-	„define secondary structure of proteins” (másodlagos fehérje struktúrán alapuló in silico módszer)
ECAT	-	„External quality Control of diagnostic Assays and Tests” (nemzetközi külső minőségbiztosítási rendszer)
EGF	-	epidermális növekedési faktor
EH	-	esélyhánados
<i>ENG</i>	-	endoglin gén (humán)
EPCR	-	endoteliális protein C receptor

ER	-	endoplazmatikus retikulum
ERN	-	European Reference Network
<i>F5</i>	-	a véralvadás V-ös faktorát kódoló gén (humán)
<i>F8</i>	-	a véralvadás VIII-as faktorát kódoló gén (humán)
<i>F13A1</i>	-	a véralvadás XIII-as faktorának A alegységét kódoló gén (humán)
<i>F13B</i>	-	a véralvadás XIII-as faktorának B alegységét kódoló gén (humán)
FCS	-	fötális borjú szérum
<i>FGA</i>	-	a fibrinogén alfa láncát kódoló gén (humán)
<i>FGB</i>	-	a fibrinogén béta láncát kódoló gén (humán)
<i>FGG</i>	-	a fibrinogén gamma láncát kódoló gén (humán)
FGR	-	magzati növekedésbeli elmaradás
FIIG20210A	-	protrombin gén 20210G>A polimorfizmus
FIX	-	a véralvadás IX-es faktora
FIXa	-	a véralvadás aktív IX-es faktora
FII	-	protrombin
FIIa	-	trombin
Fng	-	fibrinogén (Clauss módszerrel mérve)
Fng Ag	-	fibrinogén antigén
FRET	-	fluoreszcencia rezonancia energia transzfer
FV	-	a véralvadás V-ös faktora
FVa	-	a véralvadás aktív V-ös faktora
FVi	-	a véralvadás inaktív V-ös faktora
FVII	-	a véralvadás VII-es faktora
FVIIa	-	a véralvadás aktív VII-es faktora
FVIII	-	a véralvadás VIII-as faktora
FVIIIa	-	a véralvadás aktív VIII-as faktora
FVL	-	Faktor V Leiden polimorfizmus
FX	-	a véralvadás X-es faktora
FXa	-	a véralvadás aktív X-es faktora
FXIII	-	a véralvadás XIII-as faktora
FXIIIa	-	a véralvadás aktivált XIII-as faktora
FXIII-A	-	a XIII-as faktor A (katalitikus) alegysége
FXIII _{A2} B ₂	-	a véralvadás XIII-as faktorának az A és B alegységekből álló heterotetramerje
FXIII-B	-	a XIII-as faktor B (gátló/hordozó) alegysége
GAMD	-	„Gaussian Accelerated Molecular Dynamics” (molekuladinamikai in silico módszer)
<i>GDF2</i>	-	a növekedési/differenciációs faktor 2-t kódoló gén (humán)
GI	-	gastrointestinalis tractus
Gla-domén-	-	gamma-karboxi-glutamát domén
GP1a-IIa	-	glikoprotein Ia-IIa vérlemezke receptor komplex
GP1b	-	glikoprotein Ib vérlemezke receptor
<i>GP1BA</i>	-	a glikoprotein Ib-t kódoló gén (humán)
GP1b-V-IX	-	glikoprotein Ib-V-IX vérlemezke receptor komplex
GP1Ib/IIIa	-	glikoprotein IIb/IIIa vérlemezke receptor komplex

GroMaCS	-	„Groningen Machine for Chemical Simulations” (in silico vizsgálatok szoftvere)
HA	-	haemophilia A
HAVM	-	hepaticus arteriovenosus malformatio
HBS	-	HEPES-BSA-Tween-20 mintahígító puffer
HC	-	heavy chain (nehéz lánc)
hc-anti-FXa	-	heparin-kofaktor-anti-FXa teszt
HEK	-	humán embrionális vese sejtvonal
HeZ	-	heterozigóta
HGMD	-	„Human Genom Mutation Database” (Humán Genom Mutációs Adatbázis)
HGVS	-	„Human Genom Variation Society” (Humán Genom Variációk Társaság)
HHT	-	hereditaer haemorrhagias teleangiectasia
HMAP	-	Háziorvosi Morbiditási Adatgyűjtés Program
HMWM	-	nagy molekulatömegű multimerek (von Willebrand faktor esetén)
HoZ	-	homozigóta
HRP	-	tormaperoxidáz
IIHBS	-	heparin-kötőhelyet érintő II-es típusú antitrombin deficiencia
IIPE	-	pleiotróp hatású II-es típusú antitrombin deficiencia
IIRS	-	reaktív helyet érintő II-es típusú antitrombin deficiencia
IQR	-	interkvartilis tartomány
ISTH	-	„International Society of Thrombosis and Hemostasis” (Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság)
ITP	-	idiopathias thrombocytopenias purpura
IUFD	-	intrauterin magzati elhalás
<i>KLKB1</i>	-	prekallikrein gén (humán)
KLKT	-	Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék
LC	-	light chain (könnyű lánc)
LD	-	„linkage disequilibrium” (kapcsoltsági kiegyensúlyozatlanság)
LDH	-	laktát dehidrogenáz
LMWH	-	alacsony molekulásúlyú heparin
LPS	-	lipopoliszacharid
M1	-	Manders féle kolokalizációs koefficiens 1
M2	-	Manders féle kolokalizációs koefficiens 2
mAbs	-	milliabszorbancia
MAF	-	minor allél frekvencia
MI	-	myocardialis infarctus
MLPA	-	multiplex ligáció függő próba amplifikáció
MRC A	-	legközelebbi közös ős
MVT	-	mélyvénás thrombosis
NET	-	neutrophil extracelluláris csapda
NGS	-	új generációs szekvenálás
NOAC	-	új típusú orális antikoaguláns
OD	-	napi egyszeri gyógyszeradagolás

OMIM	-	„Online Mendelian Inheritance in Man” (Mendeli öröklődést mutató betegségek adatbázisa)
OPLS-AA	-	„optimized potentials for liquid simulations- all atoms” (biokémiai reakciók oldatban történő in silico szimulációjának módszere)
OR	-	odds ratio, esélyhányados
PAR	-	proteáz-aktivált receptor (vérelemzke receptor)
PAR4	-	proteáz-aktivált receptor 4 (vérelemzke receptor)
p-anti-FXa	-	progresszív anti-FXa teszt
PAVM	-	pulmonalis arteriovenosus malformatio
PBS	-	foszfát-puffer sóoldat
PC	-	protein C
PCD	-	protein C deficiencia
PCI	-	protein C inhibitor
PCR	-	polimeráz láncreakció
PDB	-	„protein data bank” (fehérje adatbázis)
PE	-	tüdőembolia
PFA-100	-	thrombocyta funkció analizátor-100
pFXIII	-	a plazmában található XIII-as faktor
PGE1	-	prostaglandin E1
PGK-1	-	foszfoglicerát-kináz 1
PI	-	protrombinidő
PME	-	„Particle Mesh Ewald” (Ewald-féle Részecskehálós módszer in silico szimulációkban)
pNA	-	paranitroanilin
PPA	-	„Protein Proximity Analyser” (fehérjék közelségét elemző) szoftver
PPI	-	„protein proximity index” (fehérjék közelségét jellemező numerikus érték)
PPP	-	„platelet poor plasma” (thrombocyta szegény plazma)
<i>PROC</i>	-	a protein C-t kódoló gén (humán)
<i>PROS1</i>	-	a protein S-t kódoló gén (human)
PRP	-	„platelet rich plasma” (thrombocyta dús plazma)
PS	-	protein S
PVDF	-	polivinilidén difluorid
<i>RASA1</i>	-	RAS p21 protein aktivátor 1-et kódoló gén (humán)
RBDD	-	„Rare Bleeding Disorders Database” (Ritka Vérzékenységek adatbázis)
RCL	-	„reactive center loop” (a reaktív centrumot tartalmazó hurok, az antitrombin fehérjében)
RFL	-	„recurrent fetal loss” (rekurrens magzati halál)
RI	-	reptilázidő
RIPA	-	risztocetin-indukálta thrombocyta aggregáció
RMSD	-	„root mean square deviation” (atomok referenciától való átlagos távolságának mértéke in silico szimulációkban)

RMSF	-	„root mean square fluctuations” (az atomok referenciától való átlagos elmozdulásának mértéke in silico szimulációkban)
RU	-	response unit (mértékegység)
SD	-	standard deviáció
SDS-PAGE	-	nátrium dodecil szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
SERPIN	-	szerin proteáz inhibitor
<i>SERPINC1</i>	-	az antitrombint kódoló gén (humán)
<i>SMAD4</i>	-	Mothers against decapentaplegic homolog 4-et kódoló gén (humán)
SNP	-	egy nukleotidot érintő polimorfizmus
SP	-	szerin proteáz (domén)
SPSS	-	„Statistical Package for the Social Sciences” (statisztikai szoftver)
SPR	-	„surface plasmon resonance” (felszíni plazmon rezonancia)
SSC	-	„Scientific and Standardization Subcommittee” (Tudományos és Standardizációs Albizottság)
STR	-	„short tandem repeat” (rövid tandem ismétlődő szekvencia)
SVT	-	superficialis vénás thrombosis
TA	-	teleangiectasia
TE	-	thromboticus esemény
TF	-	„tissue factor” (szöveti faktor)
TFPI	-	„tissue factor pathway inhibitor” (szöveti faktor útvonal inhibitor)
TGFβ	-	„transforming growth factor beta” (transzformáló növekedési faktor béta)
TI	-	trombinidő
TM	-	trombomodulin
TMB	-	tetrametilbenzidin
tPA	-	szöveti plazminogén aktivátor
TTP	-	thromboticus thrombocytopenias purpura
VCI	-	vena cava inferior
VKA	-	K-vitamin antagonistá
VMD	-	„Visual Molecular Dynamics” (biomolekulák elemzésére, ábrázolására szolgáló szoftver)
VSD	-	„variable secondary dichroic beamsplitter” (változtatható szekunder dikroikus Sugárnyaláboztó mikroszkópban)
VTE	-	vénás thromboembolia
VUS	-	„variant of uncertain significance” (ismeretlen jelentőségű genetikai variáns)
vWD	-	von Willebrand betegség
vWF	-	von Willebrand faktor
<i>vWF</i>	-	a von Willebrand faktor-t kódoló gén (humán)
vWF:Ab	-	a von Willebrand faktor vérlemezkéhez kötődési képességének vizsgálata a vWF GpIba epitópja elleni monoklonális antitest jelenlétében

vWF:Ac	-	von Willebrand faktor aktivitás
vWF:Ag	-	vWF antigén koncentráció
vWF:CB	-	a von Willebrand faktor kollagénhez történő kötődésének vizsgálata
vWF:FVIIIb	-	a von Willebrand faktor VIII-as faktorhoz történő kötődésének vizsgálata
vWF:GPIbM	-	a von Willebrand faktor vérlemezkéhez kötődési képességének vizsgálata funkciónyerő mutáns rekombináns GPIb α fragmens jelenlétében risztocetin nélkül
vWF:GPIbR	-	a von Willebrand faktor vérlemezkéhez kötődési képességének vizsgálata rekombináns GPIb α fragmens és risztocetin jelenlétében
vWF:RCo	-	risztocetin kofaktor aktivitás
WB	-	Western blot
WT	-	„wild type” (vad típusú) fehérje

2 BEVEZETÉS

A klinikai és laboratóriumi hemosztazeológia egy dinamikusan fejlődő, újabb és újabb terápiás és diagnosztikus lehetőségeket kínáló szakma. E betegek ellátásában a klinikai-laboratóriumi párbeszéd különösen fontos, egyrészt azért, mert a betegségek diagnózisában a laboratóriumi vizsgálatoknak perdöntő szerepe van, másrészt az egyes terápiás modalitások hatékonyságának ellenőrzése, gyakran élethosszig tartó kezelések folyamatos nyomonkövetése is laboratóriumi méréseken alapul. Az elérhető laboratóriumi vizsgálómódszerek esetenként nem válaszolják meg kielégítően a klinikai kérdéseket, felmerülhetnek populáció specifikus szempontok is, melyek egy-egy módszer alkalmazását nem támogatják, másokét előtérbe helyezik. E szakterületen belül a ritka hemosztázis rendellenességek klinikuma-laboratóriumi diagnosztikája- kutatása egy külön, rendkívül izgalmas szeletét képezi az orvoslásnak. Ritkaságuk miatt, nagy betegcsoporton kivitelezett klinikai tanulmányok hiányában, nemzetközi ajánlások – különös tekintettel a hosszú távú terápiára és a speciális helyzetek, pl. műtét, szülés megoldására – általában nem elérhetőek. Tapasztalat híján egyes ritka hemosztázis rendellenességek diagnózisa jelentős késlekedéseket szenved. Az adekvát diagnózis felállítását e betegségek esetében általában csak szofisztikált módszertannal rendelkező laboratóriumok vállalhatják fel, ahol lehetőség van a módszerfejlesztésre, az új módszerek gyors bevezetésére és ahol a diagnosztika és kutatás szoros egységet képezve lehetőséget teremt a folyamatos fejlődésre, az új, szakirodalomban még nem leírt eltérések felismerésére is. A ritka betegségek, így a ritka hemosztázis rendellenességek kezelése is speciális centrumokhoz kapcsolódik. A ritka hemosztázis rendellenességekkel élők ellátása mind a diagnosztikát, mind a terápiát tekintve az orvoslás egy nehéz szakterülete, ugyanakkor nagyon érdekes, még ma is sok kutatási lehetőséget ad. A ritka betegségek kutatásának nehézsége legalábbis részben abban áll, hogy egy-egy kórképpel mélységeiben kevés munkacsoport foglalkozik, ami a kollaborációk kialakítását, a tapasztalatcserét, de az eredmények disszeminálását is nehezíti. A ritka rendellenességekkel kapcsolatos publikációk olvasóközönsége kisebb, gyakran az adott szűkebb szakterület művelőire korlátozódik. A ritka betegségek kutatásának támogatottsága általában nem éri el az ún. gyakori, népbetegségek kutatásának szintjét, lévén egy-egy kórkép relatíve kevés embert érint, ugyanakkor e betegségek sokszor aluldiagnosztizáltak, így prevalenciájuk a vélnél magasabb, másrészt azon betegek, akiket érint, joggal várják el az egyéb betegségekben szenvedőkéhez hasonló színvonalú ellátást. A sokféle ritka betegség prevalenciája összeadódva már nem is olyan ritka, így van ez a ritka hemosztázis rendellenességek esetében is. Továbbá, egyes ritka betegségek adott populációban felhalmozódást mutathatnak, befolyásolva a kórképre vonatkozó diagnosztikai, terápiás eljárásrendet. Pályám során a ritka hemosztázis rendellenességek kutatását, az e betegségekben szenvedő gyermek és felnőtt betegek felkarolását érzem és érzem leginkább magaménak, azon igyekezve,

hogy e betegek minél korábban korrekt diagnózishoz juthassanak, ezáltal az adekvát kezelés lehetőségét megkapva mind élettartam, mind életminőség tekintetében a lehető legkedvezőbb helyzetbe kerülhessenek.

Az értekezésben bemutatom e tevékenységem egy szeletét, kitérve ritka vérzékenységekkel és thrombophiliákkal kapcsolatos kutatásaim eredményeire is.

2.1 A hemosztázis modern koncepciója, pro-és antikoaguláns tényezői

Ahhoz, hogy a véralvadás folyamata ott, akkor és olyan intenzitással játszódjon le a szervezetben, ahol, amikor és amilyen mértékben arra szükség van, a hemosztázis pro-és antikoaguláns tényezőinek kényes egyensúlyára van szükség. A hemosztázis egy három pilléren nyugvó rendszer, mely az érfal épségét (vaszkuláris rendszer), a véralvadás komponenseinek (humorális rendszer), valamint a thrombocyták megfelelő mennyiségét és minőségét (celluláris rendszer) igényli. A véralvadás modern koncepciója szerint e három rendszer összehangolt és szimultán működése vezet az érfal sérülés helyén kialakuló, az elvérzést megakadályozó stabil alvadék kialakulásához, valamint biztosítja, hogy a folyamat lokalizált maradjon.

Az érfal sérülésekor az extracelluláris matrix vérrel történő érintkezése elindítja az alvadási folyamatot, melyet a modern koncepció mentén négy fázisban képzelünk el. Az iniciáció fázisában thrombocyták adhéziója történik a sérülés helyén a szabaddá váló kollagénfelszínhez, részben a von Willebrand-faktor (vWF) közreműködése révén. A véralvadás ezen kezdeti fázisában az aktív VII-es faktor-szöveti faktor (FVII-TF) komplex aktiválja a IX-es (FIX) és X-es (FX) faktorokat. Az aktivált IX-es faktor (FIXa) a thrombocytákkal szorosan kapcsolódva készen áll a véralvadás további lépéseiben történő közreműködésre. Az aktivált FX (FXa) aktiválja az V-ös faktort (FV), és az aktív FX és FV (FXa és FVa) által alkotott komplex már itt, az első fázisban képes egy kis mennyiségű protrombin trombinná alakítására. Ehhez a reakcióhoz a FV legvalószínűbben a sérülés helyére sereglő vérelemek alfa-granulumaiból származik, ahonnan eleve részlegesen aktivált formában szabadul fel, így e kezdeti, alacsony szintű trombin generációhoz további aktivációt ebben a lépésben nem igényel. A kis mennyiségű trombin hatására képződő kevés, lokális fibrin még nem elegendő a sérülés helyén történő hemosztázis biztosítására, így a folyamat tovább halad a következő, az amplifikáció stádiumába. Az előző lépésben keletkezett trombin mind a thrombocytá aktivációt, mind a koagulációs kaszkádot magasabb sebességi fokozatra kapcsolja, ez thrombocytá alakváltozást („shape change”), valamint a foszfadil-szerin külső membrán felszínén történő expresszióját eredményezi, ami az alvadásfaktor komplexek számára elengedhetetlenül fontos horgonyzó és aktiváló felszín. A kis mennyiségű trombin által aktivált thrombocyták kiürítik granulumaik tartalmát is. Az alfa-granulumokból nagyobb molekulák, például a fentebb említett részlegesen aktivált FV, a denz-granulumokból kismolekulák, például ADP és polifoszfát szabadulnak ki, ez utóbbiak

felelősek további vérlemezke aktivációért, illetve a prokoaguláns mechanizmusok támogatásáért is. A koagulációs kaszkádot a trombin a FV és a VIII-as alvadásifaktor (FVIII) aktiválásával segíti. A FVIII legvalószínűbben a vWF – a FVIII karriermolekulája – által kerül közel az aktivált trombocytákhoz és a trombinhoz. Az amplifikációs lépés végén így rendelkezésre állnak az aktivált trombocyták, felszínükön a koaguláció két aktivált kofaktorával, a FVa és FVIIIa-val. A következő, propagációs lépésben megtörténik az alvadási folyamat kiteljesedése, ami a szerteágazó következményekkel járó trombin nagy mértékű generációjához vezet. Ezt a lépést az amplifikáció során keletkezett aktiv kofaktorok és az iniciációs lépés óta rendelkezésre álló FIXa indítja. A FIXa-FVIIIa komplex (tenáz) aktiválja a FX-et a trombocyta felszínén, majd az így keletkezett FXa kapcsolódva a FVa-val (protrombináz komplex) trombin generációt idéz elő. A keletkezett trombin itt már nagy mennyiségű fibrinogén-fibrin átalakulást idéz elő; a keletkezett fibrin – kapcsolódva a trombocyták GPIIb/IIIa receptorához – stabilizálja a „trombocyta dugót”, azáltal, hogy elősegíti a trombocyta aggregációt. A trombin, mint a hemosztázis főszereplője, a fibrinalvadék kialakításán és védelmén túl számos egyéb hatással is rendelkezik. Aktiválja a XI-es alvadásifaktort (FXI), ami a FIX aktiválásával FXa generációt indukál. A trombin további trombocyta aktivációhoz is vezet, fontos szerepe van a véralvadás XIII-as faktorának (FXIII) aktiválása szempontjából is: az A-alegység aktivációs peptidjének felszabadítását követően, a heterotetramer FXIII B-alegységének lehasadásával az aktív forma képessé válik a fibrinháló stabilizálására a glutamil-lizil keresztkötések kialakítása révén.

Az alvadékképződés fiziológiás esetben a sérülés helyére korlátozódik. A véralvadás negyedik lépése a limitáció, vagy lokalizáció, voltaképpen annak biztosítása, hogy a folyamat ne disszeminálódjon. A limitációnak számos kulcsmozzanatát ismerjük, melyek egy részét érdekes módon éppen a trombin iniciálja, saját keletkezésének gátat szabva („negatív feedback”). Trombin-függő limitáló mechanizmusa a véralvadásnak a protein C (PC) útvonal. A trombin kapcsolódása az endothel sejtek felszínén található trombomodulinhoz (TM) konformáció változást idéz elő a trombinon, aminek következtében az nem hasít több fibrinogént, ugyanakkor aktiválja a PC-t. Az endoteliális protein C receptor fokozza a trombin-TM által történő PC aktivációt. Az aktivált PC (APC) hatékonyan inaktiválja a FVa és FVIIIa faktorokat három, illetve két kitüntetett helyzetben lévő arginin reziduum mellett történő hasítással. A FVa inaktivációjakor az egyik hasítási hely az Arg506, ami a FV Leiden mutációja következtében Gln506-ra változva az ismert APC rezisztenciához vezet. Az APC hatékony kofaktora a FVa inaktivációban a protein S (PS), a FVIIIa inaktivációban a PS és a natív FV. Az antitrombin (AT) egy szerin proteáz inhibitor (SERPIN), a trombin és a FXa, valamint egyéb szerin proteáz alvadásifaktorok progresszív (lassan ható) inhibitora. A gátlás sebessége heparin, vagy heparán szulfát proteoglikán jelenlétében jelentősen fokozódik. A

fibrinthrombus degradációjáért a fibrinolitikus rendszer felelős. Ennek kulcsenzime a plazmin, amely plazminogénből keletkezik elsősorban a szöveti plazminogénaktivátor hatására (t-PA).

2.2 A ritka betegségek definíciója, vizsgálatuk korlátai, tanulmányozásuk lehetőségei

A ritka betegségekkel kapcsolatos kutatások, diagnosztikai fejlesztések, illetve új terápiás lehetőségek keresése mindig többé-kevésbé „mostohagyermeknek” számított az orvostudományban. Az elmúlt egy-két évtizedben – részben betegszervezetek hatékony érdekvégyesítési tevékenységének és nagy részben különböző ritka betegségekkel foglalkozó kutatócsoportok nemzetközi szintű munkásságának köszönhetően – a ritka betegségeket egyre nagyobb figyelem övezi. A ritka betegségekre ma már intézmények és bizottságaik szakosodtak az Európai Unióban (EU) és az Amerikai Egyesült Államokban (USA) egyaránt. A becslések, illetve jelenleg rendelkezésre álló adatbázisok szerint, kb. 5000-8000 ritka betegséget tartunk számon, melyek többsége veleszületett, monogénes betegség. Ezekből az adatokból az következik, hogy – bár a ritka betegségek ritkák és egy-egy ilyen kórkép kevés pácienset érint – a ritka betegségekben szenvedők száma összességében valójában magas. (Hazánkban kb. 830 ezer ritka betegségben szenvedő egyént tartanak nyilván, ami nem elhanyagolható érték.) Ezt a tényt felismerve és azzal szembeesülve, hogy a ritka betegségekkel kapcsolatos diagnosztikai és terápiás fejlesztések messze elmaradtak a „gyakori” betegségek mögött, a ritka betegségek diagnosztikájának, terápiájának problémáját ma már az Európai Unió is kiemelt kérdésként kezeli. Deklarációjában kiemeli, hogy a ritka betegséggel élőköt ugyanolyan figyelem és minőségi ellátás illeti meg, mint más kórképekben szenvedőket. Mindezen EU törekvések magukba foglalják a ritka betegségekkel kapcsolatos szakmai információk eljuttatását a szakemberek és betegszervezetek felé, az azonos szakterületen ritka betegségekkel foglalkozó centrumok tudományos kollaborációinak megszervezését, tudományos programjaik támogatását, szakértő diagnosztikai és terápiás centrumok és hálózatok kialakítását, a ritka betegségek nomenklatúrájának egységesítését, adatbázisok kialakítását, „orphan” gyógyszerek fejlesztésének, azok klinikai kutatásainak támogatását, ajánlások megfogalmazását, illetve tudományos publikációk közlését. Ezek a tevékenységek már most is éreztetik kedvező hatásukat, habár még mindig sok olyan beteg van, aki több év, esetleg évtized elteltével jut adekvát diagnózishoz, mivel a laboratóriumi vizsgálatok és terápiás modalitások hazájában nem, vagy csak korlátozottan érhetőek el, a betegségével kapcsolatban még számos megválaszolatlan kérdés merül fel. A ritka betegségekkel kapcsolatos alap- és klinikai kutatásoknak tehát hiánypótlóan helye van az orvostudományban, releváns – adott esetben populáció specifikus – epidemiológiai, biokémiai, laboratóriumi diagnosztikai, prognosztikai, terápiás targetekkel kapcsolatos adatokat szolgáltatva e

szakterület számára. Abból kiindulva, hogy egy-egy konkrét ritka betegségben, vagy betegségcsoportban kis számú beteg szenved, nagy klinikai tanulmányok nem kivitelezhetők, a korrekt módon kivitelezett esettanulmányok és a kisebb klinikai tanulmányok szerepe felértékelődik. Fontossá válnak a multicentrikus tanulmányok is, de mivel egy-egy szakterülettel kevés kutatócsoport foglalkozik, a kollaborációs partnerek megtalálása nehézkes. Nemzetközi regiszterek kialakítása e betegségekben különösen fontos.

2.2.1 A ritka, veleszületett vérzékenységek

A ritka betegségek kategóriáján belül a hemosztázis rendellenességek egy jól elkülönített csoportot képeznek. A Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság (International Society on Thrombosis and Haemostasis, ISTH) definíciója szerint a haemophilia A és B, illetve a von Willebrand betegség (vWD) gyakoribb altípusának kivételével minden coagulopathia és thrombocytá funkció zavar, valamint a hereditaer haemorrhagias teleangiectasia (HHT) ritka vérzékenységnek minősül. A ritka coagulopathiák és thrombocytá funkció zavarok homozigóta, vagy összetett heterozigóta (azaz súlyos) formájának prevalenciája egyenként 1:500 ezer és 1:3 millió közé tehető. A veleszületett vérzékenységek széleskörű diagnosztikáját lehetővé tevő, a teljes diagnosztikai palettát – a klinikumtól indulva a biokémiai vizsgálatokon és molekuláris diagnosztikán keresztül egészen a kutatólaboratóriumi vizsgálatokig – magába foglaló laboratóriumok száma igen alacsony.

Munkacsoportunk az elmúlt 20 évben számos, ritka vérzékenységben szenvedő beteg esetében biztosította a korrekt diagnózist a laboratóriumi fenotípus adekvát – esetenként saját fejlesztésű – módszerekkel történő meghatározásával. Az új, még nem karakterizált mutációk következményeit fehérje szinten részletesen tanulmányoztuk expressziós rendszerekben különböző rekombináns fehérje vizsgálatokkal. Differenciáldiagnosztikai problémákat oldottunk meg új diagnosztikai algoritmusok kidolgozásával, illetve módszertani fejlesztésekkel. Az értekezésben a XIII-as faktor (FXIII), a FV, FX deficienciák, valamint a dysfibrinogenaemia diagnosztikájával, a von Willebrand betegség egyes típusaival és a vaszkuláris rendellenességek közül a HHT betegek vizsgálataival kapcsolatos eredményeinket mutatom be.

A XIII-as faktor deficiencia

A normál átlag 1%-a alatti FXIII szint súlyos vérzékenységet eredményez. Ilyen alacsony FXIII aktivitás az öröklött FXIII deficienciákban abban az esetben fordul elő, ha a FXIII-A alegység érintett. A veleszületett FXIII deficiencia még a ritka vérzékenységek között is a különösen ritka kategóriába sorolható (prevalencia kb. 1:2 millió), hazánkban az elmúlt 20 évben négy beteg (család) esetében igazoltunk veleszületett FXIII deficienciát és végeztünk teljes körű diagnosztikát. Mivel a ritka

vérzékenységek, így a FXIII deficiencia diagnosztikájával kapcsolatban is csupán kevés laboratórium rendelkezik teljes vizsgálati palettával, a hazai betegek mellett számos külföldi FXIII deficiens család esetében is biztosítottuk a diagnosztikai háttérrel (ld. később). A laboratóriumi módszertani problémák, a nem megfelelő laboratóriumi diagnosztikai gyakorlat és a klinikai oldal nem megfelelő ismerete miatt a FXIII deficiencia gyakran nem, vagy csak jelentős késlekedéssel kerül felismerésre. Az urea oldékonyági tesztet például számos laboratóriumban még ma is a FXIII deficiencia elsővonalbeli (szűrő) tesztjeként alkalmazzák, holott e teszt csupán az extrém alacsony FXIII szintek esetén mutat eltérést, a kevésbé alacsony, de klinikailag jelentőséggel bíró FXIII szintek mellett normál eredményt ad. A veleszületett FXIII deficiencia genetikai háttérét tekintve mind a *F13A1* (A-alegység deficiencia), mind a *F13B* (B-alegység deficiencia) génekben számos mutációt közöltek napjainkig. A genetikai defektus és a klinikai tünetek és a laboratóriumi fenotípus közötti kapcsolat sokszor feltáratlan marad, részben módszertani problémák, vagy a laboratóriumi fenotípusra vonatkozó kevés adat miatt. Emiatt értékesek azok a tanulmányok, melyekben a molekuláris genetikai defektus hatását részletes laboratóriumi vizsgálatok eredményeivel és pontos klinikai adatokkal demonstrálják. Az értekezésben bemutatásra kerülnek olyan FXIII deficiens betegek, ahol Speciális Klinikai Hemosztazeológiai laboratóriumunkban derítettük fel a deficiencia háttérében álló genetikai eltéréseket, majd a mutációk következményeit teljes körű laboratóriumi vizsgálatokkal és részletes klinikai esettanulmányokkal demonstráltuk. Eredményeink és laboratóriumi tapasztalataink alapján a FXIII deficiencia klinikumát, laboratóriumi aspektusait összefoglalva a helyes diagnosztikai gyakorlatról ajánlásokat fogalmaztunk meg (ld. később).

Az V-ös faktor deficiencia

A régebben parahaemophiliának, Owren's disease-nek is nevezett FV deficiencia ritka, autoszomalis recesszív coagulopathia, homozigóta (súlyos) formájának prevalenciája 1:1 millió. A homozigóta FV deficiens betegek FV aktivitása 10% alatti (általában 1% alatt van) és általában súlyos vérzékenység jellemzi őket. Míg a haemophilia A és B esetén egyértelmű és szoros összefüggés van az adott faktor aktivitása és a vérzékenység súlyossága között, addig FV deficienciában az összefüggés lazább. A súlyos vérzések nem csupán 1% alatt, de már 15% FV szintek alatt is jelentkezhetnek, enyhébb vérzékenység pedig még ennél magasabb FV aktivitás esetén sem kizárható. A legtöbb heterozigóta egyén tünetmentes, de a FV véralvadásban betöltött igen komplex és bonyolult szerepe miatt, lehetnek kivételek. E betegek felismerése kihívás elé állítja a klinikust és laboratóriumi szakembert is, különösen, ha nem gondolunk erre a lehetőségre. A koaguláció szűrőtesztjei ugyanis csak akkor mutatnak megnyúlást, ha az alvadásifaktor aktivitás értékek 25-30%-nál alacsonyabbak. Ezáltal – csupán a szűrőtesztek normál eredményei alapján – az

adekvát diagnózis elmaradhat, vagy jelentősen késhe egyes betegeknel. A homozigóták előfordulási gyakoriságából kiindulva, a heterozigóta állapotnak kb. 1:1000 frekvenciával kellene megjelennie, az esetek többsége azonban felderítetlenül marad, hiszen nem jellemző az alvadásiidők megnyúlása és legtöbbször vézses tüneteket sem mutatnak. Amennyiben azonban egy klinikailag vézékeny betegnel heterozigóta FV deficienciát állapítunk meg, csak abban az esetben juthatunk el a FV deficiencia laboratóriumi diagnózisáig, ha hemosztazeológiai szempontból minden egyéb lehetőséget kizárunk. Egy-egy *F5* mutáció esetében a részletes klinikai-laboratóriumi esetismertetések tehát nagy mértékben segítenek a további betegek felismerésében, a korai adekvát diagnózis felállításában. Az értekezésben bemutatunk egy olyan FV deficiens családot, ahol a proband, csupán műtéti beavatkozások alkalmával jelentkező, de akkor súlyos vézsei háttérében heterozigóta FV deficienciát diagnosztizáltunk, a mutáció patogenitását kísérletesen igazoltuk és eredményeinket klinikai és laboratóriumi tanulságot szolgáltató eseteírás formájában közöltük.

A X-es faktor deficiencia

Az öröklött FX deficiencia autoszomalis recesszív, homozigóta formában 1:1 millió gyakorisággal előforduló ritka coagulopathia. A homozigóta FX deficiens betegek alvadásifaktor aktivitása általában 10% alatt, leggyakrabban 1% alatt van és súlyos vézses tüneteket produkálnak. A FX deficiencia súlyosságát bizonyítja az a megfigyelés is, hogy a tünetmentességhez legalább 56%-os FX aktivitás szükséges, valamint, hogy a Grade III típusú vézések már 10% faktorszint alatt jelentkeznek. Súlyos deficienciában jellemzőek az ún. nagy vézések: haemarthrosis, intracranialis vézés, gastrointestinalis vézések, intramuscularis bevérzések. Enyhébb esetekben epistaxis, foghúzást követő vézés, vagy sebészi beavatkozások kapcsán jelentkező vézés lehet a vezető tünet. A FX deficiencia (a FV deficienciához hasonlóan) felismerése általában a parallel megnyúlást mutató és normal plazmával korrigálható PI és APTI eredményeken alapul, melyet az ún. közös út faktorok aktivitásának meghatározása követ általában egyfázisú alvadási tesztekben. A FX deficiens betegek (a FV deficienciához hasonlóan) többsége I-es típusú, kvantitatív deficienciában szenved. Eddig kb. 100 különböző mutációt írtak le, a mutációk túlnyomó többsége misszensz pontmutáció, különböző molekuláris következményekkel. A súlyos I-es típusú deficiencia egyik oka elvileg a mutáns FX molekula szekréción defektusa lehet, amit pl. a FX Santo Domingo mutáció esetében igazoltak, ahol a mutáció (p.Gly-20Arg) a szignál peptidet érintette. Ebben az esetben – in vitro biokémiai vizsgálatok tanulsága szerint – a mutáns fehérje az endoplazmatikus retikulumban rekedt meg, így nem szekretálódott a sejt kultúra médiumába. Érdekes módon, nemcsak a szignál peptid mutációival összefüggésben találtak szekréción zavarra utaló laboratóriumi fenotípust FX deficienciában, és – bár in silico kísérletekben többnyire megerősítették

a hibás molekulaszervezetet, ami feltehetően nem-szekretálódó fehérje szintéziséhez vezet – az in vitro expressziós tanulmányok között munkacsoportunké volt az első, ami egy új mutáció esetében feltárta a mechanizmust, mellyel nem a szignál peptidet érintő eltérés esetén is szekréció zavar következhetett be.

Egyéb ritka vérzékenységek: a von Willebrand betegség ritka formái és a dysfibrinogenaemia

A laboratóriumi diagnosztika az előzőekben említett coagulopathiák esetén (FXIII, FV és FX deficienciák) az arra felkészült laboratórium számára nem jelent különösebb nehézséget és az adott alvadási faktorok célzott meghatározásával a diagnózis felállítható, vannak azonban olyan vérzékeny állapotok, ahol a diagnosztikai kihívásokat ma elsősorban a differenciáldiagnosztikai kérdések jelentik. Ezen nehézségek hátterében számos tényező állhat, például az, hogy az elérhető laboratóriumi módszerekkel nem mindig különíthetők el az egyes – nagyon hasonló laboratóriumi fenotípussal járó – kórképek egymástól, vagy éppen az, hogy nem is lehetséges funkcionális laboratóriumi vizsgálatot végezni adott betegség esetén.

A von Willebrand betegség (vWD) a klinikai hemosztazeológiai laboratóriumok fókuszpontjában áll, hiszen nemcsak a „leggyakoribb ritka vérzékenység”, hanem a legbonyolultabb is laboratóriumi differenciáldiagnosztikai szempontból. Sokrétű funkciójának köszönhetően a vWD-nek több megjelenési formája, altípusa létezik, melyek más-más laboratóriumi fenotípussal jelentkeznek, de adott esetben eltérő terápiás megfontolásokat is igényelnek. A vWD diagnosztikája igen komplex laboratóriumi teszt arzenált és bonyolult interpretációt igényel. A differenciáldiagnosztikai problémák tudományos igényű megközelítése, megoldása és annak közlése jelentős mértékben segíti e szakterület fejlődését.

A ritka, veleszületett fibrinogén rendellenességek diagnosztikája és differenciáldiagnosztikája szintén érdekes kérdés. Ezek lehetnek kvantitatív (hypo-és afibrinogenaemia), vagy kvalitatív (dysfibrinogenaemia, vagy hypodysfibrinogenaemia) esetek. A dysfibrinogenaemia egy rendkívül becsapós, heterogén kórkép. Klinikailag a vérzés-tünetmentesség-thrombosis spektrumon bárhol elhelyezkedhet. A veleszületett fibrinogén rendellenességek hátterében az *FGA*, *FGB* és *FGG* gének mutációi állhatnak. A vWD-het hasonlóan, itt is hasznosak a differenciáldiagnosztikai eset-leírások és kis kohorsz tanulmányok.

Egyéb ritka vérzékenységek: a hereditaer haemorrhagias teleangiectasia

A hereditaer haemorrhagias teleangiectasia (HHT), vagy Osler-Rendu-Weber kór egy AD öröklésmentet mutató multiszisztémás vaszkuláris vérzékenység. Prevalenciája kb. 1:5000-1:8000-re tehető, azonban ennek becslését bizonytalanán teszi többek között a betegség inkomplett penetranciája és az, hogy e betegség erősen aluldiagnosztizált. A HHT diagnózisa alapvetően a Curacao kritériumok meglétén alapul. Ezek magukba foglalják a spontán és rekurrens orrvérzéseket (a betegek 90-

95%-ában megfigyelhető), a multiplex teleangiectasiákat (a betegek 90%-ában megfigyelhető és jellemzően az ajkakát, szájüreget, kézujjakát és az orr külső felszínét érintik), a zsigeri vascularis léziókat, úgymint gastrointestinalis teleangiectasia (20-80%), pulmonalis (30-50%), hepaticus (32-48%), cerebrialis, vagy spinalis (23%) arteriovenosus malformatiok (AVM) és az első fokú rokon HHT érintettsége. A HHT esetében – lévén vaszkuláris rendellenesség – laboratóriumi tesztekéről nem beszélhetünk, a HHT esetek kb 85%-ában heterozigóta formában találunk mutációt az endoglin (*ENG*), vagy az aktivin receptor-like kináz 1-et (ALK1-et) kódoló (*ACVRL1*) génekben. Ezek a transzformáló növekedési faktor béta ($TGF-\beta$) szuperfamilia tagjai. Ritkábban a SMAD4-et kódoló *MADH4* génben, vagy a *GDF2* génben (ami a BMP-t, az ALK1 ligandját kódolja) lehet eltérést találni. A *RASAI* gén (ami a RAS P21 fehérje aktivátor 1-et kódolja) mutációi is HHT-szerű fenotípussal járnak (capillaris malformatio-arteriovenosus malformatio szindróma). Mivel laboratóriumi teszt nem áll rendelkezésre, a HHT klinikai gyanúja esetén a diagnózis megerősítése közvetlenül genetikai vizsgálattal lehetséges. Mivel a betegség hátterében több gén szerepe is bizonyított, a genetikai diagnosztikai stratégiát egy adott populációban befolyásolhatja alapító mutáció jelenléte. A populációra jellemző gén (és genetikai eltérés) befolyásolhatja az adott régió HHT betegeinek tünettartát is, hiszen a *ACVRL1* és *MADH4* gének érintettsége például a klasszikus HHT tünetek mellett pulmonalis hypertoniával, vagy juvenilis polyposissal is járhat, vagy a *RASAI* mutációk esetében basal sejtes tüdőcarcinomát írtak le. Új mutációk esetén fontos a genotípus-fenotípus összefüggések leírása annak érdekében, hogy tanulságul szolgáljon az adott eltérés hatásával kapcsolatban a betegség megjelenésének idejére (a HHT-re jellemző ugyanis a korfüggő penetrancia is), típusára, vagy súlyosságára.

2.2.2 A ritka veleszületett thrombophiliák

A vénás thromboembolia (VTE) és a kialakulására hajlamosító thrombophilia klasszikus példája a komplex betegségeknek, melyek hátterében genetikai és környezeti tényezők együttesen szerepet játszanak. Az ISTH definíció szerint a veleszületett thrombophiliák – az aktivált protein C rezisztencia (APC rezisztencia) és a protrombin gén 20210 A allél kivételével – a ritka hemosztázis rendellenességek közé tartoznak. A ritka thrombophiliák esetében – érthető módon – nagyon nehéz diagnosztikus és terápiás, vagy prevenciók ajánlásokat megfogalmazni, hiszen egy-egy centrumban általában igen kevés tapasztalat áll rendelkezésre. E betegségek esetén is (hasonlóan a ritka vérzékenységekhez) hangsúlyosak az esettanulmányok, multicentrikus tanulmányok, nemzetközi összefogások, illetve felértékelődik azon vizsgálóhelyek szerepe, ahol valamely okból (ld. az értekezés során később) egy-egy ritka thrombophilia nagyobb gyakorisággal fordul elő.

A ritka thrombophiliák, így az antitrombin (AT), vagy protein C (PC) deficienciák korrekt laboratóriumi diagnózisa lényeges, hiszen befolyásolhatja a

terápiás modalitást, a másodlagos prevenció stratégiát. Munkacsoportunk tevékenysége hozzájárult ahhoz, hogy egyes módszertani problémákat megoldva, ma hatékony és biztonságos laboratóriumi protokollokat ajánlhassunk a klinikai hemosztázis laboratóriumok számára. Továbbá felismertünk olyan egyedi, populáció-specifikus szempontokat, amivel kifejezetten a hazai thrombophilia diagnosztikát tudjuk segíteni. Mindezeket a szempontokat sorban tárgyalom az értekezés során. A ritka thrombophiliák kapcsán érdekes kérdés az is, hogy egy-egy újonnan detektált genetikai eltérés milyen molekuláris következményekkel jár. Nemcsak azért érdekes, mert bizonyítanunk kell azt, hogy az új mutáció valóban patogén szereppel bír (ez idáig diagnosztikai kérdés), hanem azért is, mert a kóros fehérje funkcionális és strukturális vizsgálatai segítségével az adott fehérje fiziológiás jellemzőit, kölcsönhatásait, egyes molekuláris részek szerepét is jobban feltárhatjuk. Ezek a funkcionális és szerkezeti vizsgálatok potenciális gyógyszer targeteket is azonosíthatnak. Munkacsoportunk számos új mutáció in vitro karakterizálását végezte el AT és PC deficienciákban. Az értekezésben ezen vizsgálatainkra is mutatok példát.

Az antitrombin legfontosabb jellemzői, az antitrombin deficiencia klinikuma, jellegzetességei

Az AT a szerin proteáz inhibitorok (szerpinek) családjába tartozó egyláncú glikoprotein, mely α -glikoforma (4 Asn reziduumon glikozilált és ez adja a keringésben lévő AT kb. 90%-át), és β -glikoforma (3 Asn reziduumon glikozilált, kis mennyiségben van) állapotban fordul elő. Fő funkciója a szerin proteáz alvadásifaktorok (főleg a trombin és FXa) gátlása, mely gátlási folyamat heparin, pentaszacharid, vagy heparin szerű proteoglikánok AT-hoz kötődése által sokszorosára fokozódik. Az AT e gátló funkciója szempontjából legfontosabb molekuláris részek az ún. heparin kötő régió (heparin binding site, HBS) és a reaktív centrum hurok (reactive center loop, RCL). Az AT és a pentaszacharid egység közötti kölcsönhatás egy érdekes, többlépcsős folyamat, melynek egyes részleteit munkacsoportunk tárta fel és az értekezésben később részletesen ismertetésre kerül. A laboratóriumban ma már mind a progresszív (azaz heparin jelenléte nélkül), mind a heparin jelenlétében történő (felfokozott) gátló hatást tudjuk vizsgálni, munkacsoportunknak jelentős szerepe volt abban, hogy az AT funkcionális tesztek fejlesztésével ma nemzetközi szinten is élvonalbeli diagnosztikát folytathassunk. Ezen módszerfejlesztésekkel és értékelésekkel kapcsolatos részletes beszámoló az értekezésben később olvasható.

Az AT deficienciát először Egeberg írta le 1965-ben. Az első funkcionális defektusról (AT Budapest) 1974-ben Sas Géza professzor úr és munkatársai számoltak be. Az AT deficienciákat két alaptípusba sorolják, a kvantitatív (I-es típus) és kvalitatív (II-es típus) típusokba. Az I-es típusú kvantitatív AT deficienciában az

AT aktivitása és antigén szintje egyaránt csökkent, ami hibás fehérjeszintézisre vagy szekrécióra utal. A II-es típusú, minőségi deficienciában a defektus érintheti a reaktív helyet (IIRS típus), a heparin-kötőhelyet (IIHBS típus) és lehet pleiotróp (IIPE típus) hatású is. Az AT deficiens betegek többsége heterozigóta formában hordozza a genetikai eltérést, az AT deficiencia homozigóta formában az étellel összeegyeztethetetlen, kivéve egyes IIHBS variánsokat. A betegség molekuláris genetikai háttere igen heterogén, mára már több mint 300, okozati mutációról számoltak be. A molekula N-terminális részéhez közeli régiókat érintő leggyakoribb misszensz eltérések, így a p.Pro73Leu (AT Basel), a p.Arg79His (AT Padua I) és a p.Leu131Phe (AT Budapest 3; ATBp3) IIHBS AT deficienciát eredményeznek. Az ATBp3 mutációval kapcsolatban korábban csak szórványos közléseket találtunk, azonban ezekben az esetleírásokban közös vonás volt, hogy a súlyos, homozigóta betegek mind közép-kelet-európai származásúak voltak, ami felvetette alapító hatás lehetőségét. Az ATBp3 alapító hatását nemzetközi mércével mérve is kiemelkedően nagy számú beteg bevonásával és polimorf genetikai markerek alkalmazásával munkacsoportunk igazolta (lásd később).

Az AT deficiencia tünetei a mélyvénás thrombosis (MVT) és/vagy tüdőembólia, ami gyakran visszatérő is lehet. A thrombosis gyakran szokatlan helyen is kialakulhat, így a felsővégtagokban, a mesenterialis, vese, portalis, retina és agyi erekben, valamint intarcordialisan. Artériás thrombosisokról (myocardialis infarctus, stroke) is beszámoltak már AT deficiencia kapcsán, azonban a deficiencia ritka előfordulása miatt nyilvánvaló, hogy nagy klinikai tanulmányok ezzel kapcsolatban nehezen kivitelezhetőek, inkább esetleírások állnak rendelkezésre. Terhes, AT deficiens nőknél kiemelkedően magas lehet a thrombosis kockázata, habár itt is heterogenitás figyelhető meg az AT deficiencia típusa szerint. Az AT deficiencia ritka előfordulása miatt a terápiás kérdések megválaszolása is nehézségekbe ütközik és leginkább eset-riportok, szakértői vélemények állnak rendelkezésre e téren is.

Az AT deficiencia (ATD) rutin laboratóriumi diagnosztikája során elsővonalbeli szűrőtesztként, a thrombophilia panel részeként egy funkcionális teszt, az AT aktivitás meghatározása történik. Ma már kizárólag kromogén amidolitikus tesztet használunk. Az amidolitikus tesztben az AT által gátolt trombin, vagy FXa maradék aktivitását határozzuk kromogén szubsztrát hozzáadása segítségével. A teszt során a vizsgálandó plazmához trombin, vagy FXa-t adunk feleslegben, amit a plazmában lévő AT funkcionális épségétől függő mértékben gátol. A maradék, gátlás alá nem került trombin, vagy FXa aktivitását specifikus kromogén szubsztrát hozzáadásával teszteljük. Az AT aktivitásának meghatározása elvégezhető heparin jelenlétében (heparin-kofaktor aktivitás) vagy annak hiányában (progresszív aktivitás). A IIHBS AT deficienciákban, munkacsoportunk és mások is felvetették, hogy a trombin alapú tesztek kevésbé érzékenyek, így egyes AT deficiens betegekben referencia tartományon belüli AT aktivitás értékeket mérünk. Később felmerült, hogy

a FXa alapú tesztek érzékenysége között is lehetnek különbségek, ezt azonban szisztematikusan korábban nem vizsgálták, munkacsoportunk végezte ezzel kapcsolatban a legátfogóbb vizsgálatot, ami végül konkrét diagnosztikai ajánlásokhoz vezetett (lásd később az értekezésben). A progresszív AT teszt, ami az előbbieken ismertetett funkcionális teszthez hasonlóan működik, de nem tartalmaz heparint, a IIHBS altípust segít elkülöníteni a többi II-es típusú AT deficienciától. Az AT antigén koncentráció meghatározás szintén az AT deficienciák osztályozásában segít.

Az ATD-val kapcsolatban még ma is számos megválaszolatlan kérdés és bizonytalanság merül fel mind a diagnosztikai kérdéseket, mind a klinikai körülményeket illetően. Munkacsoportommal az elmúlt évtizedben leginkább az AT deficienciák klinikumával, laboratóriumi módszertani megközelítéseivel, molekuláris és *in silico* vizsgálataival foglalkoztam, így téziseimben ezt a problémakört emelem ki és fejtem ki legrészletesebben.

A protein C deficiencia klinikai és laboratóriumi jellegzetességei

A protein C (PC) egy K-vitamin függő, a keringésben kétláncú glikoprotein, kofaktorával, a protein S (PS)-sel, mint természetes antikoagulánsok jelentős szerepet játszanak a koaguláció szabályozásában. Az első PC deficiens esetet Griffin és munkatársai írták le 1981-ben, a beteg rekurrens vénás thrombosisoktól szenvedett. Azóta már számos PC deficiens eset került közlésre és általában a háttérben álló genetikai defektust is igazolták. A PC deficiencia tünete a – gyakran visszatérő és fiatal felnőttkorban kialakuló – alszár vénáit érintő mélyvénás thrombosis és/vagy tüdőembólia mellett a szokatlan lokalizációban megjelenő, pl. proximális végtagi, vagy mesenterialis, illetve cerebrális vénás thrombosis, esetenként szívüregi thrombus megjelenése. A PC deficiencia fokozza a VTE kockázatát terhességben, súlyos, homozigóta PC deficienciában pedig, amikor a plazma PC koncentrációja extrém alacsony, purpura fulminánsként ismert disseminált thrombosis alakul ki. A K-vitamin antagonistá-indukálta bőrnekrozis súlyos szövődmény lehet PC vagy PS deficiens betegeknél. PC vagy PS deficiens betegekben artériás thrombosisokat is leírt több esettanulmány. A PC deficiencia – a laboratóriumi vizsgálatok eredményei alapján – I-es (kvantitatív) és II-es (kvalitatív) típusra osztható. I-es típusú PC deficienciában a PC aktivitás (alvadási idő meghatározáson alapuló, vagy amidolitikus esszék kromogén szubsztrátot alkalmazva) és antigén szint (ELISA módszerrel) arányosan alacsony, csökkent fehérjeszintézist vagy szekréciót jelezve, míg II-es típusú deficienciában az aktivitás csökkent az antigén szint jelentős csökkenése nélkül. Az utóbbi típust okozhatja például a szubsztrát, Ca^{2+} vagy receptor kötés zavara, vagy bármilyen, az aktív centrumra gyakorolt hatás. Az I-es típusú deficienciát okozó mutációk többsége egy nukleotidot érintő csere a *PROC* kódoló régiójában, mely aminosavcserét eredményez (ezek aránya kb. 70%). Amennyiben elvégezték (ritkán), a molekulamodellzés majdnem minden esetben kóros fehérje

feltekeredést és következményesen a mutáns fehérje instabilitását jelezte. In vitro expressziós tanulmány az esetek csupán harmadában készült. A II-es típusú deficiencia diagnózisa a funkcionális tesztek és az antigén szint mérés eredménye közötti diszcrepancián alapszik. Misszensz mutáció fordul elő ilyenkor leggyakrabban és a Gla-domént vagy pro-peptidet érintő aminosavcsere károsodott Ca^{2+} - és foszfolipid-kötést eredményez.

3 CÉLKITÚZÉSEK

A ritka hemosztázis rendellenességekkel kapcsolatos korábbi kutatási eredményeinkre alapozva, valamint szembesülve e ritka betegségekben szenvedők – gyakran inadekvát diagnosztikát követő – inadekvát klinikai ellátásának negatív következményeivel, munkásságom során elsősorban a ritka haemorrhagias diathesisekre és ritka thrombophiliákra összpontosítottam. Célul tűztünk ki diagnosztikai módszerfejlesztéseket és új laboratóriumi protokollok bevezetését, ajánlások megfogalmazását, ill. tanulmányozni kívántuk a ritka hemosztázis rendellenességek hátterében álló genotípus-fenotípus kapcsolatokat, melyekből számos érdekes, előremutató következtetést vonhattunk le. Részleteiben:

3.1 Vérzékenységek

- Adekvát laboratóriumi diagnózis biztosítását követően genotípus-fenotípus összefüggések tanulmányozása FXIII, FV és FX deficienciákban.
- Diagnosztikai ajánlás megfogalmazása FXIII deficienciában.
- Differenciáldiagnosztikai problémák megoldása fibrinogén rendellenességekben, von Willebrand betegség ritka típusaiban és hereditær haemorrhagias teleangiectasiában (HHT).
- A HHT betegek genotípus-fenotípus jellemzőinek értékelése; alapító mutáció felderítése.

3.2 Thrombophiliák

- AT deficiens betegek és családtagjaik bevonásával klinikai- laboratóriumi adatbázis, majd AT deficiencia nemzetközi regiszter kialakítása.
- Alapító hatás jelenlétének igazolása, korának és eredetének meghatározása a hazánkban rekurrens AT Budapest3 mutáció kapcsán.
- Új AT és PC mutációk biokémiai és in silico karakterizálása.
- Laboratóriumi diagnosztikai problémák explorálása AT deficienciában, a funkcionális AT esszék teljesítőképességének vizsgálata a különböző AT deficiencia típusok esetén, új laboratóriumi tesztek és diagnosztikai algoritmusok kidolgozása.
- Az AT IIHBS típuson belüli altípusok eltérő klinikai és laboratóriumi viselkedése hátterében álló molekuláris különbségek feltárása in vitro biokémiai és in silico módszerekkel.

4 BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Vizsgálatok haemorrhagias diathesisekben

4.1.1 Betegek

XIII-as, V-ös és X-es faktor deficienciák

Két, súlyos vérzéses tünetekkel rendelkező beteget vizsgáltunk, egy újszülött fiút (Hollandia) cephalhematoma, köldökcsomk vérzés és egy 13 éves lányt (Belgium) extraduralis hematoma, felszíni horzsolásos vérzések, sebgyógyulási zavarok és feltárást igénylő hasúri vérzések miatt. Mindkét betegnél XIII-as faktor hiány igazolódott. 34 éves nőbetegünknel szülést, illetve invazív beavatkozásokat követően fellépő vérzéses tünetei háttérében FV deficienciát igazoltunk. A FX deficiencia diagnózisa idején egy éves fiúgyermek inadekvát traumára bekövetkező súlyos subduralis vérzés miatt került felvételre. A beteg családi anamnesise vérzékenység tekintetében negatív volt. Saját anamnesisében kiemelendők voltak még a gyakori bőr-és nyálkahártya vérzések. A szülők közeli rokonok.

Hereditaer haemorrhagias teleangiectasia

A Heves Vármegyei Markhot Ferenc Oktatókórház és Rendelőintézet ellátási területén, hereditaer haemorrhagias teleangiectasiával (HHT) élő betegek felkutatását és gondozását a Fül-orr-gégészeti osztály kezdeményezte és vállalta. A tézisekben most csak azokról a vizsgálatokról számolok be, melyek tudományos szempontból is érdekesek. Vizsgálataink során öt, egymással látszólag nem rokon családhoz tartozó, HHT gyanús beteg (index személyek: 53 éves férfibeteg, 82 éves nőbeteg, 37 éves nőbeteg, 56 éves férfibeteg és egy 56 éves nőbeteg) esetében került sor először genetikai vizsgálatra, mely akkor az *ENG* és *ACVRL1* gének analízisét jelentette (lásd később). Sor került továbbá az öt család HHT-gyanús családtagjainak vizsgálatára is (összesen 34 egyén). A HHT diagnózisát az aktuális irányelvek szerint állítottuk fel. Az AVM-ek kimutatása céljából elvégeztük a szükséges képalkotó vizsgálatokat is.

A von Willebrand betegség (vWB) és fibrinogén rendellenességek differenciáldiagnosztikai problémát jelentő esetei

Az elmúlt 10 évben – az országban egyedülálló módon rendelkezésre álló, teljes körű és részletes laboratóriumi hemosztazeológiai vizsgálataink során – számos olyan esettel találkoztunk, ahol a végső diagnózis felállításához a genetikai vizsgálatok elkerülhetetlenek voltak. E vizsgálatok során többnyire megerősítettük a hemosztázis vizsgálatok eredményeire alapozott gyanúnkat, pontosítottuk a betegségek altípusba sorolását és differenciáldiagnosztikai kérdéseket sikerült eldöntenünk, valamint egyes esetekben igen meglepő és tanulságos eredményekre bukkantunk. Összesen n=63 vWD, n=27 hypo-vagy dysfibrinogenemia és n=10 HHT gyanús esetet elemeztünk. Utóbbiak közül csak azokat ismertetem a tézisekben, ahol nem a gyakori (*ENG* és

ACVRL1) génekben sikerült az okozati mutációt azonosítani, továbbá a mutáció azonosításának prognosztikai szempontból is jelentősége van.

Populációs kontroll személyek

A magyar általános népességre reprezentatív, ún. populációs kontroll személyek DNS mintái a Háziorvosi Morbiditási Adatgyűjtési Program (HMAP)-ból származtak. A minták Hajdú-Bihar, Győr-Moson-Sopron, Szabolcs-Szatmár-Bereg, Zala, Bács-Kiskun és Komárom-Esztergom vármegyei ÁNTSZ intézetek, illetve a csatlakozó háziorvosi praxisok részvételével kerültek begyűjtésre. A DNS mintákat a HHT és AT (ld. később) alapító mutációk vizsgálata során haplotípus analízishez használtuk.

4.1.2 Laboratóriumi vizsgálatok

Rutin hemosztazeológiai és genetikai módszerek

Ezeket a módszereket csak dióhéjban említem, hiszen egyrészt nagy többségük a nagyobb kórházi, vagy klinikai laboratóriumokban elérhető, másrészt elsősorban diagnosztikai és nem tudományos szempontból érdekesek. Haemorrhagias diathesisek kivizsgálása során a vérvétel 0,109 mol/L citrátot tartalmazó vakutainer csövekbe történt. A koaguláció vizsgálatához thrombocyta szegény plazmát (PPP) állítottunk elő, a thrombocyta funkció vizsgálatához pedig thrombocyta dús plazmát (PRP) használtunk. A koaguláció szűrőtesztjeinek és az alvadási faktoroknak egyfázisú alvadási tesztben történő meghatározása BCS koagulométerben Siemens és Labexpert reagensekkel, illetve STA Compact koagulométerben Stago reagensekkel történt. A fibrinogént Clauss módszerrel és immunefelometriás módszerrel határoztuk meg. A FXIII aktivitását ammónia felszabadulás detektálásán, NADPH fogyást 340 nm-en mérő kinetikus tesztben, a FXIII antigén szinteket TECHNOZYM® FXIII Ag, FXIII-A SUB és FXIII-B SUB ELISA-kal mértük (Technoclone). A FX antigén koncentráció meghatározása kereskedelmi forgalomban kapható ELISA-val (Diagnostica Stago) történt. A PFA-100 záródási időt mind kollagén/ADP, mind kollagén/adrenalin patron felhasználásával meghatároztuk (Siemens). A thrombocyta funkció vizsgálata (aggregáció és ATP szekréció) lumiaggregométerben (Chrono-log), kereskedelmi forgalomban kapható agonistákkal (kollagén, ADP, adrenalin, arachidonsav, trombin) történt. A vWD diagnosztikáját a jelenleg érvényes nemzetközi irányelveknek megfelelően végeztük. A vWF:Ag (BC von Willebrand reagent, immunefelometria) és vWF:GPIIbM (vWF aktivitás, Innovance VWF Ac) meghatározásokat Siemens reagensekkel BCS-XP koagulométerben végeztük. A vWF kollagénhez történő kötődésének mértékét a Technoclone Technozym vWF:CBA ELISA kit felhasználásával határoztuk meg. A vWF VIII-as faktorhoz történő kötődésének mértékét, a vWF:FVIIIB paramétert Asserachrom VWF:FVIIIB kit (Diagnostica Stago) felhasználásával mértük. A vWF multimer strukturáját „in-house” immunoblot módszerrel, HRP-konjugált

poliklonális nyúl anti-humán vWF antitesttel (Dako) vizualizáltuk. PRP-ben risztocetin indukálta thrombocytá aggregáció (RIPA) vizsgálatát 0.6 mg/L-1.5 mg/L Helena risztocetinnel (Helena Laboratories) végeztük. A reptilázidőt Stago reagenssel ST4 mechanikus koagulométerben detektáltuk.

Perifériás fehérvérsejtekből DNS-t izoláltunk QIAamp DNA Blood Mini Kit-tel (Qiagen). Röviden, a *F5* 25 exonjának, a *F10* 8 exonjának, és a *F13A1* exonjainak, az exon-inton határoknak és a promoter régió amplifikálását követően a Sanger szekvenálás ABI PRISM 3700-Avant Genetic Analyzer-n (Applied Biosystems), az értékelés Sequencing Analysis szoftver különböző verzióival (Thermo Fisher Scientific) történt. A HHT diagnosztika során az *ENG*, *ACVRL1* és *SMAD4* géneket kezdetben szintén fluoreszcens direkt szekvenálással analizáltuk. Később e gének vizsgálatát beépítettük a „HHT-vWD-fibrinogén rendellenességek” NGS panelbe és 2019 óta e betegeket már az újonnan bevezetett módszerrel vizsgáljuk (lásd később). Az új mutációk esetében valós idejű PCR-t, FRET detektálást követő olvadáspont-görbe analízis módszerek beállítása történt (LightCycler, Roche) annak érdekében, hogy a mutáció patogenitásának egyik bizonyítékeként legalább 100, homosztázis szempontjából egészséges személy DNS mintáján igazoljuk az adott, feltételezeten kóros mutáció hiányát.

Speciális genetikai vizsgálatok

A FXIII-A mRNS analízise során Tempus Blood RNS csövekbe (Applied Biosystems) levett vérmintákból az RNS izolálást Tempus 12-port RNA Isolation kit használatával végeztük. A teljes RNS reverz transzkripciója First Strand cDNA Synthesis Kit-tel történt. A valós idejű PCR reakciókat SYBR Green I Master (Roche) mixszel végeztük LightCycler 480 készülékben. A FXIII-A génexpressziót a foszfoglicerát-kináz 1 (PGK-1) expressziós szintjére normalizáltuk. A relatív genomi expresszió számításához a $2^{-\Delta\Delta Cq}$ módszert használtuk.

Az *ACVRL1* c.625+1 G>C eltérés alapító hatásának igazolására 3 SNP-t és 5 STR (Short tandem repeat) markert vizsgáltunk 50 kontroll személy DNS mintáján, valamint a mutációt hordozó érintett személyek és családtagjaik (n=34 családtag) mintáin.

Új generációs panel szekvenálást állítottunk be haemorrhagias diathesisekben. A panel a következő géneket tartalmazta: *ACVRL1*, *ENG*, *SMAD4*, *GDF2*, *RASAI*, *F5*, *F8*, *FGA*, *FGB*, *FGG*, *KLKB1*, *ADAMTS13*, *GP1BA* és *VWF* (ROI size: 48,149 bp). A MiSeq rendszert (MiSeq Reagent kit v2 300 cycles, Illumina) használtuk szekvenáláshoz. Az adatok elemzését NextGene software (SoftGenetics, State College) használatával végeztük. A lehetséges patogén mutációkat Sanger szekvenálással validáltuk.

A mutációk leírása a Human Genome Variation Society ajánlása alapján történt. Az új mutációk patogenitásának vizsgálata Mutation Taster PolyPhen2,

MutPred2 és SIFT predikciós algoritmusokkal történt. A mutációk klasszifikációja az American College of Medical Genetics and Genomics útmutatása alapján történt.

Speciális, in-house hemosztázis laboratóriumi módszerek

A FV antigén szint meghatározására ELISA tesztet dolgoztunk ki, két, poliklonális birka anti-humán FV antitestet felhasználva (Affinity Biologicals). A FV és FXIII esetében thrombocytá lizátumból is megtörténtek az adott alvadási faktor aktivitás, illetve antigén koncentráció meghatározások. A mosott thrombocytá szuszpenziók thrombocytá számát a végleges szuszpenzióban 1000 G/L-re állítottuk be, a vérlemezkék lizálása Triton X-100 hozzáadásával történt. A vérlemezkékből történő FV és FXIII antigén szint meghatározás hasonlóan zajlott, mint plazma minták esetén. A kapott eredmények értékelése és a referencia görbe felvétele egészséges egyénektől nyert thrombocyták lizátumával történt.

Biokémiai vizsgálatok mutáns fehérjéken

A vad típusú FX cDNS-t tartalmazó expressziós vektorból (FX-pCMV4) helyspecifikus mutagenézissel (QuickChange site-directed mutagenesis kit, Stratagene) megtörtént a mutáns (c.730G>A) cDNS előállítás. A vad típusú és mutáns cDNS Epicurian coli XL-1-Blue szuperkompetens sejtekbe történő transzformációját, majd plazmid preparálást (Qiagen Plasmid kit) követően a vad típusú és mutáns plazmidok transziens transzfektálása történt humán embrionális vese (HEK) 293 sejtekbe (Effectene transfection reagent, Qiagen). A tápfolyadék K-vitamint is tartalmazott. Inkubációt követően a tápfolyadékokat összegyűjtöttük, a sejtek egy részét fixáltuk konfokális lézer szkennning mikroszkópia (CLSM) kísérletekhez (ld. később), a sejtek másik részét lizáltuk detergenset és proteináz gátlókat tartalmazó pufferben. E minták szolgáltak kiindulásként az in vitro biokémiai vizsgálatainkhoz:

- A vad típusú és a mutáns FX-et tartalmazó tápfolyadékok és sejtizátumok FX koncentrációjának meghatározása ELISA-val, immunprecipitációja biotinált kecske anti-humán FX antitesttel (Haematologic Technologies) és streptavidin-agarózzal, az immunprecipitált mintákon Western-blot nyúl anti-humán FX antitesttel (Dako), kemilumineszcens detektálással.
- A vad típusú és mutáns FX fehérjék sorsának követése pulse-chase analízissel [³⁵S]metionin (Amersham) alkalmazásával.
- A mutáns FX intracelluláris elhelyezkedésének vizsgálata kettős immunofluoreszcens jelöléssel, CLSM analízissel. A FX jelölése kecske anti-humán faktor X antitesttel (Haematologic Technologies), biotinált anti-kecske IgG (Vector) és Texas Red Streptavidin (Vector) segítségével történt. Az endoplazmatikus retikulum jelölése egér monoklonális anti-kalnexin antitesttel (Abcam) és fluoreszceinnel jelölt ló anti-egér IgG-vel (Vector) történt. A cisz-Golgi festése nyúl anti-mannozidáz II antitesttel (Abcam) és fluoreszcein-jelölt kecske anti-nyúl IgG-vel

(Vector) történt. A transz-Golgi, késői endoszóma jelölése egér monoklonális anti-mannóz 6-foszfát receptor antitesttel (Abcam) és fluoreszcein-jelölt ló anti-egér IgG-vel (Vector) történt.

***In silico* analízisek**

A FV esetében a mutáció szerkezetes következményeinek feltárására állandó részecskeszám, nyomás és hőmérséklet mellett, rövid molekuladinamikai szimuláció történt. A szimulációt OPLS-AA („optimized potentials for liquid simulations- all atoms”) erőter, TIP3P explicit vízmodell és periodikus határfeltétel alkalmazásával végeztük. A nagy hatótávolságú elektrosztatikus kölcsönhatás számolása PME (Particle Mesh Ewald) közelítéssel történt. A FX esetében a szimulációkat a (des1-45) egyláncú FX szerkezetben végeztük el. Energia minimalizációt követően a vad típusú és mutáns szerkezetben molekuladinamikai szimulációt hajtottunk végre a FV mutáció analíziséhez hasonló módon, OPLS-AA erőteret alkalmazva, TIP4P explicit vízmodell és periodikus határfeltétel mellett. A szimulációkat a Gromacs programcsomaggal végeztük, az eredmények vizualizálására a VMD (Visual Molecular Dynamics) programcsomagot használtuk. Az in silico analíziseket a FV és FX mutációk esetében néhai Komáromi István kollégám végezte.

4.2 Vizsgálatok ritka thrombophiliákban

4.2.1 Betegek

Antitrombin deficiencia; alapító hatás igazolására és klinikai-laboratóriumi jellemzésére toborzott betegek

Az AT deficienciákkal kapcsolatos kutatásaink 17 éves múltra nyúlnak vissza, AT deficiencia adatbázisunk jelenleg több mint 500 beteg klinikai, laboratóriumi adatait tartalmazza, ami e ritka betegségben nemzetközi vonatkozásban is kiemelkedően magas elemszámot jelent. A tézisekben csak azokat a betegeket említtem, melyek a megalapozó közleményekben szerepelnek.

Az AT deficiens betegcsoportba thromboembolián és/vagy terhességi thromboticus komplikáción átesett olyan betegek kerültek beválogatásra, akiknél legalább két alkalommal igazoltunk csökkent heparin-kofaktor-anti-FXa (hc-anti-FXa) AT aktivitást. 2007-2016 között 156 egymással nem rokon AT deficiens egyén és családtagjaik (összesen 246 személy) kerültek bevonásra. A demográfiai adatokon túl, a thrombosis típusa, a thrombosisok veleszületett (pl. vascularis anomáliák, öröklött thrombophiliák), szerzett kockázati tényezői, illetve provokáló tényezői kerültek bevitelre. Regisztráltuk a thrombosisok számát, a betegek életkorát az első thrombosis idején, a tüdőembólia kialakulását, az artériás esemény típusát, a terhességi komplikáció típusát (vetélés, koraszülés, halvaszülés, thrombosis a terhesség alatt). A laboratóriumi adatok az AT aktivitását (többféle módszerrel mérve, ld. később), AT antigén koncentrációját, a FVL és FII 20210A polimorfizmusok

jelenlétét, a fibrinogén és protein C és S szinteket tartalmazták. Végül a *SERPINC1* génben detektált mutáció is rögzítésre került, illetve megjelöltük a mutáció negatív eseteket. Elkülönítettük az index személyeket és a családtagok esetében a rokonsági kapcsolatokat egyértelműen megjelöltük.

Az AT Budapest 3 (ATBp3, p.Leu131Phe) mutáció alapító hatásának vizsgálatát a fenti AT deficiens betegek közül n=102 ATBp3 mutációt hordozó személyen (n=63 index beteg és n=39 érintett családtag) végeztük el. A magyar általános népeiségre reprezentatív, ún. populációs kontroll személyek DNS mintái a Háziorvosi Morbiditási Adatgyűjtési Program (HMAP)-ból származtak.

Az AT deficiencia diagnosztikájának elsővonalbeli funkcionális tesztje, azaz a heparin jelenlétében végzett amidolitikus teszt teljesítőképességének vizsgálatát fenti AT deficiens betegek közül először n=37 esetben végeztük el, ekkor a trombin-alapú tesztet hasonlítottuk össze a FXa-alapú teszttel. Ezt követően, a munkacsoportunk által kidolgozott FXa-alapú, heparin kofaktor és progresszív AT aktivitás meghatározására egyaránt alkalmas funkcionális amidolitikus esszét (részleteiben ld. később n=78 AT deficiens személy plazma mintáin teszteltük. A vizsgálatba olyan személyek mintái kerültek, ahol az AT deficiencia pontos típusa is ismert volt. Saját módszerünkkel és egyéb kereskedelmi forgalomban lévő módszerekkel végeztünk széleskörűbb összehasonlítást az AT deficiencia – különös tekintettel a IIHBS típus – különböző típusaiban az egyes tesztek teljesítőképességeire vonatkozóan. E vizsgálatokat összesen legalább 150 AT deficiens személy plazma mintáján elvégeztük.

Antitrombin deficiencia; alapító hatás korának és eredetének meghatározása

Az ATBp3 mutáció korának haplotípus elemzést követő statisztikai módszerekkel történő meghatározása n=36, egymással nem rokon, mutációhordozó személy és n=70 családtag (összesen n=106) mintáin történt. Egy n=1000 főből álló, a magyarországi általános populációt reprezentáló csoport DNS mintái a Háziorvosi Morbiditási Adatgyűjtési Program (HMAP)-ból származtak. Egy másik, n=1185 főből álló és a magyarországi általános roma populációt reprezentáló személyek DNS mintái a Népegészségügyi Iskola kutatóinak jóvoltából szintén rendelkezésünkre álltak. E két mintát tekintettük populáció szintű referencia mintáknak. Megerősítő epidemiológiai vizsgálatunkhoz n=450 cardiovascularis betegségekben nem szenvedő, magát egészségesnek valló személy toborzásával ún. egészséges magyarországi referencia csoportot képeztünk. Esetükben egyedül enyhe/közepes hypertonia volt megengedett, minden más krónikus betegség kizárási kritérium volt. Roma személyek (n=402) mintái képezték a megerősítő vizsgálat roma általános populációt reprezentáló mintáit, ahol a mintagyűjtés az eredeti, nagy roma populáció toborzásának helyszínével megegyezett.

Antitrombin deficiencia; a IIHBS típus és a kardiovasculáris betegségek összefüggésének vizsgálata

A IIHBS AT deficiencia és a különböző thromboticus események közötti összefüggések tanulmányozására különböző betegcsoportokat képeztünk. Egyrészt, n=243 egymással nem rokon, IIHBS AT deficienciában szenvedő beteget, valamint érintett családtagjaikat (összesen n=328) toboroztunk 2007-2020 között. A beválogatás kritériumai az adekvát módszerrel meghatározott (ld. később) heparin kofaktor AT aktivitás (hc-anti-FXa) referencia tartomány alsó határa alatti értéke és a IIHBS deficiencia genetikai vizsgálattal történő igazolása voltak. E betegek klinikai-laboratóriumi-genetikai adatai az AT deficiencia adatbázisba is bevitelre kerültek.

Második csoportot a fiatal korban (40 éves kor alatt) ST-elevációs myocardialis infarctust (MI) elszenvedett személyek képezték (n=119). Az életkor megválasztását az indokolta, hogy ebben a betegcsoportban, ahol az okklúzív artériás érbetegség prevalenciája még alacsony, nagyobb jelentősége lehet a hemosztázis tényezők rendellenességeinek, mint idősebb korban, így különösen érdekesnek találtuk azt megvizsgálni, hogy az egyébként ritka, veleszületett AT deficiencia, ami elsődlegesen a vénás thrombosisok kockázati tényezője, előfordul-e és ha igen, milyen arányban e betegekben. Korban illesztett klinikai kontroll csoportot is képeztünk (n=101), akik szívkatéterezésem estek át, de coronaria betegség nem igazolódott.

Végül, a harmadik beteg csoportot egymással nem rokon, vénás thrombosis 40 éves kor előtt elszenvedett személyek alkották (n=110, medián életkor 31 év, férfi/nő arány 52%/48%).

Antitrombin deficiencia; az ATBp3 homozigóta állapot és a vena cava inferior atresia együttes előfordulásának vizsgálata

Ezt a tanulmányt spanyol kollaborációban végeztük és összesen n=61, ATBp3 homozigóta személyt válogattunk be. A tanulmány végzésének idején a két munkacsoport által összesen n=640 (érintett családtagokkal együtt n=1118) AT deficiens személy klinikai-laboratóriumi-genetikai adata állt rendelkezésre. Az AT deficiens betegek közül az ATBp3 homozigótákat célzottan felkerestük e tanulmány kedvéért és azokat, akik beleegyezésüket adták a hasi CT vizsgálat elvégzésébe, vagy hozzájárultak ahhoz, hogy korábbi leletüket vascularis malformatio szempontjából elemezzük, beválogattuk a tanulmányba.

Antitrombin deficiencia; az új, AT Debrecen és kilenc további új mutáció karakterizálása

Egy nagy, négy generációs családban diagnosztizáltunk AT deficienciát, melynek háttérben új mutációt igazoltunk (p.Leu205Pro, ld. később). Összesen n=31 családtagot értünk el, közülük n=20 esetében diagnosztizáltuk AT deficiencia

jelenlétét. A 2016 utáni periódusban továbbá, bár a diagnosztizált AT deficiens betegek többsége az alapító hatású ATBp3 (p.Leu131Phe) mutációt hordozta, találtunk kilenc új, illetve korábban nem karakterizált *SERPINC1* mutációt is, melyek az irodalomban eddig nem szerepeltek (összesen n=15 beteg, ld. később).

Protein C deficiencia

A PC deficiencia diagnosztikája során két betegnél detektált új mutációk biokémiai karakterizálását végeztük el. Az első beteg 36. gesztációs hétre, császármetszéssel született leány újszülött, akinek súlyos cyanosisát és mindkét láb duzzanatát észlelték, a második életnapon purpura fulminans jelent meg. A súlyos PC deficiencia diagnózisát 24 órán belül felállítottuk, de az adekvát terápia ellenére a beteg exitált. A beteg szülei nem voltak rokonok, thromboticus események nem voltak anamnesisükben, az apa 25, az anya 23 éves volt a vizsgálataink idején. A proband fiú testvére (5 éves fiú) szintén tünetmentes volt eddig. A másik vizsgált beteg egy 50 éves nő, akinek terhessége idején (akkor 27 éves volt) bal oldali v. femoralis thrombosisa volt. Mivel a családban több thrombosison átesett beteg is volt (ők nem voltak elérhetőek a vizsgálat idején), felmerült veleszületett thrombophilia lehetősége. A betegnél 42 éves korában FV Leiden heterozigóta állapotot (APC rezisztencia), és PC deficienciát igazoltunk.

4.2.2 A ritka thrombophiliák laboratóriumi vizsgálata

Rutin laboratóriumi és hemosztazeológiai módszerek

A betegektől vénás vérvétel történt 0,109 M citrátos vakutainer csövekbe, valamint natív vérvételi csövekbe. A vérvételek időpontját úgy választottuk meg, hogy az akut fázis reakció lecsengése után legalább 3 hó elteltével történtek. A koaguláció szűrőtesztjeinek és a fibrinogén szintnek a meghatározása rutin módszerekkel történt Siemens BCS-XP koagulométerben. A protein C és S aktivitásának meghatározása alvadásiidő alapú tesztekben Siemens reagensekkel történt (Siemens Protein C clotting és Protein S Ac). Az APC rezisztencia funkcionális tesztjét Werfen HemosIL Factor V Leiden reagenssel ACL-TOP koagulométerben végeztük el. A rutin diagnosztika során az AT aktivitását heparin kofaktor, FXa-alapú kromogén tesztben, a Siemens Innovance AT reagensével végeztük, de az AT aktivitásának meghatározására szolgáló módszerek evaluációja kapcsán a Siemens Berichrom AT és a Werfen HemosIL AT reagensét is használtuk. Az AT antigén szintjét immunnefelometriával (Siemens Nephelometric AT) BN ProSpec II nefelométerben mértük. A PC aktivitás kromogén módszerrel történő meghatározását is elvégeztük bizonyos esetekben (ld. később az in vitro expresszált vad típusú és mutáns protein C vizsgálatánál), ezt Siemens Berichrom PC reagenssel mértük, valamint elvégeztük a PC aktivitás meghatározást alvadási tesztben is e rekombináns fehérjék esetében, ezt Staclot PC (Diagnostica Stago) reagenssel tettük. A PC antigén szint meghatározása

ELISA módszerrel (Diagnostic Stago, Asserachrom Protein C) történt. A szabad Protein S antigén koncentrációt Siemens Innovance free PS reagenssel mértük.

Az antitrombin aktivitásának meghatározására szolgáló, munkacsoportunk által kidolgozott módszerek

Munkacsoportunk kidolgozott egy FXa gátlásán alapuló amidolitikus tesztet az AT aktivitásának meghatározására, mely alkalmas a heparin kofaktor AT aktivitás (hc-anti-FXa) és – kis módosításokkal – a progresszív AT aktivitás (p-anti-FXa) mérésére is és automata koagulométerekre adaptálható. A hc-anti-FXa tesztben a vizsgálandó plazmát 1:50 arányban hígítjuk, 1000 U/L heparin jelenlétében bovin eredetű tisztított FXa-t és BIOPHEN CS-11 kromogén szubsztrátot alkalmazunk. A p-anti-FXa teszt főbb komponensei és körülményei megegyeznek a hc-anti-FXa tesztünkkel, azzal a különbséggel, hogy a tesztrendszer nem tartalmaz heparint, helyette a mintahígító pufferbe heparin neutralizáló polibrént tettünk, a vizsgálandó minta előhígítása csupán 5-szörös, valamint a FXa-val történő inkubációs idő hosszabb.

A módszereink evaluációja során a HemosIL Normal Control és Low Abnormal Control (Werfen) plazmákat használtuk a mérések pontosságának meghatározására, amit a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP15-A2 előírásai szerint végeztünk.

Rutin genetikai vizsgálatok az antitrombin és Protein C deficienciák diagnosztikájában

A DNS izolálás a citrátos vérminták buffy coat tartalmából történt QIAamp DNA Blood Mini kit-tel (Qiagen), kivéve a referencia populációk esetében, ahol a nagy mintaszámra tekintettel MagNA Pure LC DNA isolation Kit-Large Volume módszerrel izoláltuk a DNS-t (Roche). A *SERPINC1* (az AT génje) és a *PROC* (a PC génje) mutációanalízise direkt fluoreszcens szekvenálással történt ABI3130 genetikai analízátoron (Thermo Fisher Scientific), a szekvencia elemzés a Sequencing Analysis 5.4 szoftverrel történt. A Sanger szekvenálással negatív esetekben MLPA vizsgálatot végeztünk (MRC-Holland) SALSA MLPA KIT P227 segítségével. Itt az analízis a GeneMapper 4.1 szoftverrel történt (Thermo Fisher Scientific). A mutációk nevezékτανával és a predikciós analízisekkel kapcsolatos elvek és módszerek megegyeztek a vérzékenységek vizsgálatánál leírtakkal.

Speciális genetikai vizsgálatok antitrombin deficienciában

Az ATBp3 mutáció alapító hatásának vizsgálatához 7 SNP-t (rs677, rs1799876, rs2227596, rs941989, rs2227612, rs5877 és rs5878) vizsgáltunk valós idejű PCR-t követő olvadáspont görbe analízissel, illetve Sanger szekvenálással, valamint elvégeztük a *SERPINC1* gén kezdőkodonja előtt 345 bázispárra elhelyezkedő, egy 32 és/vagy 108 bázispárból álló nem homológ szekvencia, ún. 5' hossz polimorfizmus (5'LP, rs3138521) vizsgálatát is PCR-t követő agaróz gél elektroforézissel. Ezek

mellett öt rövid tandem ismétlődő szekvencia (short tandem repeats, STR) analízisét is elvégeztük (*SERPINC1* Alu5 és Alu8, D1S196, D1S218 és a *F13A1*, utóbbi negatív kontrollként szerepelt) ABI3130 genetikai analizátoron (Life Technologies), az STR fragmentumok analízise a GeneMapper v4.1 szoftver (Life Technologies) segítségével valósult meg.

A mutáció korának meghatározásához 36, egymással nem rokon személy és családtagjaik genomi DNS mintáit használtuk és nyolc STR markert vizsgáltunk: D1S212 (4,92 Δ cM), D1S2659 (3,27 Δ cM), D1S218 (0,73 Δ cM), D1S2790 (1 Δ cM), D1S1165 (2,43 Δ cM), D1S2815 (2,53 Δ cM), D1S196 (7,35 Δ cM) és D1S460 (54,8 Δ cM). A markerek távolságait Δ cM egységekben az ATBp3 mutáció helyétől számítottuk. A markerek detektálása fentiekhez hasonlóan, PCR-t követő kapilláris elektroforézissel történt ABI3130 genetikai analizátoron és GeneMapper v4.1 szoftverrel értékeltük ki. E markereket teszteltük n=200 kontroll személyen (a hazai referencia populációból kiválasztva), illetve n=94 roma személyen (a hazai roma referencia populációból kiválasztva).

Vad típusú és mutáns antitrombin variánsok, illetve protein C variánsok in vitro expressziója

A vad típusú AT-nak megfelelő cDNS-t tartalmazó vektort (ORF-NM_000488_pcDNA3.1(+)), a mutáns c.T614C (a p.Leu205Pro mutációnak megfelelő) valamint a vad típusú (ORF-NM_000312_pcDNA3.1(+)) és a mutáns (c.A230G, c.C488A, c.C488T) protein C-nek megfelelő vektorokat az ImaGenes cégtől szereztük be, OneShot TOP10 kémiai kompetens E.coli sejtekbe transzformáltuk és QIAprep Spin Miniprep kit segítségével (Qiagen) tisztítottuk. Az ATBp3, AT Basel, AT Padua, illetve a kilenc új *SERPINC1* mutációt (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr, p.Pro461Thr) hordozó plazmidokat QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) kittel, helyspecifikus mutagenézissel állítottuk elő.

Az AT Debrecen (p.Leu205Pro), a kilenc új *SERPINC1*, valamint a PC mutációk biokémiai következményeinek vizsgálatához tranziens transzfekciót végeztünk HEK293 sejtekben, a PC esetében a tápfolyadék K-vitamint is tartalmazott. A vad típusú és p.Leu205Pro AT-nak megfelelő plazmid transzfekcióját XtremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche), a vad típusú és mutáns PC plazmidok transzfektálását FuGENE HD (Roche) kit segítségével végeztük. A lacZ gén kotranszfekcióját szintén elvégeztük, annak érdekében, hogy a transzfekció határfokát később a β -galaktozidáz aktivitás alapján ellenőrizhessük és kvantifikálhassuk.

Negyvennyolc-ötven óra inkubáció után a tápfolyadékokat összegyűjtöttük, a sejtek egy részét immunfestésre és CLSM vizsgálatokra (vad típusú AT és PC, AT

Debrecen és a három mutáns PC esetében) félretettük, másik részét lizáltuk. A transzfekció határfokát FluoReporterRlacZ/Galactosidase Quantification Kit-tel (Molecular Probes, Life Technologies) ellenőriztük és regisztráltuk. A vad típusú AT, illetve az ATBp3, AT Basel és AT Padua esetében, valamint a p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro és p.Pro461Thr mutánsok esetében stabil transzfekciót végeztünk HEK293 sejtekben Lipofectamine 3000 Transfection Kit-tel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Geneticin antibiotikumot (Gibco) használtunk szelekciós ágensként.

Speciális hemosztázis laboratóriumi módszerek és biokémiai vizsgálatok antitrombin és protein C deficienciában

A vad típusú és p.Leu205Pro AT-t, valamint a kilenc új AT mutánst expresszálok HEK293 sejtek lizátumában és tápfolyadékában meghatároztuk az AT koncentrációt ELISA módszerrel (AssayMax Human Antithrombin III ELISA kit, ill. Abcam Human-Antithrombin-III-ELISA-Kit). A sejtek tápfolyadékában meghatároztuk az AT amidolitikus aktivitását heparin jelenlétében és hiányában LX Antithrombin H+P reagenssel (Labexpert) mikrotitráló lemezben. A tesztben kisebb módosításokat hajtottunk végre, hogy alkalmazkodjunk a humán plazmától eltérő körülményekhez. Az AT antigén és aktivitás meghatározásokat legalább három független kísérletből elvégeztük, az AT antigént mg/mL-ben, az aktivitást U/mL-ben fejeztük ki, majd kiszámítottuk a specifikus aktivitást és kifejeztük U/mg-ban.

Az in vitro expresszált vad típusú, az AT Debrecen (p.Leu205Pro AT-t) és a kilenc új AT mutánst a HEK293 sejtek lizátumából és tápfolyadékából Western-blottal is vizsgáltuk. Az SDS-PAGE nem redukáló körülmények között történt. Az AT-t kecske anti-humán AT antitesttel detektáltuk (Affinity Biologicals), másodlagos antitestnek biotinált, nyúlban termeltetett anti-kecske IgG-t használtunk. Az immunreakciót Vectastain Elite ABC kit-tel erősítettük (Vector Laboratories) és DAB-bal (3,3'-diaminobenzidin) vizualizáltuk (Invitrogen). A kilenc új mutánsnál az immunreakciót ECL technikával váltottuk ki a gyártó utasításait követve (Thermo Fisher Scientific). A kemilumineszcens detektálás C300 Azure készülékkel történt (Azure Biosystems). A Western-blottot N-glikozidáz F emésztést követően is elvégeztük a vad típusú és a p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr mutáns antitrombin fehérjék esetében.

A vad típusú, a IIHBS mutáns antitrombinok és a kilenc új AT mutáns közül azokat, melyeket később SPR módszerrel is vizsgáltunk (p.Arg78Gly és p.Pro461Thr, ld. később) tisztítása a stabilan transzfektált HEK293 sejtek koncentrált tápfolyadékából, illetve normál személyek és ATBp3 homozigóta betegek plazmájából affinitás kromatográfiával történt kecske anti-humán antitrombin IgG (Affinity Biologicals) felhasználásával. E mintákban keresztezett

immuelektroforézist végeztünk nem frakcionált Na-heparin és nyúl anti-humán antitrombin antiszérum (Sigma) jelenlétében.

A vad típusú és IIHBS mutáns antitrombinok, valamint a p.Arg78Gly és p.Pro461Thr mutánsok heparinhoz történő kötődésének vizsgálata felszíni plazmon rezonancia (SPR) módszerrel történt Biacore 3000 készüléken (GE Healthcare). Ehhez heparinnal fedett szenzor chip-et használtunk, a szenzorgramokból asszociációs-disszociációs ráta konstansokat (k_a és k_d), valamint egyensúlyi asszociációs és disszociációs konstansokat (K_A és K_D) számítottunk BIAevaluation szoftver (GE Healthcare) segítségével.

NanoDSF (differential scanning fluorimetry) módszerrel vizsgáltuk a vad típusú AT és az ATBp3 hőstabilitását Prometheus NT48 készülékben (NanoTemper Technologies). A T_m és T_{onset} értékeket PR ThermControl v2.1.2 szoftverrel határoztuk meg.

Az in vitro expresszált vad típusú és mutáns PC antigén koncentrációját ELISA (Asserachrom PC:Ag, Diagnostica Stago) módszerrel, az aktivitását alvadási (Staclot PC, Diagnostica Stago) és amidolitikus (Berichrom PC, Siemens) tesztekben, mikrotitráló lemezekben fotométerben detektálva, illetve KC4 koagulométerben mértük. A PC mutánsok és a vad típusú PC vizualizációjára SDS-PAGE-t végeztünk nem redukáló körülmények között. A PC-t birka anti-humán PC antitesttel (Haematologic Technologies) detektáltuk, az immunreakciót anti-birka immunglobulint tartalmazó Vectastain Elite ABC kit-tel (Vector Laboratories) viteleztük ki és 3,3'-diaminobenzidin (DAB) (Invitrogen) segítségével tettük láthatóvá. A Western-blottot elvégeztük a sejt-lizátumokban és a felülúszókban egyaránt.

A poliubikvitinált PC arányának meghatározását a transzfektált sejtek lizátumában ELISA módszerrel végeztük, melyben a PC-t a mikrotiter lemezhez kötött poliklonális anti-PC antitesttel (Diagnostica Stago) fogtuk ki, a poliubikvitint torna peroxidázzal konjugált anti-poliubikvitin monoklonális antitesttel (CycLex Co. Ltd.) detektáltuk. A mutáns fehérjék poliubikvitináltságát az OD értékek PC antigén szintre történő normalizálása után határoztuk meg minden sejt-lizátumban és a mutáns:vad típusú poliubikvitinált PC arányaként adtuk meg.

A vad típusú és mutáns antitrombin és protein C intracelluláris megjelenésének vizsgálata immunfestéssel és konfokális lézer szkennig mikroszkópiával

Az intracelluláris AT és PC lokalizációjára immunfestést követő konfokális lézer szkennig mikroszkópiát (CLSM) végeztünk. Az AT jelölésére kecske anti-humán AT antitestet (Affinity Biologicals) használtunk, második antitestként pedig FITC-konjugált anti-kecske IgG-t alkalmaztunk (Vector). A PC esetében nyúl anti-humán PC antitestet (Sigma-Aldrich) és DyLight 488-al jelölt második antitestet (kecskében termeltetett anti-nyúl IgG, Vector) használtunk. Az AT és PC festéseket

endoplazmatikus retikulum (ER), cisz-Golgi (CG), transz-Golgi (TG) vagy 26S proteasóma markerre történő festéssel kombináltuk kettős immunfestéses reakciókban. A mintákat konfokális lézer szkennig mikroszkóppal vizsgáltuk (LSM 700, Zeiss). A fluoreszcens jelek kolokalizációját a képpárokban ZEN 2010 képpalkotó szoftverrel (Carl Zeiss Microscopy) és Protein Proximity Analyser (PPA) szoftverrel vizsgáltuk. Manuális küszöbcsökkentést követően a kolokalizációt Manders szerint is jellemeztük az M1 és M2 kolokalizációs koefficiensek megadásával a ZEN 2010 szoftverrel.

In silico vizsgálatok antitrombin és protein C deficienciában

A PC és AT mutációk szerkezet-stabilitásra gyakorolt hatását molekuladinamikai szimulációkkal tanulmányoztuk Gromacs szoftvercsomaggal. A szimulációk során OPLS-AA erőteret alkalmaztunk. A rövid hatótávolságú elektrosztatikus és van der Waals energiátágok kiszámításakor 10 Angströmös „cut-off” távolságot állítottunk be, míg a nagy hatótávolságú elektrosztatikus energia korrekciókat a részecskehálós Ewald (Particle-Mesh-Ewald, PME) módszer segítségével vettük figyelembe. A fehérjeszerkezet megjelenítéséhez a VMD és Chimera 1.7 programokat vettük igénybe.

A IIHBS AT deficienciák összehasonlító vizsgálatait megalapozó in silico tanulmányunk során vizsgáltuk a nagy affinitású pentaszacharid és az AT kölcsönhatását új módszertan (GAMD) segítségével, ami javított mintavételezést tesz lehetővé előre definiált reakciókoordináták megadása nélkül és pontosabb energiaszámítást érhetünk el vele. A IIHBS típusú AT deficienciával járó mutációk (ATBp3, AT Basel, AT Padua) AT-pentaszacharid kötésre, illetve az AT molekula szerkezetére gyakorolt hatásait kétféle modellrendszerben tanulmányoztuk (nem aktivált AT állapotot reprezentáló, pentaszacharidot nem tartalmazó modell és a pentaszachariddal kapcsolódott, aktivált AT állapotot reprezentáló modell). Mindkét állapotnak megfelelően felépítettük a vad típusú és a három mutáns AT szerkezetet. A rendszert vízmolekulákkal szolvatáltuk, melyeket a CHARMM erőter módosított TIP3P vízmodelljével vettünk figyelembe. A molekuladinamikai szimulációkhoz és a GAMD szimulációhoz az AMBER16 szoftvercsomag pmemd.cuda programját használtuk. A 12 Å-nél távolabb elhelyezkedő atomok közötti elektrosztatikus kölcsönhatásokat a PME módszer segítségével vettük figyelembe. A „produkción” szimulációk 600 ns hosszúságúak voltak. A szimulációk eredményének kiértékelése CPPTRAJ programmal történt.

Statisztikai módszerek

A populáció szintű vizsgálatok során standard statisztikai módszereket alkalmaztunk, a 0,05 vagy annál kisebb p-értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A statisztikai analíziseket a Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 22.0; Chicago, IL, USA) szoftverrel végeztük el.

Az ATBp3 mutáció korának meghatározásához LD (linkage disequilibrium) index értékeket kalkuláltunk az említett STR markerek alapján, a genetikai távolságot az egyes STR markerek és a *SERPINC1* gén közötti fizikai távolságból számítottuk. Az ATBp3 korát parametrikus és Bayes-féle módszertannal is számítottuk.

5 EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

Az eredmények ismertetése során – tekintettel a betegségek és kapcsolódó vizsgálatok széles spektrumára – a könnyebb követhetőség érdekében az adott témakörre vonatkozóan a diszkussziót az eredményekkel összevonva tárgyaljuk.

5.1 Vizsgálatok haemorrhagias diathesisekben

5.1.1 XIII-as faktor deficiencia

Rutin és speciális diagnosztika, a XIII-as faktor deficiencia kivizsgálásának irányelvei

Mindkét beteg esetében a normál koaguláció szűrőteszt eredmények ellenére fennálló, klinikailag jelentős vérzékenység hívta fel a figyelmet a ritka FXIII deficiencia lehetőségére. A detektálhatatlanul alacsony plazma FXIII aktivitás vetette fel a FXIII deficiencia diagnózisát, majd a detektálási határ alatti FXIII-A2B2 és FXIII-A antigén koncentrációk, és a 63%, ill. 30% -os FXIII-B antigén szintek együtt FXIII-A alegység deficienciát igazoltak. A thrombocytákban szintén detektálhatatlanul alacsony FXIII aktivitás és FXIII-A alegység antigén szint kizárta autoantitest jelenlétének lehetőségét. A molekuláris genetikai diagnosztika során a Proband1 összetett heterozigótának bizonyult a p.Arg326Gln és a IVS8 c.1112+2T>C mutációkra. A p.Arg326Gln mutáció ismert patogén eltérés, a másik mutáció (IVS8 c.1112+2T>C) „splicing”-hely defektust feltételez. A Proband2 esetében egy adenin homozigóta delécióját igazoltuk a 70-74. kodonokban, a 71. pozícióban megjelenő három új aminosavat követően a fehérjeszintézis leáll. Ez a mutáció a FXIII-A alegység N-terminálisához nagyon közel lévő β -szendvicsben jelent meg, ami erősen csonkolt fehérje szintéziséhez vezet és magyarázza a kvantitatív FXIII-A deficienciát.

A súlyos klinikai tünetek, a plazmában és a thrombocytákban detektálhatatlan FXIII aktivitás és FXIII-A antigén szint mindkét betegnél összhangban volt a molekuláris defektussal. Tanulmányunkban a korai diagnózis fontosságára is felhívtuk a figyelmet a súlyos klinikai következmények elkerülése érdekében. Az öröklött FXIII hiány klinikumáról és laboratóriumi diagnosztikájáról egy olyan közleményt jelentettük meg, melyben a FXIII meghatározási módszerekkel szerzett tapasztalataink, illetve molekuláris szintű vizsgálataink alapján a FXIII deficienciák kivizsgálásának irányelveit határoztuk meg. Meghatároztuk a FXIII deficiencia laboratóriumi kivizsgálásának algoritmusát, melyben az egyes vizsgálatcsoportok hierarchikus rendben követik egymást. Első és legfontosabb ajánlásunk az, hogy mivel a koaguláció szűrőtesztjeinek normál értékei nem zárják ki a deficiencia lehetőségét, közvetlen szűrőtesztet kell végezni, ami a FXIII aktivitásának meghatározása kell, hogy legyen. Az archaikus urea oldékonysági tesztet ma már nem javasoljuk, mivel ez sem nem specifikus, sem nem kellően érzékeny. A FXIII aktivitását ammónia felszabadulás detektálásán alapuló kromogén

tesztben, vagy amin inkorporációs esszében is mérni lehet, alapvető követelmény, hogy bármelyik tesztet használják, a kalibrációt nemzetközi WHO standardra visszavezethető kalibrációs plazmával kell végezni. Az ammónia felszabadulás detektálásán alapuló teszt esetén a plazma vak mérését javasoljuk, mely reakcióban a FXIII aktivitását jóacetamid hozzáadásával gátoljuk. Ezzel kiküszöbölhető a fals, ammónia felszabadulással járó, illetve NADH konzumpcióval járó, de nem a FXIII által katalizált reakciók által okozott fölmérés, mely különösen az alacsony tartományban jelent diagnosztikus problémát. Az amin inkorporációs esszében pedig tekintetbe kell venni, hogy az ismert és gyakori p.Val34Leu polimorfizmus, az alacsony trombin koncentráció jelenlétében, eltérő FXIII aktivációsebességet eredményező hatása miatt, befolyásolja a teszt eredményét.

Csökkenett FXIII aktivitás esetén második lépésben kerüljön sor a deficiencia karakterizálására, mely lépésben meg kell határozni a FXIII A2B2 komplex antigén koncentrációját a beteg plazmájában, majd csökkent érték esetén a FXIII-A alegység koncentrációját a plazmában és a beteg mosott thrombocytá lizátumában. Emellett a FXIII-B alegység koncentráció meghatározását is javasoljuk a plazmában. E tesztek több kérdést is tisztáznak: egyrészt megállapíthatjuk, hogy A-alegység vagy B-alegység deficienciáról van-e szó, valamint kizárhatjuk szerzett FXIII deficiencia lehetőségét.

5.1.2 V-ös faktor deficiencia

Rutin és speciális diagnosztika

A beteg rutin laboratóriumi vizsgálatai során a különböző intézményekben normál, vagy jelzetten megnyúlt PI és/vagy APTI került leírásra, melyek alapján további vizsgálatok nem történtek, klinikailag jelentős coagulopathia lehetőségét elvetették. Nálunk két független mintavételből a PI a referencia tartományban, vagy annak felső határán volt, az APTI enyhén megnyúlt, vagy a referencia tartomány felső határához közeli érték volt. Gátlótest jelenlétét keveréses vizsgálattal kizártuk. Az egyfázisú alvadási tesztben vizsgálható alvadási faktorok közül a FV aktivitása két független mintavételből is csökkentnek bizonyult (45, ill. 50%, ref. tart. 70-120%). A rutin diagnosztikán túlmenően FV antigén meghatározást végeztünk a plazmában és mosott thrombocytákban, mely során a FV antigén koncentráció a FV aktivitással közel azonos arányban volt csökkent a beteg plazmájában, valamint a thrombocytákban mérhető FV antigén szint is alacsony volt. Mindezek I-es típusú, enyhe, veleszületett FV deficienciára utaltak. A háttérben új, c.1651G>A (p.Gly521Arg, régi nomenklatura szerint p.Gly493Arg) mutációt detektáltunk heterozigóta formában. A mutáció patogenitását indirekt bizonyítékokkal támasztottuk alá. Az egyéb vérzékenységeket szisztematikus vizsgálatokkal kizártuk.

A p.Gly521Arg mutáció strukturális következményei

A mutáció egy erősen hidrofób, zárt zsebben található (491LIG(R)LLLIC498) a FV fehérjén belül. A mutáns arginin a vad típus glicinnel szemben egy nagyobb, erősen poláris, pozitívan töltött aminosav, melynek hatása a régióra molekula dinamikai szimulációval volt vizsgálható. A szimuláció eredménye azt sugallja, hogy az Arg oldallánc nem fér be a Gly kis α H „oldalláncának” fenntartott (hidrofób) üregbe. Poláris guanidinium csoportja deformálja a közeli, szintén nagymértékben konzervált 390ILGPIIRAQVR400 β -redőt és megnyit egy csatornát a (poláris) oldószer környezete felé. Habár a mutáció hatását közvetlenül, in vitro expressziós rendszerben nem vizsgáltuk, a molekulamodell megerősíti, hogy a lokális konformáció változás a régió instabilitásához (H-hidak felbomlása, hidrofób-hidrofób kölcsönhatások megszűnése, beta-redők eltávolodása), végső soron a FV A2 doménjének kóros feltekeredéséhez vezethet, ami végső soron az egész fehérje kóros szerkezeti változását és degradációját okozhatja.

5.1.3 X-es faktor deficiencia

Rutin és speciális diagnosztika

A súlyos vérzékenységben szenvedő gyermeknél a hemosztázis laboratóriumi vizsgálatok során jelentősen megnyúlt PI-t és APTI-t észleltünk normál TI-vel, inhibitor lehetőségét kizártuk. Mérheterlenül alacsony (1%) FX aktivitást és antigén koncentrációt észleltünk (referencia tartomány 70-120%, ill. 70-130%), ami alapján az I-es típusú FX deficiencia diagnózisa felállítható volt. Egy új mutációt találtunk homozigóta formában c.730 G>A (p.Gly244Arg, régi nomenklatura szerint p.Gly204Arg). A mutáció 100, vérzékenységet nem mutató személy DNS-ét vizsgálva, egy esetben sem volt kimutatható.

A p.Gly244Arg mutáció következményeinek vizsgálata in vitro expressziós kísérletekben

A mutáns és vad típusú FX cDNS-t tartalmazó vektorral HEK293 sejteket transzfektáltunk. A sejtek lizátumának és tápfolyadékának ELISA és immunoblotting vizsgálatával megállapítottuk, hogy mind a vad típusú, mind a mutáns FX expresszálódik a HEK293 sejtekben. A FX koncentrációja a mutáns FX cDNS tartalmú vektorral transzfektált sejtek lizátumában 1,5-szerese volt a vad típusú FX-et expresszáló sejtek lizátumából mért koncentrációnak. Ezt megerősítette a kvantitatív fluoreszcens kép analízis is. Ezekkel összhangban az Arg244 FX-et reprezentáló sáv a Western blot-on intenzívebb volt a Gly244 FX-nek megfelelő sávhoz képest. ELISA-val és Western blotton is megállapítottuk, hogy csak a vad típusú FX szekretálódott a mediumba, az Arg244 FX nem volt detektálható a sejtek tápfolyadékában egyik módszerrel sem. A mutáns FX intracelluláris sorsának követésére pulse-chase analízist alkalmaztunk. A követési periódus alatt, a

radioaktívan jelölt vad típusú FX mennyisége gyorsan csökkent a sejtlizátumokban, ezzel párhuzamosan a nehéz és könnyű láncnak megfelelő sávok egyre erősebben jelentek meg a tápfolyadékából vett mintákban. Ezzel ellentétben az Arg244 FX-nek megfelelő sáv intenzitása a sejtekben az első 30 percben erősödött, és csak ezt követően kezdett el gyengülni. A sejtek tápfolyadékában a mutáns FX-et reprezentáló sávok nem jelentek meg. Mindezek azt bizonyítják, hogy az újonnan szintetizálódó vad típusú FX szekrécióra kerül és gyorsan eltűnik a sejtekből, míg a mutáns FX nem képes szekretálódni, felhalmozódik a sejtben, majd eliminálódik. A mutáns FX intracelluláris lokalizációjának meghatározására végzett kettős immunofluoreszcens jelölés és CLSM vizsgálatokban az Arg244 FX a transz-Golgit, késői endoszómát jelölő mannóz-6-foszfát receptorral mutatott kolokalizációt, így feltételeztük, hogy a mutáns FX, letérve a normál fehérjékre jellemző szekretoros útvonalról, a késői endoszóma felé irányítódik és a lizoszómális enzimek által degradálódik.

A p.Gly244Arg mutáció következményeinek vizsgálata in silico kísérletekben

A mutáció egy, a Cys241 és Cys246 között kialakult diszulfid hiddal összekapcsolt kis hurokszerkezet egyik aminosavát (Gly244) érinti. Az „in silico” kísérletek alapján nyilvánvaló volt, hogy a kis, apoláros Gly helyére a nagy térkitöltésű, poláros Arg kerülése lényeges szerkezeti változásokat okoz. A Cys172 és Arg182 közötti régió (mely megfelel a könnyű lánc C-terminálisának és az érés során kivágásra kerülő tripeptidnek (Arg180-Lys181-Arg182) a normáltól eltérő orientációt vesz fel és távolabb kerül a Cys241-Cys246 huroktól. A hurokszerkezet és a Cys172-Arg182 fehérjeszakasz közötti Coulomb interakciós energia vad típusú FX esetén alacsonyabb, mint Arg244 FX esetén (-88.5 kcal/mol vs. -188.6 kcal/mol). Ez azt jelenti, hogy mutáns esetben az interakció jelentősen gyengébb. A Cys172 részt vesz a könnyű és a nehéz lánc között a kapcsolatot biztosító diszulfid híd kialakításában, a számítások alapján a mutáció nem teszi lehetővé e diszulfid híd kialakulását, így a mutáns FX feltekeredése is hibás lesz. Ezen jelentős strukturális torzulások következményeképpen valószínűsítettük, hogy a normál fehérje transzport sem valósulhat meg, így vezetve szekréciós zavarhoz.

5.1.4 Hereditaer haemorrhagias teleangiectasia

Alapító mutáció igazolása hereditaer haemorrhagias teleangiectasiában

Az öt, látszólag egymással rokonságban nem álló családban kimutatott azonos, korábban az irodalomban még nem leírt *ACVRL1* c.625+1 G>C mutáció felvetette alapító hatás lehetőségét és e családok rokonsági kapcsolatát. Ennek feltérképezésére az 5 proband, 22 hozzátartozó és 50 kontroll személy (akik bizonyítottan nem hordozták az *ACVRL1* c.625+1 G>C mutációt) esetében további genetikai vizsgálatokra, a HHT-s rokonságnál családfatérképek felvételére is sor került. A haplotípus analízis során a vizsgált 3 SNP esetében az allélfrekvencia értékek a

kontroll csoportban egyeztek a HapMap kaukázusi populációra vonatkoztatott adataival, az *ACVRL1* c.625+1 G>C mutációt hordozó egyénekben azonban különböző allélfrekvencia értékeket detektáltunk (rs2071219 esetén 0,32, rs706815 esetén 0,18 és rs706816 esetén 0,18). A mikroszatellita markerek detektálása során, a D12S85 12-es ismétlődésszáma fordult elő a betegek 80%-ában, míg a kontroll csoportban 11 és 38 közötti ismétlődésszámokat figyeltünk meg. A D12S196 marker a betegekben 10-es és 7-es ismétlődésszámmal, a kontroll csoportban szintén a 10-es, valamint a 9-es ismétlődésszámmal fordult elő leggyakrabban. A D12S1677 intragenikus marker esetében a betegeknél 60%-ban a 20-as, közel 25%-ban a 21-es ismétlődésszám jelent meg; míg a kontroll csoportban változatos ismétlődésszámokat regisztráltunk. A D12S1712 esetében a betegek több mint 60%-nál, illetve a kontroll egyének többségénél is a 16-os ismétlődésszám volt a leggyakoribb. A távolabb lévő D12S270 marker mind a betegek, mind a kontroll csoport vizsgálatokor változatos ismétlődésszámot mutatott. A genetikai vizsgálatokkal párhuzamosan geneológus által felderítésre kerültek az 5 proband felmenői, valamint az esetleges közös ős, akitől az *ACVRL1* c.625+1 G>C eltérés eredeztethető.

Az alapító mutáció felderítése HHT-ben több szempontból bizonyul hasznosnak. Egyrészt az adott régióban hatékonyabbá és gyorsabbá teszi a diagnosztikát a célzott mutáció keresés lehetőségét megteremtve. Másrészt megjósolhatóvá teszi a tünetek megjelenésének idejét, spektrumát, súlyosságát. Az alapító mutáció megjelenése egy régióban markánsan megváltoztathatja a betegség prevalenciáját, ami esetünkben a HHT-vel kapcsolatos vizsgálataink kezdete óta egyértelműen tapasztalható.

A hereditaer haemorrhagias teleangiectasia diagnosztikai hatékonyságának javítása érdekében tett lépéseink

A HHT diagnosztikájának nehézsége abban (is) rejlik, hogy a betegség gyanúja esetén annak bizonyítására laboratóriumi teszt nem lévén, közvetlenül a genetikai vizsgálat ad csak lehetőséget. A HHT ritka betegség korfüggő penetranciával és több szervet érintő vascularis eltérésekkel, melyek egy része (pl. tüdő, vagy agyi ér AVM-ek) jóllehet születés óta megvan, de klinikailag igen hosszú ideig néma lehet. A heterogén klinikai megjelenés miatt a betegek különböző szakterületek képviselőivel kerülnek kapcsolatba, akik az egyes tünetekkel külön-külön találkozva, gyakran nem kapcsolják össze azokat, így jelentősen késlekedhet a HHT diagnózisa. A hazai betegek hatékonyabb diagnosztikája érdekében egy évtizede kezdtük együttműködésünket, melynek során a kelet-magyarországi régióban fül-orr-gégész, belgyógyász-hematológus és laboratóriumi szakember összefogásával szisztematikusan felkutatjuk és bevontuk a régió HHT betegeit.

A probandok diagnózisát követően kaszkád szerű családszűrést végeztünk, ezzel a megközelítéssel 2012-2021 között n=50 probandon keresztül összesen n=186

HHT személyt vetettünk alá részletes vizsgálatnak, családonként átlagosan 3,72 személy bevonása történt. A probandok mutációanalízise során a mutáció detektálási arány 96% volt. Az *ENG/ACVRL1* mutáció aránya a vizsgált populációban 1,13 (18/16), az *ENG/ACVRL1* mutációval rendelkező családok aránya 0,81 (21/26), végül az *ENG/ACVRL1* mutációra pozitív személyek aránya 0,84 (53/63). Egy családban *SMAD4* c.7A>G mutációt azonosítottunk.

5.1.5 Differenciáldiagnosztika haemorrhagias diathesisekben

Differenciáldiagnosztikai problémát jelentő esetek Osler-kórban

Az Osler-kór diagnosztikájával kapcsolatos klinikai vizsgálatunk során megállapítottuk, hogy a Curacao-kritériumok szigorú figyelembevételével igen magas mutáció detektálási arány érhető el (lásd fent). Ritkán előfordul azonban, hogy nyilvánvaló klinikai tünetek ellenére nem találjuk meg az okozati eltérést sem az *ENG*, sem az *ACVRL1* génben. Eddig két olyan probandot találtunk, ahol sem az *ENG*, sem az *ACVRL1* gének nem tartalmaztak okozati eltéréseket. Mindkét proband erősen orrvérző nőbeteg volt (64 és 62 évesek a diagnózis felállításának idején), akik 6, illetve 7 éve számolnak be a súlyos, fül-orr-gégészeti ellátásokat igénylő orrvérzéséről. A 64 éves beteg 3 pozitív Curacao kritériummal rendelkezett (epistaxis, teleangiectasia, pozitív családi anamnesis), nála a *SMAD4* c.7A>G (p.Asn3Asp) új, valószínű patogén mutációt detektáltuk heterozigóta formában. A 62 éves betegnél csupán egy kritérium (orrvérzés) megléte volt bizonyítható. Laboratóriumi vizsgálatainkat kiterjesztettük ezért coagulopathia és thrombocytá funkció zavar irányú vizsgálatokra is, negatív eredménnyel. Végül, a *RASAI* génben detektáltunk egy heterozigóta új, valószínűleg patogén eltérést (c.1833T>G; p.Phe611Leu). A homológia vizsgálatok során megállapítottuk, hogy mindkét mutáció az adott gének egy-egy konzervatív régióját és konzervatív aminosavát érinti.

A kiterjesztett genetikai vizsgálatnak Osler-kórban, vagy Osler-kór szerű tüneteket mutató betegekben azért van jelentősége, hogy a betegséggel ritkábban összefüggésbe hozható génekben azonosított eltérések alapján a diagnózis egyértelműen felállítható legyen, ezzel megteremtve a családvizsgálat lehetőségét is. A genetikai eltérés pontos ismerete – az érintett gén azonosítása – a betegség prognózisa és további klinikai tünetek megjelenésének előrejelzése szempontjából is lényeges. A *SMAD4* érintettsége esetén pulmonalis hypertonia kialakulására lehet számítani, a *RASAI* érintettsége pedig a capillaris malformatio- arteriovenosus malformatio (CM-AVM1) szindróma mellett (ami Osler-kór szerű tünetekkel jár) hajlamosít basal sejtes tüdőcarcinoma kialakulására.

Differenciáldiagnosztikai problémák megoldása és tudományos szempontból érdekes esetek von Willebrand betegségben

A tézisekben csak a 2B típusal kapcsolatos vizsgálatainkat említtem. N=7 egymással nem rokon beteg esetében diagnosztizáltunk vWD 2B típust. A mutációk az A1 és a D3 doménekben helyezkedtek el. Míg az A1 domén mutációi típusos vWD 2B variánsnak felelnek meg, annak minden laboratóriumi kritériumával együtt, addig más régiókat érintő mutációk atípusos 2B képében komoly differenciáldiagnosztikai problémákat okozhatnak. Ezt jól példázza annak a négy, egymással nem rokon betegnek az esete, akiket vérzéses tünetekkel referáltak, azonban a plazma mintákból (melyek fagyaszthatók és szállíthatók) elvégzett vWD irányú vizsgálatok rendre normál eredményekkel zárultak. Elvégezve azonban a risztocetin indukálta thrombocytá aggregáció vizsgálatát (RIPA) személyes megjelenést igénylő, frissen történő mintavételből, rendre fokozott RIPA volt megfigyelhető az alacsony, 0,6 mg/mL koncentrációjú risztocetin jelenlétében is, ez 2B altípusra utalt. A genetikai vizsgálat során minden esetben a p.Pro1266Leu (c.3797C>T), D3 domént érintő mutációt detektáltuk heterozigóta formában, ami a HGMD adatbázis szerint I-es típusú vWD kialakulásával jár. Erre a téves és félrevezető megállapításra felhívtuk a figyelmet és hangsúlyoztuk, hogy az ISTH által gondozott vWD adatbázis szerinti 2B típusal történő asszociációt kell irányadónak tekinteni. Ennek a megkülönböztetésnek a betegek terápiája szempontjából ugyanis jelentősége van. A genetikai vizsgálat segítette felállítani a 2B típusú vWD diagnózist egy olyan betegnél is, aki korábban éveken át ITP diagnózissal volt számon tartva, alacsony thrombocytá száma miatt.

Differenciáldiagnosztikai problémák megoldása és tudományos szempontból érdekes esetek fibrinogén rendellenességekben

Veleszületett fibrinogén rendellenességek vonatkozásában (2021 végéig) n=27 betegre toboroztunk. Többségük (n=18) a diagnosztikai szempontból nem egyszerű dysfibrinogenaemia esetek közé tartozott, míg n=4 esetben hypofibrinogenaemiával járó, n=2 esetben nem hemosztázis rendellenességgel járó esetet regisztráltunk, végül n=2 esetben új, korábban nem közölt mutációkat detektáltunk, melyek klinikai és laboratóriumi következményeit mi ismertettük elsőként. Eseteink az orvosi laboratóriumi szakterület számára a következő tanulságokkal szolgálnak. Azokban a laboratóriumokban, ahol nem végeznek TI és RI meghatározást, a fibrinogén rendellenességek egy része (főleg a dysfibrinogenaemia esetek) felderítetlen marad. A fibrinogén rendellenességek egy része esetén akár még a fibrinogén szintek is lehetnek normálisak, okozati mutáció jelenlétében is: a *FGA* p.Glu545Val vese amiloidosissal jár, amikor e ritka autoszomalis domináns betegség esetén a mutáns fibrinogén alfa láncok akkumulálódnak a vesékben amiloid fibrillumokat képezve, mely végső soron fatális szervkárosodáshoz vezet. A betegség felismerése és korrekt

diagnózisa életmentő e betegek számára. Amellett, hogy a fibrinogén rendellenességek klinikai és laboratóriumi fenotípusa meglehetősen változatos, a variabilitást fokozzák az esetlegesen társuló egyéb hemosztázis eltérések. Megállapítottuk, hogy a dysfibrinogenaemia klinikai fenotípusát thromboticus irányba módosíthatja a társuló AT deficiencia, vagy FV Leiden mutáció. A vWF valószínű patogén mutációjának hordozása tovább fokozhatja a fibrinogén rendellenességhez társuló vérzékenység súlyosságát.

5.2 Vizsgálatok ritka thrombophiliákban

5.2.1 Az antitrombin deficiencia előfordulása Magyarországon, a p.Leu131Phe (AT Budapest 3) variáns magas gyakorisága; klinikai jellegzetességei

A 2007 és 2016 között bevont betegek (n=156 nem rokon személy; AT deficiens családtagokkal együtt n=246 személy) vizsgálatával 31 különböző genetikai eltérést találtunk a *SERPINC1* génben. A mi populációinkban leggyakoribbnak az ATD IIHBS altípusa bizonyult (75,6%), ezen belül is az AT Budapest 3 mutáció (p.Leu131Phe), melyet 2017-ben történt elemzésünk idején 63 család, n=102 egyén hordozott. A IIHBS típus 80%-át tette ki ez az egyetlen mutáció. (Az azóta eltelt idő alatt az általunk diagnosztizált betegek száma jelentősen nőtt, az értekezés írásának idején már n=236 nem rokon ATD beteg szerepel az adatbázisunkban, és a IIHBS mutációk 88%-a az AT Budapest 3 variáns.) Az ATD-t okozó mutációk heterozigóta formában fordultak elő, kivéve az AT Budapest 3 mutációt (ATBp3), ahol homozigóta egyéneket is detektáltunk. Az egyéb IIHBS altípusok közül az AT Basel 5, az AT Padua I 11 családnál fordult elő. A klinikai jellemzőket tekintve az I-es típusú ATD betegek között szignifikánsan gyakrabban fordult elő VTE, mint a II-es típusú heterozigóta egyének között (p=0,015). Ezzel szemben a terhességi komplikációk előfordulási gyakorisága a IIHBS altípusban volt a gyakoribb az I-es típushoz képest (I-es típusban 2.1% vs. IIHBS típusban 7.1%, p=0.046). A betegeink között igen magas számban előforduló IIHBS deficiencia lehetővé tette azt, hogy összehasonlításokat végezhessünk ezen alcsoporton belül (ATBp3 homozigóták, ATBp3 heterozigóták, AT Basel és AT Padua I heterozigóták). A VTE előfordulása sokkal gyakoribb az ATBp3 mutáció hordozókban, mint az AT Basel és AT Padua I hordozókban (AT Padua I vs. ATBp3 heterozigóták p=0,041; AT Padua I vs. ATBp3 homozigóták p<0,001; AT Basel vs. ATBp3 homozigóták p<0,001). A VTE gyakorisága az ATBp3 homozigótákban a legmagasabb (ATBp3 heterozigóták vs. ATBp3 homozigóták p<0,001). Az artériás események az AT Basel hordozókban fordultak elő leggyakrabban (AT Basel vs. ATBp3 heterozigóták p=0,046; AT Basel vs. ATBp3 homozigóták p=0,006). Terhességi komplikációt leggyakrabban az AT Padua I hordozókban regisztráltunk, bár ez statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak a többi IIHBS alcsoporttal történő összehasonlításban. A proximálisan elhelyezkedő thrombosis tekintetében szignifikáns különbség volt az

ATBp3 homozigóták és az ATBp3 heterozigóták között ($p=0,001$). Az ATBp3 homozigóták voltak a legfiatalabbak az első thromboticus esemény elszenvedésének idején (ATBp3 homozigóták vs. AT Basel $p=0,002$; ATBp3 homozigóták vs. AT Padua I $p<0,001$ és ATBp3 homozigóták vs. ATBp3 heterozigóták $p<0,001$).

Vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy az ATD klinikumát befolyásolja a betegség altípusa. Az I-es típusú ATD-ban dominál a súlyos, vénás thrombosis és a II-es típusal összevetésben valóban rosszabb prognózissal jár. A magyar betegekben detektált relatíve nagy számú IIHBS típus és azon belül is az ATBp3 variáns előfordulása azonban további érdekes következtetések levonására adott lehetőséget. Megállapítottuk, hogy a IIHBS ATD-ban nemcsak vénás, de artériás thrombosisok is megjelenhetnek, valamint a terhességi komplikációk (magzati halál, koraszülés, halva születés, preeclampsia) is előfordulnak. A IIHBS csoporton belül szintén heterogenitás figyelhető meg. Az ATBp3 homozigóta állapot (egyéb variánsok esetén homozigóta előfordulást nem figyeltünk meg) a legsúlyosabb ATD altípus, a thromboticus tünetek még az I-es típusú betegekkel összevetésben is fiatalabb korban jelennek meg. A IIHBS heterozigóták között az ATBp3 variáns súlyosabb, mint az AT Basel, vagy AT Padua I, amennyiben az első thrombosis megjelenésének idejét tekintjük a súlyosság fokmérőjének. A rekurrens thrombosisok aránya is az ATBp3 variáns esetében magasabb. Az AT Basel gyakrabban fordul elő artériás eseményekkel, míg az AT Padua I-ben magasabb arányban figyeltünk meg terhességi komplikációkat. Az artériás események az ATBp3 hordozók között is megjelenhetnek, saját vizsgálatunkban 2021-el bezárólag $n=12$ esetet (2 homozigóta és 10 heterozigóta beteg) regisztráltunk, a betegek fiatalok, 2-48 évesek voltak a stroke vagy MI idején. Annak, hogy a legsúlyosabb, ATD IIHBS típus, az ATBp3 homozigóta állapot miért nem jár gyakrabban artériás eseménnyel az ATBp3 heterozigótasághoz viszonyítva, valószínű az a magyarázata, hogy e betegek már nagyon fiatal korban elszenvedik az első – jellemzően vénás – thrombosisukat, így hamar antikoaguláns terápiában részesülnek, amit az ATD diagnózisa után hosszú távon alkalmaznak.

Az antitrombin deficiencia megjelenése speciális betegcsoportokban

Az ATD betegek közül 32-en gyermekkorban (≤ 18 éves) estek át az első thromboticus eseményen. A gyermekek többsége ($n=25$) IIHBS altípusú mutációt és többségük ($n=18$) az ATBp3 mutációt hordozta homozigóta formában. A gyermekkori ATD-val kapcsolatos megfigyeléseinket kiterjesztve, szerb munkacsoporttal együttműködve további $n=19$ ATD gyermek esetét dolgoztuk fel. Az ATBp3 homozigóták jellemzően spontán thrombosisokat szenvedtek el, és jellemző volt a proximális, ill. rekurrens DVT. A thrombosisot követő antikoagulálás stratégiája ATD gyermekekben egyáltalán nem kiforrott, nagy populáció vizsgálatán

alapuló ajánlások nem is léteznek. Az ATBp3 homozigóta gyermekekben az első thromboticus epizód után hosszú távú antikoagulálás javasolható.

A terhességek kimenetele szempontjából végzett retrospektív kohorsz tanulmányunkban n=28 beteg esetében végeztük el az ATD karakterizálását. A betegek között n=11 I-es típusú, n=5 IIHBS ATBp3 homozigóta, n=10 IIHBS ATBp3 heterozigóta és n=2 IIPE beteg volt. Összesen 64 terhesség kimenetelét tudtuk elemezni. A terhességek kimenetele szempontjából a legrosszabb prognózist a IIHBS ATBp3 homozigóta állapot jelentette, itt volt a legalacsonyabb az élveszületések aránya és a legtöbbféle terhességi komplikációt e betegcsoportban észleltük. Megállapítottuk, hogy a terhességgel szövődött anyai thrombosis kockázatának szempontjából az egyes ATD típusok nem különböznek egymástól, kivéve a ATBp3 heterozigóta személyeket, akiknél alacsonyabb a thrombosis előfordulásának esélye. A terhességek kimenetele szempontjából azonban az ATBp3 homozigóta betegcsoport jelentősen különbözik a többitől, rendkívül magas arányú adverz eseménnyel. Az ATD terhességben – anyai thrombosis és magzati kimenetel szempontjából – történő thromboprofilaxisa a mai napig nem egységes, erre irányelv nem létezik, és – bár összegyűjtött eseteink hasznos adatokat szolgáltatnak – nemzetközi regiszterben történő standardizált adatgyűjtés nélkül további előrelépés nem lehetséges. A Nemzetközi Thrombosis és Hemostasis Társaság védnöksége alatt, szakmai vezetéssel, 2021-ben létrehoztunk egy ATD nemzetközi regisztert, melynek adataitól többek között azt is várjuk, hogy kellően nagy számú ATD terhességet elemezve, közelebb kerüljünk egy szakmai ajánlás megfogalmazásához. A v. cava inferior (VCI) atresia ATD-val való társulásának szisztematikus vizsgálatát spanyol munkacsoporttal kollaborációban végeztük és n=24 ATBp3 homozigóta beteget vontunk be. Közülük n=16 esetében lehetett VCI atresiát igazolni, mindegyiküknél a VCI infrarenalis szakasza volt érintett. Hét betegnél további véna hypoplasiát találtunk: egy betegnél jobb oldali v. renalis teljes hiányát, másik betegnél v. iliaca communis agenesiát, további négy betegnél v. iliaca communis hypoplasiát lehetett kimutatni. Egy VCI atresiát nem mutató betegnél v. iliaca communis atresia és kompenzatórikusan megduplázódott VCI volt detektálható. Logikus az a feltételezés, hogy a ATBp3 homozigóta magzatok már az intrauterin életben, korai thrombosisot szenvedhetnek el, ami befolyásolhatja a vénafejlődést VCI agenesiát, illetve egyes kapcsolódó szervek (vese, mellékvese) atresiáját okozhatja. Ez a malformatio kollaterális keringés kialakulásával jár, például a v. azygos rendszert érintően. Az, hogy a VCI atresia miért nem jelenik meg minden ATBp3 homozigótánál, valószínűleg a thrombosis komplex multifaktoriális betegség mivoltával magyarázható. Feltehetően vannak protektív tényezők, melyek megvédik az egyént a magzati korban elszenvedett thrombosisától és esetleg csak később, a postnatalis életben jelentkeznek tünetek. Következésként azt is levonhatjuk e tanulmányunkból, hogy a VCI atresiával rendelkező betegek magas thrombosis

kockázattal rendelkeznek mind gyermek, mind felnőtt korban. A stasis és a kollaterális keringés, amit a VCI hiánya idéz elő, hozzájárul a fokozott thrombosis kockázathoz. Mindezek alapján javaslatot tettünk arra, hogy e súlyos ATD altípusban, ami a magyar lakosságban (ritka betegség mivoltához képest) nem elhanyagolható számban fordul elő, a vénás rendszer képpalkotó vizsgálata és a VCI rendellenességek igazolása célszerű, a betegek további antithromboticus profilaxisa szempontjából.

5.2.2 Az antitrombin deficiencia laboratóriumi diagnosztikájára szolgáló funkcionális tesztek, elsősorban a hc-anti-FXa és p-anti-FXa tesztek evaluációja

Az anti-FXa alapú teszt összehasonlítása az anti-FIIa alapú teszttel

Összehasonlító vizsgálatunkban kezdetben n=7 I-es típusú, n=1 IIPE típusú és n=29 IIHBS típusú ATD beteg mintájában határoztuk meg az AT aktivitását. Ekkor a Siemens Berichrom AT (anti-FIIa teszt), a Siemens Innovance AT (anti-FXa teszt) és az általunk kidolgozott és a módszertani fejezetben leírt anti-FXa tesztet használtuk. Az I-es típusú ATD betegek és az egyetlen IIPE beteg AT aktivitás értékei nem különböztek az egyes tesztekben. Viszont a heterozigóta IIHBS betegek AT aktivitás értékei egy kivétellel minden esetben a referencia tartományba (80-120%) estek a Berichrom AT teszttel. Az anti-FXa alapú tesztekkel azonban minden esetben a referencia tartomány alsó határa alatti, kóros értéket kaptunk. A homozigóta ATBp3 (n=9) betegek esetében az anti-FIIa alapú teszt ugyan kóros értéket adott, de ezek az értékek jelentősen emelkedettek voltak az anti-FXa tesztekben észlelt értékekhez viszonyítva és inkább megfeleltek a heterozigóta IIHBS ATD betegek anti-FXa tesztben kapott értékeinek. Mindezek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a IIHBS ATD esetében elsővonalbeli (szűrő) tesztnek javasolt inkább az anti-FXa alapú funkcionális tesztek alkalmazni annak érdekében, hogy az ATD aluldiagnosztizálását elkerülhessük. Azokban a populációkban, ahol a IIHBS ATD a vezető ATD típus (ahogyan az a magyar népességben is), ennek a felismerésnek kifejezett gyakorlati jelentősége van.

A p-anti-FXa esszé kidolgozása és evaluációja

Annak felismerése, hogy az ATD esetek túlnyomó többsége hazánkban IIHBS típusú, melynek diagnózisa során a heparin jelenlétében végzett anti-FXa alapú funkcionális teszt megfelelő szűrőtesztnek bizonyul, és elvileg – a IIHBS típus patogenezisének ismeretében – heparin hiányában az ún. progresszív AT aktivitás nem sérül, indított bennünket arra, hogy kidolgozzunk egy progresszív anti-FXa alapú tesztet (p-anti-FXa). A tesztet klinikai laboratóriumban használatos automata koagulométerekre adaptáltuk, meghatároztuk a teszt teljesítőképességét n=78 ismert ATD beteg mintáján és referencia tartományt állítottunk fel (n=188 egészséges személy).

Megállapítottuk továbbá, hogy a p-anti-FXa/hc-anti-FXa aktivitás értékek hányadosa jó diszkriminációs képességgel rendelkezik a különböző típusú ATD elkülönítésére.

A különböző anti-FXa tesztek szenzitivitásának összehasonlítása a IIHBS ATD diagnosztikájában

Az általunk kidolgozott hc-anti-FXa és p-anti-FXa reagensek bevezetését követően szisztematikusan vizsgáltuk az ATD betegek hc-anti-FXa aktivitását a saját és a két legnagyobb világcég (Siemens és Werfen) kereskedelmi forgalomban kapható reagenseivel. Több mint 100 ATD beteg plazma mintáin végeztük el az összehasonlításokat. Megállapítottuk, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható egyes anti-FXa tesztek szenzitivitása elmarad az elvárttól IIHBS ATD-ban, diagnosztikus problémát okozva. Annak vizsgálatára, hogy a hc-anti-FXa tesztek esetében mely tényezők befolyásolhatják a tesztek szenzitivitását, saját, diagnosztikus tesztként használt hc-anti-FXa tesztrendszerünkben, mely 100%-os szenzitivitású, változtattuk a heparin koncentrációt és a pH-t. A heparin koncentráció emelésével minden esetben emelkedett az AT aktivitás, egy AT Padua I minta esetében el is érte a referencia tartomány alsó határát. Ha az esszé körülményei pH 7.4-re változtak, az AT aktivitás értékek tovább emelkedtek, elérve, vagy meghaladva a referencia tartomány alsó határát 2 AT Basel és 1 AT Padua I minta esetében. Ha a heparin koncentrációt az eredeti 8-szorosára emeltük az AT Basel és az AT Padua I minták mindegyike normál AT aktivitás értéket mutatott. Az ATBp3 minták AT aktivitás értékei nem növekedtek tovább.

Megállapítottuk tehát, hogy a funkcionális AT tesztek érzékenysége szempontjából nem kizárólag az enzim típusa (anti-FIIa vagy anti-FXa esszé) az egyetlen befolyásoló tényező. A kereskedelmi forgalomban kapható tesztek érzékenységének különbségei a IIHBS ATD betegek esetében mutatkoznak meg. Arra következtettünk, hogy a hc-anti-FXa tesztek érzékenységében a heparin koncentráció és az ionerő a fő befolyásoló tényezők. A laboratóriumi tesztekkel kapcsolatos eredményeink azt is mutatják, hogy a IIHBS igen heterogén a csoport a mutációk típusától függően laboratóriumi viselkedés szempontjából is. A funkcionális tesztek egyes altípusok iránt mutatott eltérő szenzitivitásának hátterében feltételeztük az AT-heparin kötés erősségének különbségét is az egyes mutánsok esetében, amit később in vitro és in silico módszerekkel tovább vizsgáltunk (ld. később). A vizsgált paraméterek (heparin koncentráció, pH) módosítása érdekes módon kevésbé befolyásolták az ATBp3 mintákban mért AT aktivitás értékeket a többi IIHBS mutánshoz viszonyítva, ami azzal együtt, hogy az ATBp3 homozigóták AT koncentráció értékei gyakran alacsonynak mutatkoztak, ebben a vizsgálatunkban is azt sugallta, hogy e mutáció nem csupán az AT-heparin kölcsönhatást befolyásolja, hanem komplexebb következménnyel jár.

5.2.3 Az Antitrombin Budapest 3 mutáció alapító hatása

Összesen $n=102$ ATBp3 mutáció hordozó és $n=200$ egészséges személy DNS mintáján 12 polimorf markert (7 SNP, egy 5'LP és 4 STR) vizsgálva sikerült igazolnunk az ATBp3 mutáció alapító hatását. A haplotípus analízis során kimutattuk, hogy a mutáns „T allél” egyetlen haplotípussal, míg a normál „C allél” viszont különböző haplotípusokkal társult. Az ATBp3 homozigóták esetében kizárólag egyféle ismétlődésszámot találtunk az Alu 5 és Alu 8 intragénius mikrosatellita markerek analízisekor, a $(ATT)_6$ és $(ATT)_{15}$ ismétlődéseket, a D1S218 marker $(AC)_{24}$ és $(AC)_{25}$ formában fordult elő náluk. A kontroll csoportban minden markernél heterogén ismétlődésszámokat regisztráltunk.

Az alapító mutáció felderítése populációnkban több szempontból is hasznos volt. Egyrészt, az alapító mutáció következtében a hazai betegeknek vonatkozatható hatékony diagnosztikai stratégiát állíthattunk fel (ld. előző fejezetben). Az alapító mutáció jelenléte hazánkban az ATD kivizsgálása során a mutációs találati arányt is nagy mértékben fokozza. A gyorsabb és pontosabb diagnózis mellett az is kiemelő, hogy az azonos mutáció hordozáshoz társuló hasonló klinikai fenotípus a betegek prevenció, terápiás stratégiájának megtervezését is megkönnyíti.

Az ATBp3 alapításának idejét $n=36$ egymással nem rokon mutációhordozó személy és családtagjaik (összesen $n=106$ személy) STR markereinek előfordulása alapján becsültük. Megállapítottuk, hogy az kb. 350-400 évvel ezelőtt keletkezhetett, vagy került be Magyarországra.

5.2.4 A különböző IIHBS antitrombin deficienciák heparin-kötésének vizsgálata, a különbségek felderítése biokémiai és in silico módszerekkel

A különböző IIHBS ATD (AT Basel, AT Padua I és ATBp3) típusokban észlelt klinikai és laboratóriumi diagnosztikai tesztekkel észlelt különbségek (ld. előző fejezetekben) felvetették e variánsok heparinhoz való kötődésének lehetséges különbségeit. E különbségeket biokémiai módszerekkel és in silico megközelítéssel is vizsgáltuk.

A különböző IIHBS ATD típusok heparinnal való kapcsolatának in vitro és ex vivo biokémiai és in silico vizsgálata

Biokémiai és in silico vizsgálataink eredményeit összefoglalva az első tanulságot az ATBp3 variánsnál a laboratóriumi diagnosztika során észlelt enyhén, de konzekvensen csökkent AT antigén koncentrációval kapcsolatban vontuk le. A nanoDSF kísérleteinkben az ATBp3 homozigóta betegek plazmáiból tisztított AT esetében csökkent termostabilitást találtunk (a nano DSF kísérletekben az ATBp3 homozigóta beteg plazma esetében a „ T_{onset} ” és a „ T_m ” $42,7 \pm 1,47^\circ\text{C}$ és $57,1 \pm 0,03^\circ\text{C}$ volt, ami szignifikánsan eltért a vad típusú plazmától, ahol „ T_{onset} ” és a „ T_m ” $46,2 \pm 1,3^\circ\text{C}$ és $57,6 \pm 0,1^\circ\text{C}$ volt), ami az in silico vizsgálatokban is megerősítést nyert,

ahol a D-hélix elongációja volt megfigyelhető, illetve magasabb RMSF volt detektálható a natív, nem aktivált AT struktúrában. Ezek az eltérések nem túl súlyosak, de egy enyhe szekréciós zavart eredményezhetnek, vagy éppen az ATBp3 fokozott eliminációjához vezethetnek annak instabilitása miatt.

Vizsgálataink fő célja az egyes variánsok heparin kötésével kapcsolatban feltételezett különbségek igazolása volt. A különböző ATD IIHBS betegek plazmáiban végzett keresztezett immunoelektroforézis azt mutatta, hogy az AT Padua a leginkább érintett AT heparin affinitás szempontjából. Mivel AT Basel és AT Padua homozigóta betegek nem léteznek, a további vizsgálatokat rekombináns, HEK293 sejtekben expresszált, majd affinitás kromatográfiával tisztított AT-okon végeztük. Az immobilizált heparin felszínén végzett SPR kísérleteink eredményei is azt mutatták, hogy az AT Padua heparin affinitása a leggyengébb ($K_D=1,08 \times 10^{-6} \text{M}$). A vad típusnál ez az érték $K_D=6,4 \times 10^{-10} \text{M}$. A különböző IIHBS AT-ok közül a vad típushoz legközelebb az ATBp3 állt e tekintetben, jóllehet még itt is két nagyságrendnyi különbséget mutattunk ki ($K_D=2,15 \times 10^{-8} \text{M}$). Heparin affinitás tekintetében az AT Basel az ATBp3 és a AT Padua közé esett. Az *in silico* vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy az AT Basel variáns befolyásolja legkevésbé a molekuláris fluktuációkat és az allosztérikus útvonalakat, ezért nem valószínű, hogy ez a mutáció erős destabilizáló hatással bírna a fehérje másodlagos és harmadlagos szerkezetére. Kimutattuk ugyanakkor, hogy a 22-46 aminosavak által határolt hurokszerkezet megváltozott konformációja hatással lehet az AT-heparin kötődésre. Az ATBp3 esetében megnövekedett fluktuációkat detektáltunk a fehérjében a heparin kötő régió közelében, de távolabbi régiókban is. Úgy találtuk, hogy e variáns hatással van az allosztérikus útvonalakra, amik az AT konformációs aktiválódásában részt vesznek. *In silico* kísérleteink alapján is az AT Padua tűnik a legsúlyosabban érintett variánsnak. A fluktuációk itt voltak a legnagyobbak, mind a nem aktivált, mind az aktivált állapotokban, az allosztérikus útvonalak szintén érintettek voltak. A szimulációk alatt jelentős pentaszacharid disszociációt egyik variánsnál.

A biokémiai és *in silico* vizsgálatok eredményeit több okból sem egyszerű lefordítani a klinikum nyelvére. Egyrészt, az *in vitro* tanulmányok tisztított rekombináns fehérjéken történtek és az ATBp3 kivételével nem léteznek homozigóta betegek, ezért a különböző mutációk fenotípusra gyakorolt hatását a jelen lévő normál allélról expresszáldott AT biztosan befolyásolja. Másrészt, az α -AT és β -AT egymáshoz viszonyított aránya különböző lehet a betegekben és ez szintén hatással lehet az adott betegben észlelt AT heparin affinitására. Harmadrészt, mivel a thrombosis egy komplex betegség, az ATD által okozott kockázatot egyéb genetikai és környezeti tényezők nyilvánvalóan módosítják, e tényezők szintén különbözhetnek a betegekben. Továbbá létezhetnek protektív faktorok is, melyeket részleteiben még nem ismerünk, de ezek jelenléte akár gén-gén, akár gén-környezet interakciók révén befolyásolhatják az ATD mellett kialakuló klinikai fenotípust. Mindenesetre, e

felvetett kérdések és bizonytalanságok további vizsgálatokat iniciáltak, melyeken kutatócsoportommal és nemzetközi kollaborációban jelenleg is dolgozunk.

5.2.5 Az Antitrombin Debrecen klinikai, laboratóriumi és biokémiai karakterizálása

Egy négy generációs család összesen $n=31$ tagját vontuk be a tanulmányba. Közülük $n=20$ személy ATD-nek bizonyult. A proband a vizsgálatunk idején 75 éves nőbeteg, anamnesisében többszörös thrombosisokkal, majd postthromboticus syndromával. Az ATD diagnózisát 45 éves korában állították fel, de ekkor genetikai vizsgálat még nem készült. A diagnózis birtokában élethosszig tartó K-vitamin antagonistá készítményre állították. Nála és a további érintett családtagoknál a c.614T>C (p.Leu205Pro) új mutációt detektáltuk, minden érintett személynél heterozigóta formában.

A HEK293 sejtekben expresszált vad típusú és mutáns (Pro205) AT fehérje koncentrációját ELISA módszerrel, aktivitását a fentiekben már ismertetett hc-anti-FXa módszerrel vizsgáltuk, a fehérjéket Western blot technikával vizualizáltuk. Az AT koncentráció a vad típusú plazmáddal transzfektált sejtek felülszójában $2,33 \pm 0,76 \mu\text{g/mL}$, míg a Pro205 mutánsal transzfektált sejtekében csak $0,56 \pm 0,43 \mu\text{g/mL}$ volt. A WB-nak megfelelően a sejtizátumban az AT koncentráció $2,83 \pm 1,40 \mu\text{g/mg}$ fehérje a vad típus és $2,86 \pm 1,10 \mu\text{g/mg}$ fehérje a mutáns AT esetében. Az amidolitikus tesztben az AT aktivitás értékek vad típus esetében $1,576 \pm 0,001 \text{ U/mL}$ és a Pro205 esetében $0,221 \pm 0,058 \text{ U/mL}$ -nek adódtak. A rekombináns fehérjék specifikus aktivitása (egységnyi fehérjemennyiségre vonatkoztatott aktivitás) a Pro205 AT-ra nézve $3,94 \pm 0,95 \text{ U/mg}$, míg a vad típusú AT-ra vonatkoztatva $7,79 \pm 2,10 \text{ U/mg}$ volt. A Pro205 mutáns fehérjét a vad típushoz hasonló mennyiségben mutattuk ki a sejtek lizátumában, ezek alapján a protein szintézis nem érintett. Ezzel szemben a sejtek felülszójába csak csekély mennyiségű mutáns fehérje jutott ki, ami szekréciós zavarra utalt. A Pro205 fehérje specifikus aktivitása is csökkent a vad típushoz képest. Az eredmények összességében egy komplex (mennyiségi zavar a szekréció defektusa miatt és funkcionális zavar) defektusra utalnak. Megvizsgáltuk a mutáns AT intracelluláris elhelyezkedését és a vad típusú és mutáns AT egyes sejtorganelumokkal való kolokalizációját numerikusan is jellemeztük. Ahogyan azt vártuk, a vad típus esetében egyik sejtalkotóval sem mutattunk ki erős kolokalizációt, míg a mutáns AT esetében a transz-Golgi és 26S proteaszómát jelölő markerekkel jelentősebb együttállást detektáltunk.

A p.Leu205Pro mutáció hatását in silico is jellemeztük a korábban már említésre kerülő módszertannal. Röviden, a $4\mu\text{s}$ -os szimuláció során, a vad típushoz viszonyítva jelentős különbség volt észlelhető a szimuláció első és utolsó pontjának megfelelő trajektóriák között a mutáns AT esetében, ezek a különbségek az F-hélix N-és C-terminális részét és a mutációs helyet érintették. Az RMSD és az RMSF is

nagyobb volt a mutáns AT esetében a vad típushoz viszonyítva. Ezek a mutáns AT szerkezeti torzulását valószínűsítik.

Összefoglalva, a p.Leu205Pro ATD súlyos, alapvetően kvantitatív deficiencia, melynek háttérében szerkezeti torzulás következtében bekövetkező szekreciós zavar áll; a mutáns AT valószínűleg letér a normál szekreciós útvonallról és az abnormális fehérjék degradációjáért felelős 26S proteaszóma szintjén akkumulálódik. A mutáns AT emellett csökkent specifikus aktivitással is rendelkezik, így végső soron egy komplex, súlyos fenotípust eredményezve.

5.2.6 A kilenc új, antitrombin mutáció in vitro vizsgálata

Biokémiai vizsgálataink során először a tranziensen transzfektált HEK-293 sejtek felülűszójából Western blot technikával mutattuk ki a vad típusú és a mutáns AT-okat. A vad típusú AT és a következő mutációk esetében detektáltunk erős sávot 58 kDa-nál: p.Arg14Lys, p.Arg78Gly, és p.Pro461Thr. Gyenge, vagy hiányzó sávot a következő esetekben detektáltunk: p.Cys32Tyr, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, és a p.Gly456delins_Ala_Thr. A sejtízátumban a következő esetekben tudtunk AT-t kimutatni: p.Arg14Lys, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Gly456delins_Ala_Thr és a p.Pro461Thr. A p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*14, és a p.Asn450Ile esetében az AT hiányzott, vagy csak nagyon halvány sávként jelent meg. A transzfektált sejtek lizátumából és a felülűszóból ELISA módszerrel mért AT antigén szintek összhangban voltak a Western blot eredményeivel. Ezek alapján a mutációkat három csoportba soroltuk. Az első csoportba (p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*14, és a p.Asn450Ile) tartoznak, melyeknél alacsony AT fehérje expressziót detektáltunk mind a felülűszóban mind a sejtízátumban, ami alacsony szintű fehérjeszintézisre vagy akár az mRNS hiányára is utalhat (utóbbi lehetőséget RT-qPCR-rel cáfoltuk). A második csoport (p.Met121Arg, p.Leu245Pro, és a p.Gly456delins_Ala_Thr) magas AT fehérje expressziót mutat a sejtízátumban de alacsony AT fehérje expressziót a felülűszóban, ezzel szekreciós zavarra utalva. A harmadik csoport (p.Arg14Lys, p.Arg78Gly, p.Pro461Thr) azokat foglalja magába, ahol az AT fehérje erősen kimutatható mind a sejtízátumban mind a felülűszóban. Ezek a mutások funkcionális variánsok vagy az AT szerkezetére és funkciójára csekélyebb hatással bírnak.

A mutások hc-anti-FXa és p-anti-FXa eredményeit a vad típus AT aktivitásához viszonyítva adtuk meg. Funkcionális vizsgálataink alapján megváltozott heparin kötést feltételeztünk a p.Arg78Gly és a p.Pro461Thr AT esetében, melyet az SPR megerősített (csökkent AT-heparin kötődés).

Azokat a mutásokat (p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr), melyeknél szekreciós zavart feltételeztünk, N-glikozidáz F emésztéssel tovább vizsgáltuk, és a vad típusal megegyező mintázatuk alapján az N-glikoziláció defektusát esetükben kizártuk.

Vizsgálataink eredményeit összegezve megállapítottuk, hogy három mutáns esetében (p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile) a protein szintézis zavara, másik három esetben (p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Gly456delins_Ala_Thr) szekréciós zavar okoz I-es típusú ATD-t. A p.Arg78Gly mutáció IIHBS, míg a p.Pro461Thr IIPE típusba sorolható, a szignálpeptidet érintő p.Arg14Lys mutáció patogén szerepe nem igazolódott.

5.2.7 Vizsgálatok protein C deficienciában

A thrombosis munkacsoportunk az elmúlt 15 év alatt már több mint kétszáz protein C deficiens (PCD) beteg esetében végezte el a komplex diagnosztikát. A PCD betegek között sok ismert *PROC* mutációval rendelkező személy van, azonban elszórtan talákoztunk új variánsokkal is. Közülük két beteg esetében elvégeztük a komplex laboratóriumi és in vitro vizsgálatokat is a mutációk PC fehérjére gyakorolt hatásainak megállapítására. A talált mutációk következményeinek in vitro vizsgálatát azért találtuk érdekesnek, mert az egyik eltérés (p.Asp77Gly) a PC fehérje foszfolipid felszínnel való kapcsolatában szerepet játszó doménben található, így elsősorban funkcionális variánsnak kellene lennie, a csökkent antigén koncentráció azonban kvantitatív zavart feltételez. A másik két mutáció vizsgálata pedig azért tűnt érdekesnek, mert két különböző család két különböző variánssal rendelkezett, mely ugyanazt a pozíciót érintette (Ala163). Mivel minden mutációt heterozigóta formában hordoztak betegek, ezért, hogy a normál allélről átíródó variáns ne befolyásolja a vizsgálatainkat, in vitro rekombináns fehérjéken végeztük el azokat. A vad típusú fehérje antigén koncentrációja 0.142 ± 0.007 $\mu\text{g}/\text{mL}$ és 0.034 ± 0.003 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein volt rendre a médiumban és a sejtlyátumban. A vad típusú és a mutáns PC fehérjék antigén koncentrációja nem különbözött jelentősen a sejtlyátumokban. A 77Gly mutáns koncentrációja mérhető volt a médiumban, de alacsonyabb volt a vad típusú PC-nél (0.059 ± 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A 163Val és 163Glu mutánsok koncentrációja detektálási határ alatt volt a médiumban. Ezeket az eredményeket Western blotlaltal is igazoltuk. A 77Gly PC aktivitása az amidolitikus tesztben történő meghatározás során összehasonlítható volt a vad típusú PC aktivitásával ($77.5\% \pm 15.1\%$, a vad típusú PC aktivitását 100%-nak tekintve). Továbbá, a 77Gly specifikus aktivitása (egy mg PC fehérjére vonatkoztatott aktivitása) megegyezett a vad típusú PC-jével ($104.2\% \pm 28.4\%$, a vad típusú PC specifikus aktivitását 100%-nak véve). A 77Gly PC aktivitása alvadási tesztben a vad típusú PC $80\% \pm 9.4\%$ -a volt. A 77Gly PC aktiválódásának sebessége sem különbözött a vad típustól. Az amidolitikus esszéhez hasonlóan, az alvadási tesztrel sem lehetett PC aktivitást detektálni a mock, a 163Val és 163Glu minták médiumából. Mindezekből, a 163-as pozíciót érintően szekréció zavart feltételeztünk, a 77-es pozíciót érintő variáns esetében enyhébb következménnyel szembesültünk: enyhe szekréció zavar dominált és érdemi funkcionális komponenst nem tudtunk igazolni.

A szekréció zavart tovább jellemző, kettős immunfluoreszcens festést és CLSM vizsgálatokat végeztünk. A 77Gly mutáns egyik sejtorganelummal sem mutatott kifejezett együttállást, míg a 163Glu és 163Val mutánsoknál a 26S proteasómában észleltünk akkumulálódást.

Az abnormális fehérjék szekréciójának megakadályozására és intracelluláris lebontásra való kijelölésének egyik lehetséges módja a fehérjék ubikvitinálása. Vizsgálatainkban a poliubikvitinált mutáns PC aránya a vad típusú PC-hez viszonyítva több mint 2:1 volt a 163Val ($2,25 \pm 0,49$) és a 163Glu ($2,95 \pm 0,51$) PC esetében, míg a 77Gly mutáns nem mutatott jelentős poliubikvitináltságot (aránya a vad típusú fehérjéhez $0,96 \pm 0,10$ volt).

Az *in silico* vizsgálatok a 163Glu és 163Val mutánsok szerkezeti torzulását jelezték, míg a 77Gly esetében a molekulamodellézési tanulmányok nem mutattak jelentős molekulán belüli szerkezeti eltérést. A mutáció befolyásolhatja azonban a sejtmembrán külső részével, a PC receptoraival történő interakciót, hatása lehet továbbá a protein komplexek stabilitására, melyek alkotásában részt vesz a PC.

Összefoglalva, a p.Ala163Glu és p.Ala163Val mutációk a PC szerkezeti károsodáshoz és szekréciós defektusához vezetnek. A p.Asp77Gly mutáció jelenlétében a PC aktivitása normál és mivel esetében nem látható jelentősebb szekréciós zavar, elképzelhető, hogy a mutáció az intermolekuláris kölcsönhatásokat módosítja, ill. a PC clearance-t is befolyásolhatja.

6 ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK RITKA HEMOSZTÁZIS RENDELLENESSÉGEKBE

6.1 Vérzékenység

6.1.1 XIII-as faktor deficiencia

Két, súlyos FXIII deficienciában szenvedő beteg esetében karakterizáltuk a betegséget, a molekuláris vizsgálatokat és a fehérje szintű analíziseket is beleértve. A laboratóriumi fenotípus komplett meghatározása mellett az okozati mutációkat is meghatároztuk, patogénitásukat igazoltuk.

Kidolgoztuk a veleszületett FXIII deficiencia diagnosztikai protokollját és nemzetközi ajánlasként megfogalmaztuk. A diagnosztikai algoritmusnak megfelelően, a funkcionális tesztek és a különböző antigén esszék eredményei szerint javaslatot tettünk a FXIII deficienciák csoportosítására.

6.1.2 V-ös faktor deficiencia

Egy mérsékelt súlyosságú, invazív beavatkozások kapcsán megnyilvánuló vérzékenységben szenvedő nőbetegnél I-es típusú FV deficienciát, a háttérben új, okozati F5 mutációt igazoltunk. A p.Gly521Arg mutáció patogénitását indirekt módszerekkel, elsősorban molekula modellezéssel bizonyítottuk. A mutáció következtében feltehetően hibás feltekeredésű FV fehérje jön létre, mely intracellulárisan degradálódik. Esetünk kapcsán felhívtuk a figyelmet a tünetmentes, de 50% alatti FV szintekkel rendelkező heterozigóta FV deficiens személyek intervenciók kapcsán felmerülő fokozott vérzésveszélyére. A laboratóriumi diagnosztika szempontjából lényeges megállapításunk az, hogy normál, vagy csak jelzetten megnyúlt koaguláció szűrőtesztek is bírhatnak klinikai jelentőséggel, és ezért e minor eltérésekre is figyelemmel kell lenni.

6.1.3 X-es faktor deficiencia

Egy súlyos vérzékenységet mutató 1% alatti FX aktivitással és antigén szinttel rendelkező, I-es típusú FX deficienciában szenvedő gyermek tüneteinek háttérben először közöltük a c.730 G>A (p.Gly244Arg) mutációt. A mutáció strukturális és funkcionális következményeit in vitro expressziós kísérletekben vizsgálva megállapítottuk, hogy a mutáns FX szekréciós zavart szenved, intracellulárisan akkumulálódik, majd degradálódik. Az akkumuláció feltehetően a transz- Golgi, késői endoszóma szintjén történik. A molekula modellezés és energetikai számítások azt jelezték, hogy a mutáns fehérjében olyan strukturális változások jönnek létre, melyek magyarázhatják intracelluláris transzportjának zavarát.

6.1.4 Hereditaer haemorrhagias teleangiectasia (Osler-Weber-Rendu kór)

Osler-kórban szenvedő észak-kelet magyarországi családok vizsgálata során alapító mutációt találtunk (*ACVRL1* c.625+1 G>C), polimorf markerek alkalmazásával bizonyítottunk. Az alapító mutáció felderítésével az adott régióban hatékonyabbá és gyorsabbá tettük a betegség diagnosztikáját a célzott mutáció keresés lehetőségét megteremtve. Felhívtuk a figyelmet arra, hogy az alapító mutáció megjelenése egy régióban markánsan megváltoztathatja a betegség prevalenciáját, valamint tünettanát.

6.1.5 Differenciáldiagnosztikai problémák megoldása veleszületett vérzékenységekben komplex speciális hemosztazeológiai vizsgálatokkal

Hazánkban először kidolgoztuk és megvalósítottuk a von Willebrand betegség, Osler-kór és fibrinogén rendellenességek komplex diagnosztikai repertoárját, melynek segítségével számos differenciáldiagnosztikai problémát oldhatunk meg, hozzásegítve e ritka betegségekben szenvedő személyeket a gyors és adekvát diagnózishoz, ezáltal az adekvát terápiás, prevenciós megoldásokhoz. Eseteink bemutatása a szakterület fejlődése szempontjából is jelentőséggel bír. Munkánkkal hozzájárultunk e ritka betegségeket tartalmazó adatbázisok bővítéséhez is.

6.2 **Thrombophilia**

6.2.1 Antitrombin deficiencia

Az elmúlt másfél évtizedben a legkomplexebb, legizgalmasabb vizsgálatainkat ATD-ban végeztük. Számos új szempontot fogalmaztunk meg, több új felismerést és megállapítást tettünk, melyek közül legfontosabbak az alábbiak:

- Az ATD ritka betegség mivoltához képest legnagyobb számú beteget összegyűjtve és elemezve megállapítottuk, hogy e betegség heterogén mind klinikai megjelenését, mind laboratóriumi jellemzőit tekintve. A IIHBS ATD altípus önmagában is heterogenitást mutat, az ATBp3 homozigóta állapot a legsúlyosabb ATD, főként vénás thromboticus manifesztációval, míg az egyéb IIHBS altípusok esetében artériás thrombosisok és terhességi komplikációk is gyakrabban előfordulnak. Felhívtuk a figyelmet az ATD szűrésének fontosságára nem provokált, gyermekkorban és fiatal felnőtt korban elszenvedett vénás és artériás thrombosisok esetén, ami különösen a hazai betegeknél lényeges, ahol az ATBp3 előfordulása sokkal gyakoribb a többi populációhoz viszonyítva.

- Megállapítottuk, hogy az ATD legsúlyosabb formája, az ATBp3 homozigóta állapot gyakran társul v. cava inferior atresiával és ezt új szindrómaként közöltük. A háttérben feltehetően a korai magzati életben elszenvedett thrombosis áll. A v. cava inferior atresiával rendelkező betegek thrombosis kockázata nagyon magas. Mivel e vénafejlődési rendellenesség háttérében, véleményünk szerint, legalább részben thromboticus események állnak, ezért javaslatot tettünk a v. cava inferior

rendszeret érintő rendellenességekkel élő betegek thrombophilia szűrésére, illetve az ATD ATBp3 homozigóta betegek v. cava inferiort érintő rendellenességeinek vizsgálatára.

- Megállapítottuk, hogy a kereskedelmi forgalomban lévő AT aktivitás meghatározására szolgáló reagenskészletek jelentős különbséget mutatnak szenzitivitás szempontjából a IIHBS ATD betegek esetében. Felismertük és igazoltuk, hogy e tesztekben nemcsak az enzim típusa (trombin vagy aktivált X-es faktor) felelős e különbségekért, hanem a heparin koncentrációja a reagensben és az ionerő is jelentős tényezők. A magas heparin koncentráció és alacsony ionerő kedvezőtlenül befolyásolja a tesztek szenzitivitását. Mindezek alapján ajánlást tettünk az ATD diagnosztika első vonalbeli tesztjének minőségi követelményeire.

- Kidolgoztunk, automata koagulométerre adaptáltunk, evaluáltunk és bevezettünk egy AT heparin kofaktor és progresszív aktivitását egy reagenskészletben, egyszerűen mérhető tesztet, ami aktív X-es faktort tartalmaz, 1000 NE/mL heparin koncentráció és pH 8.4 mellett kiváló szenzitivitással rendelkezik a IIHBS ATD iránt. A progresszív esszé bevezetésével egyszerűen diszkriminálható a IIHBS ATD altípus a többi II-es típusú ATD-tól. Olyan, a mindennapi gyakorlatban jól használható algoritmust dolgoztunk ki az ATD laboratóriumi diagnosztikájára, ami figyelembe veszi a hazai ATD betegek karakterisztikumait, a IIHBS gyakori előfordulását és a laboratóriumi tesztek szenzitivitását is.

- Az irodalomban elsőként végeztünk szisztematikus összehasonlító biokémiai és in silico vizsgálatokat a különböző IIHBS altípusba tartozó AT variánsok klinikai és laboratóriumi heterogenitásának bizonyítására. Feltártuk, hogy az ATBp3, AT Basel és AT Padua variánsok heparinnal való interakcióinak különbözőségének hátterében eltérő molekuláris mechanizmusok állnak. Legsúlyosabb IIHBS formának az AT Padua bizonyul, ahol az AT-heparin komplex képződés a leglassabban megy végbe és a komplex stabilitása is a leggyengébb. Ezt a molekulamodellzés is megerősíti, hiszen az AT Padua konformációváltozást okoz a fehérje N-terminális régiójában és befolyásolja a távolabbi molekuláris részek konformációját és az allostériát is. Az AT Basel a többi variánshoz képest lassabban köti a heparint, valószínűleg a 22-46 aminosavak által határolt hurokszerkezet konformációváltozása miatt. Miután azonban az AT-heparin kötődés létrejön, az allostérikus aktiváció és az AT Basel-heparin komplex stabilitása nem, vagy csak kis mértékben szenved zavart. Az ATBp3 mutatja a leggyorsabb és legerősebb AT-heparin komplex képződést, bár az allostérikus aktiváció érintett és e mutáció molekula destabilizáló hatással és csökkent termostabilitással is bír. Az ATBp3 variáns patogenitásának komplexitása így bizonyítást nyert: a viszonylag enyhe AT-heparin kötés zavar mellett kvantitatív komponens (csökkent stabilitású fehérje) is jelen van.

- Felismertük, hogy a IIHBS altípusba tartozó ATBp3 mutáció (p.Leu131Phe) a magyarországi ATD populációban kiemelkedően gyakori és polimorf genetikai markerek vizsgálatával elsőként igazoltuk, hogy ennek háttérben alapító hatás áll.

- Direkt, biokémiai és indirekt, in silico módszerekkel igazoltuk új *SERPINC1* variánsok patogenitását. A Pro205 AT (AT Debrecen) szerkezeti torzulása következtében szekréciós zavart szenved; a mutáns AT valószínűleg letér a normál szekréciós útvonalról és az abnormális fehérjék degradációjáért felelős 26S proteaszóma szintjén akkumulálódik. A mutáns AT emellett csökkent specifikus aktivitással is rendelkezik, így végső soron egy komplex, súlyos fenotípust eredményezve. További kilenc új mutáns (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr, p.Pro461Thr) esetében in vitro expressziós kísérletekkel és in silico analízissel bizonyítottunk különböző mechanizmusokat a patogenitás háttérben. Három mutáns esetében (p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile) a protein szintézis zavara, másik három esetben (p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Gly456delins_Ala_Thr) szekréciós zavar okoz I-es típusú ATD-t. A p.Arg78Gly mutáció IIHBS, míg a p.Pro461Thr IIPE típusba sorolható, a szignálpeptidet érintő p.Arg14Lys mutáció patogén szerepe nem igazolódott.

6.2.2 Protein C deficiencia

I-es típusú PC deficiencia háttérben azonosítottuk a p.Ala163Glu és p.Ala163Val variánsokat az EGF2 doménben, valamint a p.Asp77Gly mutációt a Gla doménben. Mindhárom mutáció esetében in vitro expressziós kísérletekben és molekulamodelléssel vizsgáltuk azok következményeit a fehérjére nézve, és megállapítottuk, hogy a 163-as pozíciót érintő mutációk esetében hibás a fehérje foldingja, ami szekréciós zavart idéz elő, ezzel együtt elsőként mutattuk ki a mutáns, szerkezeti torzulást elszenvedett PC 26S proteaszómában történő intracelluláris akkumulációját és fokozott poliubikvitinilációját. A p.Asp77Gly mutációról kimutattuk, hogy I-es típusú deficienciához vezet, azonban sem kóros folding, sem szekréciós zavar nem alakul ki a mutáció következtében. Kimutattuk, hogy a 77Gly PC mennyisége, aktivációja és aktivitása nem különbözik a normál in vitro expresszált PC-től, holott a keringésben a mutáns PC aktivitása és koncentrációja 50% körüli. A p.Asp77Gly mutációval kapcsolatban új, eddig nem vizsgált mechanizmusok (intermolekuláris interakciók megváltozása és/vagy fokozott fehérje clearance) szerepét vetettük fel.

7 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetnyilvánításomat Muszbek László akadémikus felé szeretném mindenekelőtt kifejezni. Ő volt az, aki a pályám elindított és az intézetében működő kutatócsoportba bekapcsolva segített eljutni a szakvizsgáig, a PhD fokozat megszerzéséig és tovább. Tőle tanultam meg a szakmai igényesség iránti elkötelezettséget. Köszönöm Kappelmayer János professzornak a folyamatos támogatását, a tartalmas szakmai beszélgetéseket, szemléletformáló értékrendjét, emberségét és azt, hogy minden helyzetben fordulhatok hozzá tanácsért. Nem tudom eléggé megköszönni Dr. Katona Éva támogatását, aki önzetlenül, a közös kutatómunka iránti elkötelezettséggel és kitartó, precíz munkájával hozzájárult az itt bemutatott eredmények jelentős részéhez és aki különösen közel áll hozzám. Köszönöm külföldi kollaborátor kollégáimnak tudományos, szakmai együttműködésüket, elsősorban Javier Corral és munkacsoportja, Mirjana Kovac és munkacsoportja, valamint Vera Ignjatovic, Mehran Karimi, Jun Teruya, Hiroko Tsuda, Verena Schröder felé tartozom köszönettel. Köszönöm a hazai belgyógyász, hematológus, fül-orr-gégész, kardiológus, gyermekgyógyász, aneszteziológus kollégáknak a folyamatos, magas szakmai színvonalú együttműködést, nélkülük klinikai kutatásaink nem valósulhattak volna meg. Az évtizedek során volt szerencsém olyan kollégákat megismerni, akik példát mutattak számomra emberségből, szakmai igényességből és alázatból. Itt az értekezésben szereplő közleményeim társszerzőit említem, köszönöm Prof. Balla Györgynek, Prof. Boda Zoltánnak, Dr. Ilonczai Péternek, Prof. Kiss Csongornak, Prof. Losonczy Hajjának, Dr. Major Tamásnak, Dr. Marján Erzsébetnek, Dr. Marton Imeldának, Dr. Nagy Ágnesnek, Dr. Nemes Lászlónak, Dr. Oláh Zsoltnak, Prof. Pfliegler Györgynek, Dr. Rázsó Katalinnak, Dr. Róna-Tas Ágnesnek, Dr. Schlammadinger Ágotának, Dr. Selmeczi Annának, Dr. Szegedi Istvánnak, végtelen hálával tartozom nekik. Köszönöm azon, nem intézetünkben dolgozó laboratóriumi szakember, illetve kutató kollégáknak az odaadó, fáradhatatlan és inspiráló munkájukat, akik a vérzékenységek és thrombophiliák kapcsán felbecsülhetetlen segítséget adtak, köszönöm ezt Prof. Ádány Rózának, Dr. Bárdos Helgának, Dr. Kovács Bettinának. Köszönettel tartozom Prof. Balogh Istvánnak, aki TDK társtémavezetőként segítette kezdeti lépéseimet. Köszönöm volt és jelenlegi PhD hallgatóimnak, Dr. Kovács Kittinek, Dr. Gindele Rékának, Dr. Balogh Gábornak, Dr. Kállai Juditnak, Dr. Miklós Tündének és Pituk Dórának az inspiráló közös munkát. Köszönöm a Laboratóriumi Medicina Intézet és a Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék munkatársainak, külön kiemelve a Hemosztázis és a Speciális hemosztázis-genetika részleg mindenkori munkatársait, akik laboratóriumi munkával, vagy adminisztratív segítséggel hozzájárultak az értekezést megalapozó eredményekhez, külön köszönöm a sok támogatást Dr. Kerényi Adrienne-nek, Dr. Pénzes-Daku Krisztinának, néhai Dr. Komáromi Istvánnak, Haramura Gizellának, Molnár Évának, Szabó Zsuzsannának, a sok adminisztratív segítséget Bertók Erzsébetnek és Csúry-

Bagaméry Beátának, aki az értekezés elkészítésében is felbecsülhetetlen segítséget nyújtott. Köszönettel tartozom Dr. Ajzner Évának, akivel azóta is számos szakmai kapocs tart bennünket össze. Korábbi munkatársamnak, Bhattoa-Buzás Edinának köszönöm adminisztratív segítségét. Köszönöm számos TDK hallgatónak, hogy megtiszteltek bizalmukkal és engem választottak témavezetőül, elsősorban Dr. Balla Gábornak, Lajos Anikónak, Speker Mariannának, Udvari Ágnesnek. Köszönöm Prof. Mátyus László dékán úrnak, korábbi TDT elnöknek és Prof. Erdődi Ferenc TDT elnök úrnak a felejthetetlen közös munkát, az atyai-baráti beszélgetéseket. Köszönettel tartozom barátaimnak, zenésztársaimnak a töretlen támogatásért és végül, de annál nagyobb szeretettel köszönöm szüleimnek és családomnak megértő szeretetüket és azt, hogy mindig mellettem állnak.

8 AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

- 1, **Bereczky, Z.**, Bárdos, H., Komáromi, I., Kiss, C., Haramura, G., Ajzner, É., Ádány, R., Muszbek, L.: Factor X Debrecen: Gly204Arg mutation in factor X causes the synthesis of a non-secretable protein and severe factor X deficiency. *Haematologica*. 93 (2), 299-302, **2008**. (Q1)
IF: 5.978
- 2, Kovács, K., Tisza, B., Komáromi, I., Muszbek, L., **Bereczky, Z.**: Inherited factor V deficiency associated with a novel heterozygous missense mutation (p.G493R) in a patient with excessive surgical bleeding. *Thromb. Haemost.* 102 (4), 787-789, **2009**. (Q1)
IF: 4.451
- 3, Karimi, M., **Bereczky, Z.**, Cohan, N., Muszbek, L.: Factor XIII Deficiency. *Semin. Thromb. Hemost.* 35 (4), 426-438, **2009**. (Q1)
IF: 3.214
- 4, **Bereczky, Z.**, Kovács, K., Muszbek, L.: Protein C and protein S deficiencies: similarities and differences between two brothers playing in the same game. *Clin. Chem. Lab. Med.* 48 (Suppl.1), S53-S66, **2010**. (Q2)
IF: 2.069
- 5, Muszbek, L., **Bereczky, Z.**, Kovács, B., Komáromi, I.: Antithrombin deficiency and its laboratory diagnosis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 48 (Suppl.1), S67-S78, **2010**. (Q2)
IF: 2.069
- 6, Szilágyi, S., Péter, A., Magyar, M., Balogh, S., **Bereczky, Z.**: Recurrent arterial thrombosis associated with the antithrombin Basel variant and elevated lipoprotein(a) plasma level in an adolescent patient. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 34 (4), 276-279, **2012**. (Q2)
IF: 0.973
- 7, Kovács, B., **Bereczky, Z.**, Oláh, Z., Gindele, R., Kerényi, A., Selmeczi, A., Boda, Z., Muszbek, L.: The superiority of anti-FXa assay over anti-FIIa assay in detecting heparin-binding site antithrombin deficiency. *Am. J. Clin. Pathol.* 140 (5), 675-679, **2013**. (Q1)
IF: 3.005
- 8, Kovács, B., **Bereczky, Z.**, Selmeczi, A., Gindele, R., Oláh, Z., Kerényi, A., Boda, Z., Muszbek, L.: Progressive chromogenic anti-factor Xa assay and its use in the classification of antithrombin deficiencies. *Clin. Chem. Lab. Med.* 52 (12), 1797-1806, **2014**. (Q1)
IF: 2.707
- 9, Katona, É., Muszbek, L., Devreese, K., Kovács, K., **Bereczky, Z.**, Jonkers, M., Shemirani, A., Mondelaers, V., Ermens, A.: Factor XIII deficiency: complete phenotypic characterization of two cases with novel causative mutations. *Haemophilia*. 20 (1), 114-120, **2014**. (Q1)
IF: 2.603
- 10, Kovács, K., Pataki, I., Bárdos, H., Fekete, A., Pfliegler, G., Haramura, G., Gindele, R., Komáromi, I., Balla, G., Ádány, R., Muszbek, L., **Bereczky, Z.**: Molecular characterization of p.Asp77Gly and the novel p.Alal63Val and p.Alal63Glu mutations causing protein C deficiency. *Thromb. Res.* 135 (4), 718-726, **2015**. (Q2)
IF: 2.32

11, Gindele, R., Oláh, Z., Ilonczai, P., Speker, M., Udvari, Á., Selmecezi, A., Pfliegler, G., Marján, E., Kovács, B., Boda, Z., Muszbek, L., **Bereczky, Z.**: Founder effect is responsible for the p.Leu131Phe heparin-binding-site antithrombin mutation common in Hungary: phenotype analysis in a large cohort. *J. Thromb. Haemost.* 14 (4), 704-715, **2016.** (Q1/D1)
IF: 5.287

12, Major, T., Gindele, R., Szabó, Z., Alef, T., Thiele, B., Bora, L., Kis, Z., Bárdossy, P., Rác, T., Havacs, I., **Bereczky, Z.**: Evidence for the founder effect of a novel ACVRL1 splice-site mutation in Hungarian hereditary hemorrhagic telangiectasia families. *Clin. Genet.* 90 (5), 466-467, **2016.** (Q2)
IF: 3.326

13, Gindele, R., Selmecezi, A., Oláh, Z., Ilonczai, P., Pfliegler, G., Marján, E., Nemes, L., Nagy, Á., Losonczy, H., Mitic, G., Kovacs, M., Balogh, G., Komáromi, I., Schlammadinger, Á., Molnárné Rázsó, K., Boda, Z., Muszbek, L., **Bereczky, Z.**: Clinical and laboratory characteristics of antithrombin deficiencies: a large cohort study from a single diagnostic center. *Thromb. Res.* 160 119-128, **2017.** (Q2)
IF: 2.779

14, Selmecezi, A., Gindele, R., Ilonczai, P., Fekete, A., Komáromi, I., Schlammadinger, Á., Molnárné Rázsó, K., Kovács, K., Bárdos, H., Ádány, R., Muszbek, L., **Bereczky, Z.**, Boda, Z., Oláh, Z.: Antithrombin Debrecen (p.Leu205Pro) - Clinical and molecular characterization of a novel mutation associated with severe thrombotic tendency. *Thromb. Res.* 158 1-7, **2017.** (Q2)
IF: 2.779

15, Kovacs, M., Mitic, G., Mikovic, Z., Mandic, V., Miljic, P., Mitrovic, M., Tomic, B., **Bereczky, Z.**: The influence of specific mutations in the AT gene (SERPINC1) on the type of pregnancy related complications. *Thromb. Res.* 173 12-19, **2019.** (Q2) Hematology
IF: 2.869

16, Kovacs, M., Mitic, G., Djilas, I., Kuzmanovic, M., Serbic, O., Lekovic, D., Tomic, B., **Bereczky, Z.**: Genotype phenotype correlation in a pediatric population with antithrombin deficiency. *Eur. J. Pediatr.* 178 (10), 1471-1478, **2019.** (Q1)
IF: 2.305

17, Gindele, R., Kerényi, A., Kállai, J., Pfliegler, G., Schlammadinger, Á., Szegedi, I., Major, T., Szabó, Z., Bagoly, Z., Kiss, C., Kappelmayer, J., **Bereczky, Z.**: Resolving Differential Diagnostic Problems in von Willebrand Disease, in Fibrinogen Disorders, in Prekallikrein Deficiency and in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia by Next-Generation Sequencing. *Life* (Basel). 11 (3), 1-23, **2021.** (Q2)
IF: 3.251

18, Gindele, R., Péntes-Daku, K., Balogh, G., Kállai, J., Kissné Bogáti, R., Bécsi, B., Erdódi, F., Katona, É., **Bereczky, Z.**: Investigation of the Differences in Antithrombin to Heparin Binding among Antithrombin Budapest 3, Basel, and Padua Mutations by Biochemical and In Silico Methods. *Biomolecules.* 11 (4), 1-18, **2021.** (Q2)
IF: 6.064

19, de la Morena-Barrio, M., Gindele, R., Bravo-Pérez, C., Ilonczai, P., Zuazu, I., Speker, M., Oláh, Z., Rodríguez-Sevilla, J., Entrena, L., Infante, M., Morena-Barrio, B., García, J., Schlammadinger, Á., Cifuentes-Riquelme, R., Mora, -, Miñano, A., Padilla, J., Vicente, V.,

Corral, J., **Bereczky, Z.**: High penetrance of inferior vena cava system atresia in severe thrombophilia caused by homozygous antithrombin Budapest 3 variant: description of a new syndrome. *Am. J. Hematol.* 96 (11), 1363-1373, **2021**. (D1)
IF: 13.265

20, **Bereczky, Z.**, Gindele, R., Fiatal, S., Speker, M., Miklós, T., Balogh, L., Mezei, Z., Szabó, Z., Adány, R.: Age and Origin of the Founder Antithrombin Budapest 3 (p.Leu131Phe) Mutation; Its High Prevalence in the Roma Population and Its Association With Cardiovascular Diseases. *Front. Cardiovasc. Med.* 7 1-15, **2021**. (Q1)
IF: 5.846

21, Kállai, J., Gindele, R., Péntes-Daku, K., Balogh, G., Kissné Bogáti, R., Bécsi, B., Katona, É., Oláh, Z., Ilonczai, P., Boda, Z., Róna-Tas, Á., Nemes, L., Marton, I., **Bereczky, Z.**: Clinical and Molecular Characterization of Nine Novel Antithrombin Mutations. *Int. J. Mol. Sci.* 25 (5), 1-19, **2024**. (Q1/D1)
IF: 4.9 (2023)

9 AZ ÉRTEKEZÉSBEN NEM TÁRGYALT, A PhD FOKOZAT MEGSZERZÉSE ÓTA MEGJELENT NEMZETKÖZI ÉS HAZAI KÖZLEMÉNYEK

1, Muszbek, L., Bagoly, Z., **Bereczky, Z.**, Katona, É.: The involvement of blood coagulation factor XIII in fibrinolysis and thrombosis. *Cardiovasc. Hematol. Agents. Med. Chem.* 6 190-205, **2008.** (Q1)

2, Ilonczai, P., Schlammadinger, Á., Oláh, Z., Molnárné Rázsó, K., **Bereczky, Z.**, Boda, Z.: Temporarily successful eradication therapy in acquired haemophilia with high inhibitor titer: a case report with a new protocol. *Thromb. Haemost.* 100 (1), 149-150, **2008.** (Q1)
IF: 3.803

3, Shemirani, A., Szomják, E., Csiki, Z., Katona, É., **Bereczky, Z.**, Muszbek, L.: Elevated factor XIII level and the risk of peripheral artery disease. *Haematologica.* 93 (9), 1430-1432, **2008.** (Q1)
IF: 5.978

4, Ajzner, É., Schlammadinger, Á., Kerényi, A., **Bereczky, Z.**, Katona, É., Haramura, G., Boda, Z., Muszbek, L.: Severe bleeding complications caused by an autoantibody against the B subunit of plasma factor XIII: a novel form of acquired factor XIII deficiency. *Blood.* 113 (3), 723-725, **2009.** (Q1/D1)
IF: 10.555

5, Bagoly, Z., Fazakas, F., Marosi, A., Török, O., **Bereczky, Z.**, Haramura, G., Tóth, J., Kappelmayer, J., Muszbek, L.: Variant type Glanzmann thrombasthenia caused by homozygous p.724R>X mutation in beta3 integrin. *Thromb. Res.* 125 (5), 427-431, **2010.** (Q2)
IF: 2.372

6, Muszbek, L., **Bereczky, Z.**, Bagoly, Z., Shemirani, A., Katona, É.: Factor XIII and Atherothrombotic Diseases. *Semin. Thromb. Hemost.* 36 (1), 018-033, **2010.** (Q1)
IF: 4.169

7, Kappelmayer, J., Antal, C., **Bereczky, Z.**: Speciális klinikai laboratóriumi vizsgálatok hazai elérhetősége: a Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság Vizsgálati Regisztere. *Orv. Hetil.* 152 (51), 2056-2062, **2011.** (Q3)

8, Mogyorósy, G., Kovács, T., Nagy, A., Kerényi, A., Szöllősi, Z., **Bereczky, Z.**, Kiss, C.: Recurrent intraventricular thrombosis in a child with dilated cardiomyopathy and antithrombin deficiency. *Cardiol. Hung.* 41 (1), 18-21, **2011.**

9, **Bereczky, Z.**, Muszbek, L.: Factor XIII and venous thromboembolism. *Semin. Thromb. Hemost.* 37 (3), 305-314, **2011.** (Q1)
IF: 4.524

10, Muszbek, L., **Bereczky, Z.**, Bagoly, Z., Komáromi, I., Katona, É.: Factor XIII: a Coagulation Factor With Multiple Plasmatic and Cellular Functions. *Physiol. Rev.* 91 (3), 931-972, **2011.** (Q1/D1)
IF: 26.866

- 11, Oláh, Z., **Bereczky, Z.**, Szarvas, M., Boda, Z.: Coagulation: cascade!. *Lancet*. 378 (9792), 740, **2011**. (Q1/D1)
IF: 38.278
- 12, Herczeg, M., Lázár, L., **Bereczky, Z.**, Kövér, K., Timári, I., Kappelmayer, J., Lipták, A., Antus, S., Borbás, A.: Synthesis and Anticoagulant Activity of Bioisosteric Sulfonic-Acid Analogues of the Antithrombin-Binding Pentasaccharide Domain of Heparin. *Chem.-Eur. J.* 18 (34), 10643-10652, **2012**. (Q1/D1)
IF: 5.831
- 13, Balogh, E., **Bereczky, Z.**, Katona, É., Kószegi, Z., Édes, I., Muszbek, L., Czuriga, I.: Interaction between homocysteine and lipoprotein(a) increases the prevalence of coronary artery disease/myocardial infarction in women: a case-control study. *Thromb. Res.* 129 (2), 133-138, **2012**. (Q2)
IF: 3.133
- 14, Árokaszlási, A., Ilonczai, P., Molnárné Rázsó, K., Oláh, Z., **Bereczky, Z.**, Boda, Z., Schlamadinger, Á.: Acquired haemophilia: an often overlooked cause of bleeding - experience from a Hungarian tertiary care centre. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 23 (7), 584-589, **2012**. (Q2)
IF: 1.248
- 15, Zsóri, K., Csiki, Z., Katona, É., **Bereczky, Z.**, Shemirani, A.: Vitamin B12 level in peripheral arterial disease. *J. Thromb. Thrombolysis.* 36 (1), 77-83, **2013**. (Q2)
IF: 2.039
- 16, Kovács, E., Katona, É., **Bereczky, Z.**, Homoródi, N., Balogh, L., Tóth, E., Péterfy, H., Kiss, R., Édes, I., Muszbek, L.: New direct and indirect methods for the detection of cyclooxygenase 1 acetylation by aspirin; the lack of aspirin resistance among healthy individuals. *Thromb. Res.* 131 (4), 320-324, **2013**. (Q2)
IF: 2.427
- 17, Oláh, Z., Szarvas, M., **Bereczky, Z.**, Kerényi, A., Kappelmayer, J., Boda, Z.: Direct thrombin inhibitors and factor Xa inhibitors can influence the diluted prothrombin time used as the initial screen for lupus anticoagulant. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 137 (7), 967-973, **2013**. (Q1/D1)
IF: 2.884
- 18, Kovac, M., Mitic, G., Miljic, P., Mikovic, Z., Mandic, V., Djordjevic, V., Radojkovic, D., **Bereczky, Z.**, Muszbek, L.: Poor pregnancy outcome in women with homozygous type-II HBS antithrombin deficiency. *Thromb. Res.* 133 (6), 1158-1160, **2014**. (Q2)
IF: 2.447
- 19, Shemirani, A., Antalfi, B., Pongrácz, E., Mezei, Z., **Bereczky, Z.**, Csiki, Z.: Factor XIII-A subunit Val34Leu polymorphism in fatal atherothrombotic ischemic stroke. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 25 (4), 364-368, **2014**. (Q2)
IF: 1.403
- 20, Kovács, E., Katona, É., **Bereczky, Z.**, Homoródi, N., Balogh, L., Tóth, E., Péterfy, H., Kiss, R., Édes, I., Muszbek, L.: Evaluation of laboratory methods routinely used to detect the effect of aspirin against new reference methods. *Thromb. Res.* 133 (5), 811-816, **2014**. (Q2)
IF: 2.447

- 21, Árokszállási, A., Kerényi, A., Katona, É., **Bereczky, Z.**, Muszbek, L., Boda, Z., Schlammadinger, Á.: The use of recombinant factor XIII in a major bleeding episode of a patient with congenital factor XIII deficiency - the first experience. *Haemophilia*. 21 (1), e118-e121, **2015**. (Q1)
IF: 2.673
- 22, Ilonczai, P., Oláh, Z., Selmeczi, A., Kerényi, A., **Bereczky, Z.**, Póka, R., Schlammadinger, Á., Boda, Z.: Management and outcome of pregnancies in women with antithrombin deficiency: a single-center experience and review of literature. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 26 (7), 798-804, **2015**. (Q2)
IF: 1.242
- 23, Mezei, Z., **Bereczky, Z.**, Katona, É., Gindele, R., Balogh, E., Fialat, S., Balogh, L., Czuriga, I., Ádány, R., Édes, I., Muszbek, L.: Factor XIII B Subunit Polymorphisms and the Risk of Coronary Artery Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 16 (1), 1143-1159, **2015**. (Q1)
IF: 3.257
- 24, Tóth, L., Fekete, A., Balogh, G., **Bereczky, Z.**, Komáromi, I.: Dynamic properties of the native free antithrombin from molecular dynamics simulations: computational evidence for solvent-exposed Arg393 side chain. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 33 (9), 2023-2036, **2015**. (Q2)
IF: 2.3
- 25, Homoródi, N., Kovács, E., Leé, S., Katona, É., Shemirani, A., Haramura, G., Balogh, L., **Bereczky, Z.**, Szóke, G., Péterfy, H., Kiss, R., Édes, I., Muszbek, L.: The lack of aspirin resistance in patients with coronary artery disease. *J. Transl. Med.* 14 (1), 74, **2016**. (Q1/D1)
IF: 3.786
- 26, Mezei, Z., Katona, É., Kállai, J., **Bereczky, Z.**, Molnár, É., Kovács, B., Ajzner, É., Bagoly, Z., Miklós, T., Muszbek, L.: Regulation of plasma factor XIII levels in healthy individuals; a major impact by subunit B intron K c.1952+144 C>G polymorphism. *Thromb. Res.* 148 101-106, **2016**. (Q2)
IF: 2.65
- 27, Kovac, M., Mitic, G., Mikovic, Z., Djordjevic, V., Muszbek, L., **Bereczky, Z.**: Pregnancy related stroke in the setting of homozygous type-II HBS antithrombin deficiency. *Thromb. Res.* 139 111-113, **2016**. (Q2)
IF: 2.65
- 28, Balogh, E., Maros, T., Daragó, A., Csapó, K., Herczegh, B., Nyul, B., Czuriga, I., **Bereczky, Z.**, Édes, I., Kőszegi, Z.: Plasma homocysteine levels are related to medium-term venous graft degeneration in coronary artery bypass graft patients. *Anatol. J. Cardiol.* 16 (11), 868-873, **2016**.
IF: 1.19
- 29, **Bereczky, Z.**, Gindele, R., Speker, M., Kállai, J.: Deficiencies of the natural anticoagulants: novel clinical laboratory aspects of thrombophilia testing. *EJIFCC*. 27 (2), 130-146, **2016**.
- 30, Péntes-Daku, K., Vezina, C., **Bereczky, Z.**, Katona, É., Kun, M., Muszbek, L., Rivard, G.: Alloantibody developed in a factor XIII A subunit deficient patient during substitution therapy: characterization of the antibody. *Haemophilia*. 22 (2), 268-275, **2016**. (Q1/D1)
IF: 3.569

- 31, Frenzl, I., Katkó, M., Galgóczi, E., Boda, J., Zsíros, N., Némethi, Z., **Bereczky, Z.**, Hudák, R., Kappelmayer, J., Erdei, A., Turchányi, B., Nagy, E.: Plasminogen Activator Inhibitor Type 1: a Possible Novel Biomarker of Late Pituitary Dysfunction after Mild Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma*. 34 (23), 3238-3244, **2017**. (Q1/D1)
IF: 5.002
- 32, Tóth, N., Csanádi, Z., Hajas, O., Kiss, A., Nagy-Baló, E., Kovács, K., Sarkady, F., Muszbek, L., **Bereczky, Z.**, Csiba, L., Bagoly, Z.: Intracardiac hemostasis and fibrinolysis parameters in patients with atrial fibrillation. *Biomed Res. Int.* 2017 1-10, **2017**. (Q1)
IF: 2.583
- 33, Mezei, Z., Katona, É., Kállai, J., **Bereczky, Z.**, Somodi, L., Molnár, É., Kovács, B., Miklós, T., Ajzner, É., Muszbek, L.: Factor XIII levels and factor XIII B subunit polymorphisms in patients with venous thromboembolism. *Thromb. Res.* 158 93-97, **2017**. (Q2)
IF: 2.779
- 34, Kerényi, A., Bekéné Debreceni, I., Oláh, Z., Ilonczai, P., **Bereczky, Z.**, Nagy, B., Muszbek, L., Kappelmayer, J.: Evaluation of flow cytometric HIT assays in relation to an IgG-specific immunoassay and clinical outcome. *Cytom. Part B-Clin. Cytom.* 92 (5), 389-397, **2017**. (Q1)
IF: 2.757
- 35, Kovac, M., Mitic, G., Jesic, M., Djordjevic, V., Muszbek, L., **Bereczky, Z.**: Early onset of abdominal venous thrombosis in a newborn with homozygous type II heparin-binding site antithrombin deficiency. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 28 (3), 264-266, **2017**. (Q3)
IF: 1.119
- 36, **Bereczky, Z.**, Oláh, Z., Ajzner, É., Kappelmayer, J.: Az új orális antikoagulánsokkal történő kezelés laboratóriumi vonatkozásai. *Orvosi Hetilap*. 158 (49), 1930-1945, **2017**. (Q4)
IF: 0.322
- 37, Demeter, F., Gyöngyösi, T., **Bereczky, Z.**, Kövér, K., Herczeg, M., Borbás, A.: Replacement of the L-iduronic acid unit of the anticoagulant pentasaccharide idraparinux by a 6-deoxy-Ltalopyranose: synthesis and conformational analysis. *Sci Rep.* 8 (1), 1-10, **2018**. (Q1/D1)
IF: 4.011
- 38, Székely, E., Czuriga-Kovács, K., **Bereczky, Z.**, Katona, É., Mezei, Z., Nagy, A., Tóth, N., Berényi, E., Muszbek, L., Csiba, L., Bagoly, Z.: Low factor XIII levels after intravenous thrombolysis predict short-term mortality in ischemic stroke patients. *Sci. Rep.* 8 (1), 1-9, **2018**. (Q1/D1)
IF: 4.011
- 39, Kovac, M., Mitic, G., Lalic-Cosic, S., Djordjevic, V., Tomic, B., Muszbek, L., **Bereczky, Z.**: Evaluation of endogenous thrombin potential among patients with antithrombin deficiency. *Thromb. Res.* 166 50-53, **2018**. (Q2)
IF: 3.266
- 40, Balogh, L., Katona, É., Mezei, Z., Kállai, J., Gindele, R., Édes, I., Muszbek, L., Papp, Z., **Bereczky, Z.**: Effect of factor XIII levels and polymorphisms on the risk of myocardial infarction in young patients. *Mol. Cell. Biochem.* 448 (1-2), 199-209, **2018**. (Q1)
IF: 2.884

- 41, Árokszállási, A., Molnárné Rázsó, K., Ilonczai, P., Oláh, Z., **Bereczky, Z.**, Boda, Z., Schlammadinger, Á.: A decade-long clinical experience on the prophylactic use of activated prothrombin complex concentrate in acquired haemophilia A: a case series from a tertiary care centre. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 29 (3), 282-287, **2018**. (Q3)
IF: 1.12
- 42, Salamon, A., Faragó, P., Németh, V., Szépfalusi, N., Horváth, E., Vass, A., **Bereczky, Z.**, Tajti, J., Vécsei, L., Klivényi, P., Zádori, D.: Multiplex ischaemic stroke Osler-Rendu-Weberkórban. *Ideggyogy. Szle*. 72 (1-2), 65-70, **2019**. (Q4)
IF: 0.337
- 43, **Bereczky, Z.**, Balogh, L., Bagoly, Z.: Inherited thrombophilia and the risk of myocardial infarction: current evidence and uncertainties. *Kardiol. Pol*. 77 (4), 419-429, **2019**. (Q3)
IF: 1.874
- 44, Kovács, S., Csiki, Z., Zsóri, K., **Bereczky, Z.**, Shemirani, A.: Characteristics of platelet count and size and diagnostic accuracy of mean platelet volume in patients with venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis. *Platelets*. 30 (2), 139-147, **2019**. (Q1)
IF: 3.378
- 45, Teráz-Orosz, A., Csapó, A., Bagoly, Z., Székely, E., Tóth, E., Kovács, B., **Bereczky, Z.**, Muszbek, L., Katona, É.: A new ELISA method for the measurement of total α 2-plasmin inhibitor level in human body fluids. *J. Immunol. Methods*. 471 27-33, **2019**. (Q2)
IF: 1.901
- 46, Major, T., Gindele, R., Szabó, Z., Jóni, N., Kis, Z., Bora, L., Bárdossy, P., Rác, T., Karosi, T., **Bereczky, Z.**: A hereditary haemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu-kór) genetikai diagnosztikája. *Orv. hetil*. 160 (18), 710-719, **2019**. (Q3)
IF: 0.497
- 47, Major, T., Gindele, R., Szabó, Z., Kis, Z., Bora, L., Jóni, N., Bárdossy, P., Rác, T., **Bereczky, Z.**: The Stratified Population Screening of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Pathol. Oncol. Res*. 26 (4), 2783-2788, **2020**. (Q2)
IF: 3.201
- 48, Bege, M., Bereczki, I., Molnár, D., Kicsák, M., Péntes-Daku, K., **Bereczky, Z.**, Ferenc, G., Kovács, L., Herczegh, P., Borbás, A.: Synthesis and oligomerization of cysteinyl nucleosides. *Org. Biomol. Chem*. 18 8161-8178, **2020**. (Q1)
IF: 3.876
- 49, Tsuda, H., Noguchi, K., Oh, D., **Bereczky, Z.**, Lee, L., Kang, D., Duse, L., Carvalho, M., Morishita, E., SSC Subcommittee on Plasma Coagulation Inhibitors of the ISTH: Racial differences in protein S Tokushima and two protein C variants as genetic risk factors for venous thromboembolism. *Res. Pract. Thromb. Haemost*. 4 (8), 1295-1300, **2020**.
- 50, Sadeghi, F., Kovács, S., Zsóri, K., Csiki, Z., **Bereczky, Z.**, Shemirani, A.: Platelet count and mean volume in acute stroke: a systematic review and meta-analysis. *Platelets*. 31 (6), 731-739, **2020**. (Q2)
IF: 3.862

- 51, Major, T., Csobay-Novák, C., Gindele, R., Szabó, Z., Bora, L., Jóni, N., Rác, T., Karosi, T., **Bereczky, Z.**: Pitfalls of delaying the diagnosis of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J. Int. Med. Res.* 48 (2), 1-7, **2020**. (Q3)
IF: 1.671
- 52, Balogh, G., Komáromi, I., **Bereczky, Z.**: The mechanism of high affinity pentasaccharide binding to antithrombin, insights from Gaussian accelerated molecular dynamics simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 38 (16), 4718-4732, **2020** (Q3)
- 53, Natae, S., Kósa, Z., Sándor, J., Merzah, M., **Bereczky, Z.**, Pikó, P., Ádány, R., Fialat, S.: The Higher Prevalence of Venous Thromboembolism in the Hungarian Roma Population Could Be Due to Elevated Genetic Risk and Stronger Gene-Environmental Interactions. *Front. Cardiovasc. Med.* 8 1-13, **2021**. (Q1)
IF: 5.846
- 54, Reményi, G., **Bereczky, Z.**, Gindele, R., Ujfalusi, A., Illés, Á., Udvardy, M.: rs779805 Von Hippel-Lindau Gene Polymorphism Induced/Related Polycythemia Entity, Clinical Features, Cancer Association, and Familial Characteristics. *Pathol. Oncol. Res.* 27 1-6, **2021**. (Q2)
IF: 2.874
- 55, Mátrai, Á., Varga, G., Tánzos, B., Baráth, B., Varga, Á., Horváth, L., **Bereczky, Z.**, Deák, Á., Németh, N.: In vitro effects of temperature on red blood cell deformability and membrane stability in human and various vertebrate species. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 78 (3), 291-300, **2021**. (Q3)
IF: 2.411
- 56, Plamenova, I., Zolkova, J., Sokol, J., Kolkova, Z., **Bereczky, Z.**, Katona, É., Muszbek, L., Kubisz, P., Staško, J.: Genetic Background of Inherited Factor XIII-A Subunit Deficiency: review of the Literature and Description of Two New Cases. *Semin. Thromb. Hemost.* 47 (7), 885-889, **2021**. (Q1)
IF: 6.398
- 57, Major, T., Gindele, R., Balogh, G., Bárdossy, P., **Bereczky, Z.**: Founder Effects in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *J Clin Med.* 10 (8), 1-20, **2021**. (Q1)
IF: 4.964
- 58, Baráth, B., Somogyi, V., Tánzos, B., Varga, Á., **Bereczky, Z.**, Németh, N., Deák, Á.: Examination of the relation between red blood cell aggregation and hematocrit in human and various experimental animals. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 78 (2), 187-198, **2021**. (Q3)
IF: 2.411
- 59, Baráth, B., Kissné Bogáti, R., Miklós, T., Kállai, J., Mezei, Z., **Bereczky, Z.**, Muszbek, L., Katona, É.: Effect of [alfa]2-plasmin inhibitor heterogeneity on the risk of venous thromboembolism. *Thromb. Res.* 203 110-116, **2021**. (Q1)
IF: 10.407
- 60, Magyari, F., Kracsó, B., Bedekovics, J., **Bereczky, Z.**, Illés, Á., Schlamadinger, Á.: Differential diagnostic and treatment difficulties in a patient with acquired von Willebrand syndrome. *Hematology.* 26 (1), 301-304, **2021**. (Q3)
IF: 2.264

- 61, Kovács, A., Tajti, B., Szoboszlai, I., **Bereczky, Z.**, Ilonczai, P.: A szerzett haemophilia A sikeres kezelése. *Orv. hetil.* 162 (49), 1977-1981, **2021.** (Q4)
IF: 0.707
- 62, Major, T., **Bereczky, Z.**, Gindele, R., Balogh, G., Rácz, B., Bora, L., Kézsmárki, Z., Brúgós, B., Pfliegler, G.: Current Status of Clinical and Genetic Screening of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Families in Hungary. *J Clin Med.* 10 (17), 1-17, **2021.** (Q1)
IF: 4.964
- 63, Herczeg, M., Demeter, F., Lisztes, E., Racskó, M., Tóth, I., Timári, I., **Bereczky, Z.**, Kövér, K., Borbás, A.: Synthesis of a Heparinoid Pentasaccharide Containing L-Guluronic Acid Instead of L-Iduronic Acid with Preserved Anticoagulant Activity. *J. Org. Chem.* 87 (23), 15830-15836, **2022.** (Q1)
IF: 3.6
- 64, Balogh, G., **Bereczky, Z.:** The Interaction of Factor Xa and IXa with Non-Activated Antithrombin in Michaelis Complex: Insights from Enhanced-Sampling Molecular Dynamics Simulations. *Biomolecules.* 13 (5), 1-21, **2023.** (Q1)
IF: 4.8
- 65, Pituk, D., Miklós, T., Schlammadinger, Á., Molnárné Rázsó, K., **Bereczky, Z.:** The association between EPCR gene p.Ser219Gly polymorphism and venous thromboembolism risk: a case-control study, meta-analysis, and a reproducibility study. *Front. Cardiovasc. Med.* 10 1-14, **2023.** (Q2)
IF: 2.8
- 66, Szegedi, K., Szabó, Z., Kállai, J., Király, J., Szabó, E., **Bereczky, Z.**, Juhász, É., Dezső, B., Szász, C., Zsebik, B., Flaskó, T., Halmos, G.: Potential Role of VHL, PTEN, and BAP1 Mutations in Renal Tumors. *J Clin Med.* 12 (13), 1-18, **2023.** (Q1)
IF: 3
- 67, Kovács, E., **Bereczky, Z.**, Kerényi, A., Laczik, R., Nagy, V., Kovács, D., Kovács, S., Pfliegler, G.: Clinical investigation of hereditary and acquired thrombophilic factors in patients with venous and arterial thromboembolism. *Int J Gen Med.* 16 5425-5437, **2023.** (Q2)
IF: 2.1
- 68, Natorska, J., Corral, J., de la Morena-Barrio, ME., Bravo-Pérez, C., Bagoly, Z., **Bereczky, Z.**, Treliński, J., Witkowski, M., Klajmon, A., Undas, A., Ząbczyk, M.: Antithrombin Deficiency Is Associated with Prothrombotic Plasma Fibrin Clot Phenotype. *Thromb. Haemost.* 123 (9), 880-891, **2023.** (Q1)
IF: 5
- 69, Natae, S., Merzah, M., Sándor, J., Ádány, R., **Bereczky, Z.**, Fialat, S.: A combination of strongly associated prothrombotic single nucleotide polymorphisms could efficiently predict venous thrombosis risk. *Front. Cardiovasc. Med.* 10 1-11, **2023.** (Q2)
IF: 2.8
- 70, Balogh, G., **Bereczky, Z.:** Molecular Mechanisms of the Impaired Heparin Pentasaccharide Interactions in 10 Antithrombin Heparin Binding Site Mutants Revealed by Enhanced Sampling Molecular Dynamics. *Biomolecules.* 14 (6), 657, **2024.** (Q1)
IF: 4.8 (2023)

71, Kovac, M., Ignjatovic, V., Orlando, C., **Berezky, Z.**, Hunt, B.J. The use of DOACs in the secondary prevention of venous thromboembolism in patients with severe thrombophilia: communication from the ISTH SSC Subcommittee on Physiological Anticoagulants and Thrombophilia. *J. Thromb. Haemost.* S1538-7836 (24)00492-6., **2024.** (Q1)
IF: 5.5 (2023)

72, Pituk, D., Balogh L., Horváth E., Hegyi Z., Bráth B., Bogáti R., Szűcs P., Papp Z., Katona É., **Berezky Z.** Localization of hemostasis elements in aspirated coronary thrombi at different stages of evolution. *Int. J. Mol. Sci.* 25 (21), 11746., **2024.** (Q1)
IF: 4.9 (2023)

10 CSOPORTOS (MULTICENTRIKUS) KÖZLEMÉNYBEN SZAKMAI KÖZREMŰKÖDŐ

Pflegler, G., Blaskó, G., Boda, Z., Csiba, L., Dávid, M., Kappelmayer, J., Kiss, R., Losonczy, H., Udvardy, M., Ajzner, É., Altorjay, I., Antal, I., Ballagi, F., Barabás, J., Barna, B., **Berezky, Z.**, Bodoky, G., Böszörményi-Nagy, G., Bucsi, L., Büki, A., Csepregi, G., Czuriga, I., Faluhelyi, A., Farkas, K., Folyovich, A., Fónay, K., Fröhlich, P., Fülesdi, B., Horváth, A., Járαι, Z., Joób-Fancsal, Á., Kiss, Á., Kollár, J., Kristóf, T., Landi, A., Lengyel, M., Mátyus, J., Meskó, É., Méray, J., Merkely, B., Molnár, C., Nádas, I., Nemes, A., Németh, J., Németh, Z., Noviczki, M., Orosz, M., Orosz, P., Oroszlán, G., Pápai, Z., Pécsvárad, Z., Préda, I., Pucso, J., Rákóczi, I., Rudas, L., Sas, G., Sándor, T., Szabó, T., Szedlák, B., Szegedi, J., Szendrői, M., Székely, H., Szigeti, I., Tar, A., Tulassay, Z., Vezendi, K., Vimláci, L.:
A thromboembolia kockázatának csökkentése és kezelése. *Orv. Hetil.* 150 (52), 2335-2404, **2009.**

11 SZERKESZTETT FELSŐOKTATÁSI TANKÖNYV, SZAKKÖNYV

1, **Berezky, Z.**, Muszbek, L.: A klinikai kutatások tervezése és kivitelezése: elméleti és módszertani alapok. *Medicina*, Budapest, 216 p., 2011.

2, **Berezky, Z.**, Bagoly, Z., Katona, E.: Klinikai kutatások; átfogó ismeretek a tervezéstől a közlésig. *Medicina*, Budapest, 316 p., 2024.

12 FELSŐOKTATÁSI TANKÖNYV RÉSZEK

Berezky, Z., Kerényi, A.: Haemorrhagias diathesisek vizsgálása. In: Laboratóriumi diagnosztikai gyakorlatok. Szerk: Kappelmayer, János; Muszbek, László. Debrecen, Magyarország: Debreceni Egyetem, 2010., 2016., 2023.

Berezky, Z., Kerényi, A.: Thrombophilia, prethromboticus, thrombotikus állapotok és DIC diagnosztikája. In: Laboratóriumi diagnosztikai gyakorlatok. Szerk: Kappelmayer, János; Muszbek, László. Debrecen, Magyarország: Debreceni Egyetem, 2010., 2016., 2023.

Berezky, Z., Kerényi, A.: Antikoaguláns, fibrinolitikus és thrombocytá funkció gátló terápia laboratóriumi kontrollja. In: Laboratóriumi diagnosztikai gyakorlatok. Szerk: Kappelmayer, János; Muszbek, László. Debrecen, Magyarország: Debreceni Egyetem, 2010., 2016., 2023.

Berezky, Z., Kerényi, A.: Investigation of haemorrhagic diatheses. In: Practicals in laboratory medicine. Szerk.: Kappelmayer, János; Muszbek, László. Debrecen, Magyarország: Debreceni Egyetem, 2010., 2016., 2023.

Bereczky, Z., Kerényi, A.: Diagnostics of thrombophilia, prethrombotic, thrombotic states and DIC. In: Practicals in laboratory medicine. Szerk.: Kappelmayer, János; Muszbek, László. Debrecen, Magyarország: Debreceni Egyetem, 2010., 2016., 2023.

Bereczky, Z., Kerényi, A.: Laboratory control of anticoagulant, fibrinolytic and antiplatelet therapy. In: Practicals in laboratory medicine. Szerk.: Kappelmayer, János; Muszbek, László. Debrecen, Magyarország: Debreceni Egyetem, 2010., 2016., 2023.

Bereczky, Z.: A helyes tudományos kérdésfelvetés, hipotézisalkotás. In: A klinikai kutatások tervezése és kivitelezése: elméleti és módszertani alapok. Szerk.: Bereczky Zsuzsanna, Muszbek László, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 15-22, 2011.

Bereczky, Z.: A klinikai kutatás tárgya, szerepe az orvostudományban, történeti áttekintés. In: A klinikai kutatások tervezése és kivitelezése: elméleti és módszertani alapok. Szerk.: Bereczky Zsuzsanna, Muszbek László, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 9-14, 2011.

Bereczky, Z.: A klinikai tanulmányok megtervezése, protokollírás, költségtervezés. In: A klinikai kutatások tervezése és kivitelezése: elméleti és módszertani alapok. Szerk.: Bereczky Zsuzsanna, Muszbek László, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 89-98, 2011.

Muszbek, L., **Bereczky, Z.:** A megfigyelésen alapuló (obszervációs) tanulmányok és közlésük javítására irányuló törekvések. In: A klinikai kutatások tervezése és kivitelezése: elméleti és módszertani alapok. Szerk.: Bereczky Zsuzsanna, Muszbek László, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 37-44, 2011.

Bereczky, Z.: Az obszervációs klinikai tanulmányok résztvevőinek kiválasztása, a résztvevők számának meghatározása. In: A klinikai kutatások tervezése és kivitelezése: elméleti és módszertani alapok. Szerk.: Bereczky Zsuzsanna, Muszbek László, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 65-75, 2011.

Bereczky, Z. A véralvadás genetikai eredetű zavarai In: Oláh Éva (szerk.) Klinikai genetika – egyetemi tankönyv Medicina, Budapest, 487-500, 2015. ISBN: 9789632265407

13 KÖNYVFEJEZET, SZAKTANULMÁNY

Muszbek, L., **Bereczky, Z.,** Katona, É.: Blood coagulation factor XIII: involvement in fibrinolysis and thrombosis. In: Thrombosis : fundamental and clinical aspects. Ed.: by J. Arnout [et al.], Leuven University Press, Leuven, Belgium, 197-224, 2003. ISBN: 9058673359

Bereczky, Z., Fialat, S., Muszbek, L.: Szív- és érrendszeri betegségek. In: Népegészségügyi Genomika. Szerk.: Ádány Róza, Sándor Judit, Angela Brand; Medicina, Budapest, 121-143, 2013. ISBN: 9789632263885

Schroeder, V., **Bereczky, Z.,** Kohler, H.: Factor XIII in thrombotic diseases. In: Factor XIII Clinical and Laboratory Aspects - ECAT Foundation. Eds.: Helena Laboratories, ECAT Foundation, Voorschoten, 8-12, 2017.

Bereczky, Z.: A klinikai kutatások definíciója, szerepe az orvos-és egészségtudományi kutatásokban; a klinikai kutatások története. In: Klinikai kutatások; átfogó ismeretek a tervezéstől a közlésig. Szerk.: Bereczky, Z., Bagoly, Z., Katona, E, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 19-28, 2024.

Bereczky, Z.: A helyes tudományos kérdésfelvetés; hogyan jutunk el az ötlettől a tudományos hipotézisek megfogalmazásáig? In: Klinikai kutatások; átfogó ismeretek a tervezéstől a közlésig. Szerk.: Bereczky, Z., Bagoly, Z., Katona, E, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 29-42, 2024.

Bereczky, Z.: A klinikai kutatások alaptípusai; hogyan határozza meg a tudományos kérdés a klinikai tanulmány típusát? In: Klinikai kutatások; átfogó ismeretek a tervezéstől a közlésig. Szerk.: Bereczky, Z., Bagoly, Z., Katona, E, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 43-48, 2024.

Bereczky, Z., Muszbek, L.: Hibalehetőségek az analitikus obszervációs tanulmányok tervezése és kivitelezése során; a hibák csökkentésének módszerei. In: Klinikai kutatások; átfogó ismeretek a tervezéstől a közlésig. Szerk.: Bereczky, Z., Bagoly, Z., Katona, E, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 73-84, 2024.

Bereczky, Z.: Protokollok a klinikai kutatásokban. In: Klinikai kutatások; átfogó ismeretek a tervezéstől a közlésig. Szerk.: Bereczky, Z., Bagoly, Z., Katona, E, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 111-122, 2024

14 TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

Bereczky Zsuzsanna tudományos és oktatói munkásságának összefoglalása (2025.01.21)
MTA V. Orvosi Tudományok Osztálya

Tudományos közlemények	Száma		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratcikk²	106			
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű		71	917	1143
szakcikk hazai idegen nyelvű		1	0	0
szakcikk magyar nyelvű		12	11	15
szakcikk sokszerzős, érdemi szerzőként ³		0	0	0
összefoglaló közlemény		10	580	665
rövid közlemény		12	120	185
II. Könyvek	2			
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv		0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	2			
idegen nyelvű		0		
magyar nyelvű		1		
bb) Felsőoktatási tankönyv		1		
III. Könyvrészlet	13			
idegen nyelvű		1	0	5
magyar nyelvű		6	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet		6	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	0		0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)		2	0	0
Tudományos közlemények összesen (I.-IV)		114	1628	2013
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV)	121		1628	2013
V. További tudományos művek	8			
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratban megjelent teljes folyóiratcikket is		4	2	3
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		4	4	11
Oltalmak (szabadalmak)		0	0	0
VI. Hivatkozott absztraktok⁵	1		3	3
Összes hivatkozás¹			1637	2030
Hirsch index⁶	22			
g index⁶	42			

Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	12	254
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	24	196
A tudományos fokozat (PhD 2007) elnyerése utáni teljes tudományos folyóiratcikkek száma	89	1764
Az utolsó 10 év (2015-) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	60	525
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	410	20,2%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben		113
Jelentés, guideline	2	5
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0