

Válasz

Dr. Prohászka Zoltán

„Ritka hemosztázis kórképek klinikai és laboratóriumi vizsgálata; új diagnosztikai szempontok hemosztázis rendellenességeiben” című MTA doktori értekezésem opponensi bírálatára

Hálás vagyok opponensemnek az MTA doktori értekezésem elismerő bírálatáért. Külön köszönöm, hogy méltatta azt a törekvésemet, hogy a különféle ritka hemosztázis zavarokat egységes koncepcióban, azonos szempontok szerint vizsgáltam és mutattam be, ami e komplex szakterületen egyáltalán nem könnyű.

Köszönöm elgondolkodtató kérdéseit, melyekkel egyrészt rávilágít a hemosztázis diagnosztika területén még megoldandó problémákra, illetve újabb, érdekes kutatási irányvonalat vázol fel. E kérdésekre az alábbiakban válaszolok.

1, A klinikai kép és a molekuláris jelenségek heterogenitására vonatkozó kérdés:

Dolgozatában több helyen tárgyalja (talán legrészletesebben az V. faktor deficienciánál) azt a gyakorlatban ismert jelenséget, hogy a hemosztázis szűrőtesztjei nem feltétlen jelzik a részleges hiányállapotokat, valamint egyes esetekben a heterozigóta ritka variáció hordozó családtagok tünetmentesek lehetnek. Munkássága és tapasztalatai alapján milyen javaslatai lennének a jövő fejlesztésére nézve: hogy lehetne ezt a helyzetet javítani, vagyis a klinikai relevanciával járó molekuláris eltéréseket megbízhatóbban felismerni?

A kérdés rendkívül összetett, de éppen ezért lehetőséget teremt arra, hogy kifejtsem véleményemet a jelenlegi laboratóriumi diagnosztika hiányosságairól és bizonytalanságairól, valamint a jövő törekvéseiről és e törekvések még jelenlegi korlátairól.

Mind a vérzékenységek, mind a thrombophiliák vonatkozásában, több évtizedes múlta visszatekintő módon, a diagnosztika alapját funkcionális laboratóriumi vizsgálatok jelentették (jelentik). Ismerve a véralvadási folyamatok biokémiáját, olyan tesztek kidolgozása történt a múltban, melyek konkrétan egy-egy véralvadásban részt vevő fehérje funkcióját, vagy mennyiségét tudták mérni. (Válaszomban most eltekintek a thrombocyta funkció zavarokról, ahol a funkcionális laboratóriumi vizsgálatok nem teljesen ezt a koncepciót követik.) Ezek a tesztek rendkívül hasznosak abban a tekintetben, hogy megjelölik a kóros fehérjét és irányítják a további, speciális diagnosztika menetét. E klasszikus laboratóriumi tesztek egyre jobban standardizáltak és minőségbiztosítottak, jól definiált mérési protokollokkal (*pl. External quality Control of diagnostic Assays and Tests with a focus on Thrombosis and Haemostasis, ecat.nl, vagy Nigel S. Key, Michael Makris, David Lillicrap (eds.) Practical Hemostasis and Thrombosis. Wiley, 2017, ISBN:9781118344712*). E tesztek azonban gyakran nem alkalmasak arra, hogy az adott betegben a vérzés, vagy thrombosis kockázatának mértékét meghatározzák. Jól ismert például az, hogy az alvadási faktor aktivitás értékek, amiket e funkcionális tesztekben kapunk, nem mindig állnak arányban a vérzékenység súlyosságának mértékével, vagy például a természetes antikoagulánsok plazma szintjei (inkább aktivitás értékei) nem jól demonstrálják a thrombosis kockázatát. Előbbire jó példa a VII-es faktor (FVII) deficiencia, ahol egyes homozigóta személyek, annak ellenére, hogy az egyfázisú alvadási tesztben 1% alatti (vagy nagyon alacsony) FVII aktivitást mérünk, mégsem súlyosan vérzékenyek (*Napolitano et al. Factor VII Deficiency: Clinical Phenotype, Genotype and Therapy. J. Clin. Med. 2017; 6: 38.*). Nem került be a dolgozatba az a 30 éves betegünk, akinek FVII deficienciáját véletlenül, már egy veseműtétet követően diagnosztizáltuk, ami nagyobb vérveszteség nélkül zajlott, és akinek FVII aktivitása az egyfázisú alvadási tesztben 1% alatt

volt, a háttérben a p.Glu45Gly eltérést találtuk homozigóta formában, ami a gamma-karboxi glutaminsav régió egyik glutamátját érinti és szerepe van a K-vitamin függő FVII poszt-transzlációs karboxilációjában, ami a faktor funkciójának szempontjából lényeges lépés. (Az is igaz azonban, hogy a FVII-ban több karboxilációs pont is van és a mutáció csak az egyiket érintette.) Rejtély, hogy e beteg miért nem vérzékeny, holott a funkcionális teszt eredménye alapján súlyos fenotípust várnánk. Kromogén módszertannal – ami egyáltalán nem elterjedt a rutin laboratóriumi diagnosztikában – is megvizsgáltuk a beteg FVII aktivitását, mely tesztben jóval magasabb, 34%-os aktivitást észleltünk. Ez az eredmény sokkal jobban közelít a klinikumhoz és arra is rávilágít, hogy léteznek olyan FVII variánsok, melyek különbözően viselkednek a különböző típusú funkcionális tesztekben. A tesztek teljesítőképességének korlátaira jól rávilágít az antitrombin deficiencia esete is, ahol a jóval enyhébb fenotípussal járó IIHBS típusú heterozigóták a súlyos, I-es típusú heterozigótákkal hasonló antitrombin aktivitás értékeket mutatnak az általánosan elterjedt funkcionális tesztekben (*Krujit et al. Novel insights into antithrombin deficiency enabled by mass spectrometry-based precision diagnostics. J Thromb Haemost. 2025;23:210–221.*) A koaguláció szűrőtesztjei, melyeket vérzékenység gyanúja esetén általában elsőként elvégeznek, olyan aktivátor koncentrációkat és teszt körülményeket tartalmaznak, hogy kb. 30%-os alvadásifaktor aktivitás értékek alatt jelezenek megnyúlással. Ez a határérték általában kielégítően működik, de, ahogyan opponensem is utalt rá kérdésében, nem minden esetben korrelál a vérzékenység súlyosságával, illetve jelezhet klinikailag nem veszélyes állapotokban is. Még további problémát jelent a diagnosztikában ma számunkra mind a vérzékenység, mind a thrombophilia diagnosztikában az alapos klinikai gyanú ellenére felderítetlen esetek viszonylag nagy száma. Az ún. ismeretlen ok miatt vérző betegek („bleeding disorder of unknown cause”, BDUC), akik klinikailag egyértelműen vérzékenyek, de a mai diagnosztikai lehetőségekkel nem találjuk a vérzékenység okát, külön kihívást jelentenek, csakúgy, mint azok a thrombophiliás személyek, akiknél nem találjuk a familiaris thrombosisok háttérben álló tényezőket mai diagnosztikai repertoárunk alkalmazásával (*Baker et al. Standardization of definition and management for bleeding disorder of unknown cause: communication from the SSC of the ISTH. J Thromb Haemost. 2024;22:2059–2070.*, *Monard et al. Bleeding disorder of unknown cause: an illustrated review on current practice, knowledge gaps, and future perspectives. Res Pract Thromb Haemost. 2024;8:e102625.*).

A mai diagnosztikai lehetőségeinket a modern genetikai-genomikai módszerek nagy mértékben kitágították. Ma már egyre inkább elérhetőek az új generációs szekvenálási módszerek (NGS), ahol akár génpanel szekvenálásokat, akár klinikai vagy teljes exomszekvenálásokat, sőt genomszekvenálásokat is végezhetünk. A (közel)jövő diagnosztikájának egy vonzó lehetősége a klinikai fenotípus karakterizálását közvetlenül követő NGS diagnosztika, ami mind vérzékenység, mind thrombophilia esetén alkalmazható lenne. A Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság (ISTH) „OMICS” munkacsoportja (<https://my.isth.org/communities/community-home?CommunityKey=d74cfe3a-34bf-42db-8c5c-5e6e6d70da70>) felvállalta azt a küldetést, hogy a hemosztázis rendellenességek diagnosztikájában meghatározza azon gének (Tier 1, Tier 2 gének) listáját, amit az NGS vizsgálatok során analízisre javasol, valamint létrehozott egy adatbázist („gold variants”, https://www.isth.org/page/GinTh_GeneLists), ahova bejelenthetőek a talált variánsok, klinikai és laboratóriumi adatokkal együtt. Az adatbázis 4 éve indult és folyamatosan bővül, azt reméljük, hogy hatékony segítséget fog nyújtani a genetikai vizsgálatok során talált variánsok interpretációjában. Az NGS módszerek elterjedésével ugyanis ma még az a nehézség támad, hogy a talált mutációk nagy része ismeretlen jelentőségű (ún. VUS, „variant of undetermined significance”) kategóriába sorolódik, a bizonyítékok hiánya miatt. Ez a kép azonban a jövőben tisztulni fog és megbízhatóbb lesz a genotípus-fenotípus összefüggések szempontjából. Meglátásom szerint azonban csak akkor működhet a genotipizáláson alapuló diagnosztika, ha

a mutációk patogenitását bizonyító (vagy cáfoló) funkcionális teszteket továbbra is végezzük. Azon túl, hogy a genetikai vizsgálatra kerülő betegeket a lehető legnagyobb gondossággal kell kiválasztani, amiben különböző standardizált pontrendszerek segítenek (pl. „Bleeding assessment tool”, BAT score, https://cdn.ymaws.com/www.isth.org/resource/resmgr/ssc/isth-ssc_bleeding_assessment.pdf), a mutációk hatását jellemző biokémiai vizsgálmódszereknek is adekvátnak kellene lenniük. Ezen az úton indulva, mi is továbbfejlesztettünk egyes laboratóriumi teszteket (pl. progresszív antitrombin aktivitás meghatározás), de hasznos segítséget jelenthetnek az in vitro expressziót követő funkcionális vizsgálatok is, ahol tisztított rendszerekben vizsgálhatjuk az adott variáns biokémiai hatását. Ezzel és az in silico predikciós analízisekkel együtt magának a mutációnak a fehérjére gyakorolt hatása jól jellemezhető és az egyes kórkepekre vonatkozó adatbázisok bővíthetők.

A variánsok in vitro vizsgálatával kapott eredmények és azok klinikai fenotípusban való megnyilvánulása azonban nem mindig áll összhangban, aminek több oka is lehet. Az in vitro laboratóriumi tesztlejünk általában nem tudják jól leképezni a fiziológiás viszonyokat és csupán kiragadott elemeit vizsgálják egy nagy, bonyolult rendszernek. Például, nem veszik figyelembe a von Willebrand faktor funkcionális tesztjeinél az áramlási viszonyokat („high shear”), vagy nem tudják vizsgálni a betegre jellemző pro-és antikoaguláns tényezők interakcióját, nem tudják figyelembe venni a sejtés elemek, illetve a vaszkulátúra szerepét a hemosztázis folyamatokban, stb. A vérzéses, illetve trombotikus kockázat megítélése szempontjából ígéretesek a hemosztázist kissé globálisabb nézőpontból vizsgáló módszerek, például trombin generáció, plazmin generáció vizsgálata, vagy a viszkoelasztikus módszerek (TEG, ROTEM, ClotPro) (*Mehic et al. Utility of Global Hemostatic Assays in Patients with Bleeding Disorders of Unknown Cause. Hamostaseologie 2024;44:358–367., Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. ClinChem 2016;62:699-707.*). Ezek a módszerek hamarosan be fognak vonulni a rutin klinikai laboratóriumok diagnosztikai eszköztárába, de egyrészt további standardizációt igényelnek, másrészt ezek sem tudnak minden körülményt figyelembe venni, ami egy vérzéses, vagy trombotikus fenotípus kialakításához hozzájárulhat.

Ezeket a lehetőségeket és korlátokat figyelembe véve ma a legjobb diagnosztikai gyakorlat az, ha a jól karakterizált klinikai fenotípusból kiindulva (vérzéses pontszám, részletes tünettan, családfa elemzés) elvégezzük az adott tünettan szerinti laboratóriumi, funkcionális vizsgálatokat (ha vannak ilyenek), majd – amennyiben ezek alapján nem jutunk egyértelmű diagnózishoz – részletes genetikai vizsgálatot végzünk. Ebben segítségünkre vannak az ISTH fent említett ajánlásai. A talált mutációkat osztályozzuk és adatbázisokkal összevetve interpretáljuk. Az egyéni vérzéses, vagy trombotikus kockázat megítélése szempontjából, a beteg egyéb körülményeinek, társbetegségeinek figyelembe vétele mellett, meggyőződés, hogy a közeljövőben további segítséget fognak jelenteni számunkra a globális tesztek.

2, Az antitrombin deficienciára vonatkozó kérdés:

A doktori mű különösen értékes, alaposan vizsgált és szépen kidolgozott részének tartom az antitrombin deficiencia kérdéskörét. Kérdésem inkább a szűk területről kitekintő jellegű és arra vonatkozik, hogy a szerin proteáz inhibitorok családja egy népes család sok taggal és jelentősen átfedő, részben redundáns feladattal. Magyarázhatja-e az antitrombin deficiencia klinikai megjelenését (trombotikus epizódokban való lefolyás) ez a fajta komplexitás, vagyis elképzelhető-e, hogy más szerin proteáz inhibitorok részlegesen, vagy bizonyos állapotokban kompenzálhatják a hiányzó antitrombin aktivitást? A kérdés fordítva is feltehető: tartozik-e az antitrombin deficiencia klinikai spektrumába olyan jelenség, amely az antitrombin egyéb aktív szerin proteázokra kifejtett hatásának hiányára vezethető vissza?

Köszönöm szépen ezt az elgondolkodtató kérdést. A szerin proteáz inhibitorok (szerpinek) valóban népes családot alkotnak (Schreuder H and Matter H. *Serine Proteinases from the Blood Coagulation Cascade. In: Renaud (ed.) Structural Biology in Drug Discovery: Methods, Techniques, and Practices, Wiley, 2020.*). Legismertebbek – az antitrombin mellett – a heparin kofaktor II, a protein C inhibitor, a szöveti faktor út inhibitor (TFPI), illetve a PAI-1. A heparin kofaktor II szinte kizárólagos célenzime a trombin és hatását glikozaminoglikánok (pl. heparán-vagy dermatánszulfát, heparin), de egyéb polianionok is, nagy mértékben fokozzák. Kísérletes adatok alapján a heparin kofaktor II trombin reguláló szerepe elsősorban az extravaszkuláris térben valósul meg (Shirk et al. *Arterial smooth muscle cell heparan sulfate proteoglycans accelerate thrombin inhibition by heparin cofactor II. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1138–1146.). A protein C inhibitor proteáz gátló profilja a heparin kofaktor II-höz, de még az antitrombinhoz viszonyítva is sokkal szélesebb: target enzimei közé tartozik a trombin mellett (a gátlás hangsúlyosabb a trombin-trombomodulin komplexben lévő trombin irányába), az aktivált protein C, kallikrein, urokináz, szöveti plazminogén aktivátor, vagy az aktív XI-es faktor (Pike et al. *Control of the coagulation system by serpins. Getting by with a little help from glycosaminoglycans. FEBS Journal* 2005;272:4842–4851.). Hatása szintén erősen kontrollált a glikozaminoglikánok által. A TFPI a VII-es faktor-szöveti faktor komplexet, illetve az aktív X-es faktort gátolja, kofaktora a protein S és a FV short, ami egy alternatív splicing mechanizmussal kialakuló formája az V-ös alvadásifaktornak (Dahlback et al. *Factor V-short and protein S as synergistic tissue factor pathway inhibitor (TFPIa) cofactors. Res Pract Thromb Haemost.* 2018;2:114–124.). A PAI-1 pedig a fibrinolízis regulátora, a szöveti plazminogén aktivátort gátolja. Az antitrombin aktivitást fenti szerpinek közül leginkább a heparin kofaktor II tudná kompenzálni, azonban az antitrombinhoz viszonyítva sokkal alacsonyabb koncentrációban van jelen a keringésben, hatása csak a trombinra irányul, és elsősorban az extracelluláris térben valósul meg. Az természetesen logikus, hogy a hemosztázis egyensúlyának fenntartásában minden serpin jelenlétére többé kevésbé szükség van.

Érdekes jelenség magának az antitrombinnak az alfa és béta glikoformájának jelenléte és aránya. Az antitrombin alfa glikoformája négy ponton (N128, N167, N187 és N224), a béta forma három ponton glikozilált (az N167-es pozícióban nem), és a béta forma erősebb heparin affinitással rendelkezik. A két forma aránya az eddigi adatok alapján kb. 9:1 az alfa forma javára, azonban felvetették, hogy a heparin kötés zavarával járó antitrombin deficienciákban (IIHBS típusok) a megtartott heparin affinitást mutató béta forma jelenléte kompenzálja a mutációk hatását, enyhébb fenotípust kialakítva (Martinez-Martinez et al. *Amelioration of the severity of heparin-binding antithrombin mutations by posttranslational mosaicism. Blood* 2012;120:900-4.). Ugyanez a munkacsoport megállapította, hogy az antitrombin glikozilációs állapota befolyásolja a heparin kötő régióban található arginineket érintő mutációk klinikai súlyosságát és laboratóriumi jellemzőit (a kézirat közlésre elfogadva a HemaSphere folyóiratba 2026 február 1-jén). Az, hogy az alfa-béta antitrombin arány interindividually mennyire különbözik, illetve hogyan tolódik el adott betegben, akár átmenetileg is, ma még nem teljesen ismert, de feltehető, hogy a klinikai fenotípusra hatással van. Kutatócsoportunk most erre a kérdésre fókuszálva módszerfejlesztést végez az alfa-és béta-antitrombin megbízható detektálására plazmában, remélve, hogy az segítségünkre lesz a genotípus-fenotípus összefüggések további tanulmányozásában.

A kérdés másik oldala az antitrombin egyéb szerin proteázokra kifejtett hatására vonatkozik, vagyis olyan, nem a hemosztázisban szerepet játszó enzimek gátlására, ami antitrombin hiány esetén a tünettant befolyásolhatja. Az antitrombin extra-hemosztatikus hatásai közül nem egyértelmű, hogy melyek köthetőek szerin proteáz gátlásához és melyek azok, amelyek más mechanizmussal hatnak, de az anti-inflammatórikus és endotél protektív funkciók a legismertebbek. Kimutatták, hogy az antitrombin gátolja a pro-inflammatórikus

citokinek termelődését, a neutrofilek aktivációját és szöveti infiltrációját, csökkentve ezzel a szervkárosodás mértékét gyulladásos állapotokban (*Takahasi et al. Antithrombin regulates neutrophil activities through the stimulation of C-type lectin family 1A. Blood Vessels, Thrombosis & Hemostasis* 2025;2: 100032.). Az antitrombinnak az endotélsejteken prosztaciklin felszabadító, ezáltal vazodilatátor hatása is van, valamint igazolták szerepét a vér-
agy gát integritásának fenntartásában is. Kimutatták, hogy az ECMO (extracorporalis membrán oxigenizáció) kezelés során csökkent antitrombin szint hozzájárult a szisztémás gyulladás súlyosbításához, a sokszervi elégtelenség kialakulásához. Legfontosabb, alternatív funkcióit az ISTH Physiological Anticoagulants and Thrombophilia (PAT) SSC keretei között nemzetközi munkacsoporttal foglaltuk össze és jelentettük meg a közelmúltban (*Prouse et al. Alternate functions of physiological anticoagulants. J Thromb Haemost.* 2025;23:3757-3768.). Bár az antitrombin szerepe igen szerteágazó a szervezetben, és az antitrombin terápiás alkalmazása hatékonynak bizonyult sepsisben, és kísérletesen traumás agykárosodásban is, legmarkánsabb hatása mégis az antikoaguláns funkciója. Az feltételezhető, hogy antitrombin deficienciában (főleg a mennyiségi zavarokban) e nem hemosztatikus hatások is sérülnek, azonban szisztematikus klinikai vizsgálatok ebben a vonatkozásban még nem történtek. Feltételezhető, hogy – mivel az antitrombin nem hemosztatikus hatásaival összefüggő minden folyamat igen komplex, számos tényező együttes hatásának eredője és ezekben az antitrombin nem major tényező – antitrombin hiányban kompenzatórikus mechanizmusok révén ezen funkciók kiesése nem jelenik meg markánsan a tünettanban. Ez jelenleg természetesen csak feltételezés, kísérletesen nem bizonyított.

Az opponensi értékelést és az izgalmas, elgondolkodtató kérdéseket még egyszer hálásan köszönöm és tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Debrecen, 2026. február 13.


Dr. Bereczky Zsuzsanna