

Válasz

Dr. Bodó Imre

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

Mindenek előtt köszönetemet fejezem ki opponensemnek az MTA doktori értekezésem körültekintő és lényeglátó bírálatáért, elismerő szavaiért és gondolatébresztő kritikai megjegyzéseirért, kérdéseirért. Az opponensi véleményben megfogalmazott felvetésekre és kérdésekre - pontról pontra - az alábbiakban válaszolok.

1, Az 5.1.2 fejezet egy enyhén vérzékeny beteg heterozigóta FV hiányát vizsgálja. Az eredmények elegánsan, in silico modellezéssel demonstrálják a talált, filogenetikailag konzervált FV régióra eső p.Gly521Arg mutációnak a fehérje szerkezetet torzító hatását és így minden bizonnyal patogén voltát. Ám a mutációnak a beteg vérzékenységével való összefüggése már távolról sem ilyen meggyőző. A beteg egészséges FV allélja által biztosított 45-50%-os FV szintje minden várakozás szerint elegendő kellene legyen a hemosztázis biztosításához. Ha ehhez hozzávesszük az enyhe vérzékenység igen gyakran tapasztalt anamnesztikus bizonytalanságát (az egészséges populációban sem ritkák a vérzéses panaszok) és a mostanában intenzíven kutatott ismeretlen eredetű vérzékenység (bleeding disorder of undetermined cause, BDUC) nem nagyon ritka előfordulását, akkor erős marad a gyanú, hogy a beteg FV eltérései és az enyhe vérzéses tünetek egymástól független koincidencia eredménye. Ezt a gyanút erősíti a családi anamnézis hiánya és a beteg hordozó leányának tünetmentessége. Természetesen ezek az érvek sem egyértelműen perdöntőek, hiszen a leány még fiatal, és így a vérzéses anamnézis hiánya nem kellően informatív. Véleményem szerint a kérdés megválaszolása úgy lenne lehetséges, ha a leány jövőbeli műtétjeire úgy készülne fel a sebészi osztály, hogy profilaxist NEM alkalmaznak, csak vérzés esetén vetnék be az előkészített FFP-t. Ez nem csak a kérdés tudományos oldala miatt lenne hasznos, hanem megkímélhetné a leányt egy esetleg felesleges, de számos káros következménnyel is járó örökletes vérzékenység diagnózisától.

Teljes mértékben egyetértek az opponensi felvetéssel, mely szerint – jóllehet a mutáció patogén szerepét in silico és egyéb indirekt módszerekkel igazoltuk – a heterozigóta V-ös faktor (FV) deficiencia vérzékeny fenotípussal való összefüggését nem lehetett kétséget kizáróan bizonyítani. Válaszomban abból indulok ki, hogy a beteg diagnosztizálása és az esetleírás idején (2009) a mai, széleskörű, elsősorban genetikai diagnosztikai módszertani arzenállal még nemzetközi szinten sem rendelkezünk. A heterozigóta FV deficiencia lehetséges összefüggését a vérzékenységgel ezért főként kizárásos alapon próbáltuk megközelíteni. Részletes, thrombocyta aggregációs és szekréciós vizsgálatokkal kizártuk a jelentős thrombocyta funkció zavarokat, specifikus laboratóriumi vizsgálatokkal kizártuk továbbá a von Willebrand betegséget, a fibrinogén rendellenességeket és az egyéb coagulopathiákat is. Elmondhattuk tehát, hogy az enyhén csökkent (45-50%) FV szinten kívül egyéb bizonyítható kóroki tényezőt nem igazoltunk a beteg, invazív beavatkozások alkalmával bekövetkező, vérzéseinek hátterében. Ennél többet a közel 20 évvel ezelőtti lehetőségek birtokában nem állíthattunk.

Szemben a haemophilia (haemophilia A és B) esetében ismert összefüggéssel az alvadásifaktor szintek és a vérzékenység kockázatának mértéke között, az egyéb, ritka

coagulopathiák esetében sokkal nehezebb azt a határértéket kijelölni, amely feletti alvadásifaktor szint már biztosan nem okoz vérzékenységet. Peyvandi és munkatársainak multicentrikus tanulmányában (Peyvandi et al. *Coagulation factor activity and clinical bleeding severity in rare bleeding disorders: results from the European Network of Rare Bleeding Disorders J Thromb Haemost.* 2012;10:615-21.) megállapították, hogy a FV szint gyenge összefüggést mutat a vérzékeny fenotípussal, illetve a vérzések súlyosságának mértékével. Ők n=50 személy adatainak elemzéskor 12%-nak találták azt a határértéket (medián érték), ami felett spontán vérzések nem következtek be, azonban a 95%-os megbízhatósági intervallum igen tágnak bizonyult (0-34%), sőt, a legsúlyosabb (grade III) típusú vérzékenységek kivédéséhez szükséges minimális FV szint 95%-os megbízhatósági tartományának felső határértéke is viszonylag magas, 19% volt. Ezek az adatok arra utalnak, hogy FV deficiencia esetében a „klasszikus” haemophilia A, vagy B-vel ellentétben, nem jósolható meg egyszerűen a vérzékenység kockázatának mértéke adott faktor szint mellett. Az invazív beavatkozások során, a vérzékes szövödmények elkerüléséhez szükséges alvadásifaktor szintek határértékei pedig még ennél is bonyolultabb kérdések lehetnek. Mindezek mellett, betegünk 45-50%-os FV szintje elvileg kielégítő hemosztázist kellett volna, hogy biztosítson.

A nagy áteresztőképességű genetikai módszerek (új generációs szekvenálás, NGS különböző metodikái) az elmúlt egy-két évtizedben forradalmasították a molekuláris genetikai diagnosztikát és kitágították a határokat a vérzékeny betegek diagnosztikájában is. A ma még „ismeretlen eredetű”-nek tartott vérzékenység, BDUC, háttérben, az NGS módszerét alkalmazva, egyre több esetben derülnek ki genetikai variánsok valamely, a hemosztázis rendszerével közvetlenül, vagy közvetetten kapcsolatban lévő gén(ek) vonatkozásában. Az enyhe vérzékenység háttérben álló genetikai tényezők vizsgálata ma a hemosztázis kutatások előterében van, de rutinszerű alkalmazása ma még sem javasolt (Avgeropoulos and James. *Diagnosis of bleeding disorder of unknown cause: how many tests are enough to diagnose BDUC? Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2025;116-9.). A BDUC ma elsősorban kizárásos diagnózis, feltételezeten multifaktoriális patogenezissel (Mehic et al. *Investigating patients for bleeding disorders when most of the “usual” ones have been ruled out. Res Pract Thromb Haemost.* 2023;7:e102242.). Nekünk anno 2009-ben még nem volt lehetőségünk NGS módszerrel vizsgálni a betegünket, így – egyetértve az opponensi felvetéssel – nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy az enyhe vérzékenység háttérben nem, vagy nem elsősorban a FV variáns heterozigóta hordozása áll, hanem egyéb, nem azonosított tényező jelenléte is hozzájárul a fenotípus kialakításához. Az NGS módszerek, főként a teljes genomszekvenálás alkalmazása következtében óriási mértékben megszorodtak a „genetikai találatok”, melyek patogenitásának, illetve okozati jelentőségének bizonyítása kihívást jelent a laboratóriumok számára. Nemcsak a klinikai, hanem a laboratóriumi fenotípus háttérben is egyre komplexebb mechanizmusok szerepét vélelmezzük. A FV esetében például, a közelmúltban több olyan, a FV kódoló génjén kívüli lókuszt azonosítottak, ami szerepet játszik a plazma FV szint szabályozásában, illetve azonosították a CLEC4M (mint clearance receptor) szerepét a FV eliminációban (Munsch et al. *A multiomics approach reveals novel regulators of plasma factor V levels, highlighting CLEC4M as a clearance receptor. Blood* 2025;146:628-37).

Betegünk esetét tekintve, egyetértünk az opponensi felvetéssel, ami szerint profilaxis alkalmazását nem javasolja, csak vérzés esetén vetnék be az előkészített FFP-t. Ma már rendelkezésre állnak a perioperatív körülmények között egyszerűen kivitelezhető point-of-care viszkoelasztikus tesztek, melyek a hemosztázis globális vizsgálatára alkalmasak és a perioperatív vérzések terápiáját jól irányítják, elkerülve a felesleges és a beteg számára megterhelő beavatkozásokat (Crochemore et al. *Early Goal-Directed Hemostatic Therapy for Severe Acute Bleeding Management in the Intensive Care Unit: A Narrative Review. Anesthesia and Analgesia* 2024;138:499-513.). A globális hemosztázis tesztek (pl. ROTEM,

trombin generáció vizsgálata) a közeljövőben be fognak vonulni a rutin klinikai laboratóriumok eszköztárába és meggyőződésem, hogy hasznosabbak lesznek a vérzékeny betegek vérzéses kockázatának egyéni megítélésére, mint a hagyományos alvadásfaktork aktivitás meghatározások (*Dreier et al. Usefulness of Global Coagulation Tests, Thrombin Generation and Viscoelastic Tests for Assessing the Bleeding Phenotype in Rare Coagulation Factor Deficiencies. Hamostaseologie 2025;45:419–430.*).

2, Az 5.1.5 fejezet (124. oldal) az Osler-kór differenciáldiagnosztikáját tárgyalja. Amint a jelölt is megállapítja, ebben a betegségben a genetikai diagnózis felértékelődik, illetve a diagnosztikai algoritmus elejére kerül, mivel más laboratóriumi teszt nem létezik a betegség objektív igazolására. Erre a célra genetikai panelt dolgoztak ki, amely az Osler-kórt okozó gének szekvenálását is tartalmazza. Amennyiben ez még nem történt meg, ebbe a panelbe javasolt lenne bevenni az EPHB4 gén vizsgálatát is, mivel e gén mutációi is az Osler-kórral jelentős átfedést mutató vaszkuláris vérzékenységet okoznak.

Teljesen egyetértek az opponensi felvetéssel. Az *EPHB4* gén (OMIM azonosító 600011) mutációi a capillaris malformatio-arteriovenosus malformatio 2 (CM-AVM2, OMIM azonosító 618196) fenotípussal hozhatóak összefüggésbe, egy autoszomális domináns öröklésmentet mutató rendellenességgel (*Amyere et al. Germline Loss-of-Function Mutations in EPHB4 Cause a Second Form of Capillary Malformation-Arteriovenous Malformation (CM-AVM2) Deregulating RAS-MAPK Signaling. Circulation 2017;136:1037-48.*). A betegeknél általában cutan capillaris malformatiókat (fejen, arcon, végtagokon), szokatlan megjelenésű bőrelváltozásokat (Bier foltok), illetve agyi ereket, vagy az arc, illetve végtag ereit érintő arteriovenosus malformatiókat (AVM) találnak. Jellemzőek lehetnek teleangiectasiák, és orrvérzés is. A betegségben irodalmi adatok szerint előfordulhatnak v. Galeni aneurysmák is. A CM-AVM esetek többségét (mai tudásunk szerint kb. 78%-át) a CM-AVM1 típus (OMIM azonosító 608354) teszi ki, amit a *RASA1* gén mutációi okoznak. A CM-AVM1 és CM-AVM2 betegség klinikai megjelenése igen hasonló, ami a *EPHB4*-RAS-ERK szignalizációs útvonal érintettségével magyarázható, amiben mindkét gén terméke részt vesz (*Zeng et al. Variations in RASA1 and EPHB4 in Chinese patients with capillary malformation-arteriovenous malformation. J Dermatol 2025;52:377-82.*). Mivel e két betegség az Osler-kórral is nagyfokú hasonlóságot mutat, a differenciáldiagnosztika szempontjából célszerű a *RASA1* és az *EPHB4* gén vizsgálata is Osler-kór, vagy Osler-szerű állapot gyanúja esetén.

Az Osler-kór (és Osler-szerű fenotípussal járó vaszkuláris rendellenességek) genetikai vizsgálatára szolgáló génpanelünk az értekezésben szereplő közleményünk idején még nem, de 2024 májusa óta már tartalmazza az *EPHB4* gént is. Az „Osler-kór” panelünkben jelenleg, a hg38-as genomösszeállításnak (genome assembly) megfelelően, az *ENG*, *ACVRL1*, *SMAD4*, *RASA1*, *GDF2*, *BMPR2* és az *EPHB4* gének szerepelnek. A panel kiterjesztése óta *EPHB4* mutációt egy betegben detektáltunk (c.236C>T, p.Pro79Leu) addicionális találatként, mely mutáció patogenitása nem bizonyított. A c.236C>T, p.Pro79Leu variáns (rs542089930) előfordulási gyakorisága az ExAC és gnomAD adatbázisok szerint 0,007-0,02% közötti, az adott pozícióban lévő prolin, bár erősen konzervált, fizikokémiai tulajdonságaiban a mutáns leucinnal igen hasonló. Az in silico predikciós analízisek többsége tolerálható mutációként jellemzi. Mindezen adatokat összevetve, az eltérés jelenleg a VUS (ismeretlen jelentőségű variáns) kategóriába sorolható. A beteg a fent említett CM-AVM2 jellegzetes tüneteit nem mutatja.

3, A 129-132. oldalakon a jelölt négy érdekes von Willebrand 2B New York/Malmö variánsban szenvedő beteg eseteit ismerteti (p.Pro1266Leu). Vajon mi lehet e titokzatos variánsban szenvedő betegek vérzékenységének oka? Hiszen a RIPA ugyan demonstrálja

a mutáns von Willebrand faktor hiperreaktivitását, de trombocita adhéziót mérő paramétereik rendre normál viszonyokat tükröznek, és sem trombocitáik, sem nagy méretű multimerjeik nem hiányoznak. – Ez természetesen akadémiai jellegű kérdés, a fejezetben foglaltakkal mindenben egyetértek.

Az irodalomban, saját ismertetett eseteinkhez hasonlóan, a p.Pro1266Leu mutációval rendelkező betegek között találunk vérzékenyeket, a vérzékenységük általában enyhe. A mutáció fenotípusban megnyilvánuló következményeinek kérdését érdemes két részre bontani, a mutáció okozati jellegének bizonyítására és a mutációt hordozók laboratóriumi eltéréseinek, illetve klinikumának vizsgálatára. A mutáció patogén természetét in vitro expressziós kísérletekben igazolták, a mutáns von Willebrand faktor valóban fokozott kötődést mutatott a thrombocytákhoz (*Holmberg et al. von Willebrand factor mutation enhancing interaction with platelets in patients with normal multimeric structure. J Clin Invest 1993;91:2169-77.*) és ez a jelenség egyértelműen a p.Pro1266Leu mutációhoz volt köthető.

A klasszikus 2B típusú betegek esetében a vérzékenység hátterében azt feltételezik, hogy a von Willebrand faktor és a thrombocyta keringésben történő spontán összekapcsolódása miatt a nagy multimerok eliminálódnak, mely folyamatban az ADAMTS13 által történő proteolízis iránti fokozott fogékonyságnak is szerepe van, a thrombocyta - von Willebrand faktor asszociátumok keringésből történő kiürülése miatt thrombocytopenia következik be. Mindezek azt eredményezik, hogy érsérülés esetén nem áll rendelkezésre kellő mennyiségű és minőségű von Willebrand faktor és thrombocyta (*Rayes et al. Effect of von Willebrand disease type 2B and type 2M mutations on the susceptibility of von Willebrand factor to ADAMTS-13. J Thromb Haemost 2007;5:321-8., Kruse-Jarres et al. How I treat type 2B von Willebrand disease. Blood. 2018;131:1292-1300.*).

Az atípusos 2B esetekben – a normál thrombocyta szám és normál multimer struktúra miatt – valóban felvetődik a kérdés, hogy mi okozza e betegekben a vérzékenységet és hogy miért nem korrelálnak a laboratóriumi eltérések a fenotípussal (egyedül a fokozott RIPA van jelen, mint laboratóriumi eltérés, ami annyit jelez, hogy a von Willebrand faktor erősebben kötődik a thrombocytákhoz). Az atípusos 2B típusú betegek vérzékenységének hátterében is több tényezőt feltételeznek, illetve különböző kísérletes adatokkal igazolták, hogy a klasszikus és az atípusos 2B – a laboratóriumi paraméterekben mutatott különbségeik ellenére - igen sok tényezőben megegyeznek. Kimutatták, hogy a legkisebb risztocetin dózisban, ami már pozitív RIPA tesztet eredményez, nincs különbség a normál multimer struktúrával rendelkező atípusos és a klasszikus 2B vWD esetek között (*Casonato et al. Type 2B von Willebrand disease with or without large multimers: A distinction of the two sides of the disorder is long overdue. PLoS One 2017;12:e0179566.*). A thrombocyta von Willebrand faktor tartalom azonban az atípusos 2B vWD betegek egy részében csökkent, míg a klasszikus 2B esetek mindegyikében normál volt. Kísérletesen igazolták, hogy a vWF féléletidejének csökkenése mind a klasszikus, mind az atípusos esetekben hasonló mértékű volt és független a nagy multimerok jelentőségétől vagy hiányától, illetve a thrombocyta számtól (*Casonato et al. Reduced survival of type 2B von Willebrand factor, irrespective of large multimer representation or thrombocytopenia. Haematologica 2010;95:1366-72.*). A vérzékenység vonatkozásában Casonato munkacsoportja megállapította egyrészt, hogy a klasszikus 2B esetekben a vérzékenység kifejezettebb volt az atípusos esetekhez viszonyítva, bár azok között is találtak súlyosan vérzőket, másrészt kimutatta, hogy a thrombocyta szám nem korrelál a vérzések súlyosságával, vagyis, a klasszikus 2B vWD esetekben sem elsősorban a thrombocytopenia állhat a vérzékenység hátterében. Kimutatták, hogy a vérzékenység súlyossága inkább a mutáció típusától függ (mind klasszikus, mind atípusos 2B vWD esetén) és nem jól korrelál a laboratóriumi tesztek eredményeivel. A jelenleg használt laboratóriumi tesztek egyébként sem tükrözik jól a fiziológiás körülményeket (pl. high shear körülmények, vaszkuláris hatások,

stb.). Atípusos 2B vWD esetén azt is feltételezhetjük, hogy a fokozott thrombocyta – von Willebrand faktor kapcsolat következtében a thrombocyta funkció sérül (feltehetően az intracelluláris szignalizációs útvonalak érintettsége miatt).

A klasszikus és atípusos 2B vWD elkülönítése a terápiás következmények miatt célszerű lehet, ugyanis, míg az atípusos esetekben a betegek számára a DDAVP adása előnyös lehet, valamit szükség esetén thrombocyta koncentrátumot is kaphatnak, addig klasszikus 2B vWD esetén a DDAVP megítélése nem egyértelmű, illetve a thrombocyta adása ronthat a klinikai állapotot. Minden fenti megfontolást együttevve, a legújabb diagnosztikai ajánlásokban a 2B vWD esetén a molekuláris genetikai vizsgálat szerepe felértékelődik, hiszen a mutáció ismeretében nemcsak elkülöníthető a vWD klasszikus, illetve atípusos 2B altípusa (ezt a multimeranalízis is megteszi), hanem jósolható a vérzékenység súlyossága is (*James et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. Blood Advances 2021;5:280-300.*).

4, Az igen súlyos homozigóta ATBp3 betegek között van 2 tünetmentes. Vajon mi védi őket a mindenki mást érintő tromboembóliától? Nagyon érdekes lenne e betegek genetikai hátterét, és egyéb jellemzőit vizsgálni a VTE többé-kevésbé rejtélyes patogenezisének jobb megértése céljából. Van esetleg adat, ami megvilágíthatja ezt a kérdést? – ismét egy akadémikus kérdés, nem kritika.

A vénás thromboembolia (VTE) komplex betegség jellegét valóban nagyon jól szemlélteti az opponensi véleményben megfogalmazott két esettel kapcsolatos kérdés. A VTE patogenezisében szerepet játszó gén-gén, illetve gén-környezet interakciók bonyolult rendszerét egyszerű, célzott laboratóriumi vizsgálatokkal szinte lehetetlen felderíteni jelen módszertani és technikai felkészültségünkkel. Azonban az ma világosan látszik, hogy a komplex betegségek 5P elv szerinti megközelítésének megfelelően („personalized”, „predictive”, „preventive”, „participatory”, „population-based”) a VTE kockázatfelmérés stratégiája szemléletváltást igényel. A nagy áteresztőképességű genomikai és proteomikai módszerek megjelenése és a „big data” analízis módszertanának fejlődése, a mesterséges intelligencia felhasználásával meggyőződésem szerint a közeljövőben meg fogja teremteni a lehetőségét egy sokkal személyre szabottabb diagnosztikai és betegellátási koncepciónak (*Pravettoni, G., and S. Triberti. 2020. P5 eHealth: An Agenda for the Health Technologies of the Future. Springer. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-030-27994-3>, Hood, L. E., & Galas, D. J. (2008). P4 medicine: Personalized, predictive, preventive, participatory a change of view that changes everything. A white paper prepared for the Computing Community Consortium committee of the Computing Research Association. <http://cra.org/ccr/resources/ccr-led-whitepapers/>).*

A kérdésben megfogalmazott két súlyos thrombophiliás, antitrombin Budapest 3 homozigóta beteg esetét konkrétan elemezve, akik a vizsgálat idején VTE-t még nem szenvedtek el, megállapíthatjuk, hogy egyikük még csak 10 éves volt akkor, így az ő esetében nem zárható ki, hogy akár a közeljövőben VTE-t szenvedhetne el. E fiatal kisfiú egyéb klasszikus örökletes thrombophilia kockázati tényezőkkel nem rendelkezik (protein C 123%, protein S 89%, APC rezisztencia és FII20210A allél nem detektálható, fibrinogén 2,85 g/L volt a vizsgálat idején). Szerzett kockázati tényezők tekintetében sem regisztráltunk érdemi faktorokat. A másik beteg kérdése életkoránál fogva érdekesebb, hiszen a férfibeteg 50 éves volt a vizsgálat idején és addig nem szerepelt VTE az anamnézisben. Ő sem rendelkezett egyéb thrombophilia kockázati tényezőkkel (protein C 106%, protein S 96%, fibrinogén 3,55 g/L volt a vizsgálat idején, APC rezisztencia és FII20210A szintén nem volt jelen, szerzett rizikófaktorokat sem regisztráltunk). Igen érdekes lenne protektív tényezők célzott vizsgálata (pl. thrombocyta funkció, szöveti faktor út inhibitor, von Willebrand faktor, trombomodulin),

különösen ez utóbbi beteg esetében, vagy – a ma már számunkra is elérhető – új generációs szekvenálással megvalósítható teljes exom vagy genom szintű analízis. Sajnos a vizsgálat idején (10 évvel ezelőtt) ezek még nem álltak rendelkezésre, a beteget pedig később nem lehetett elérni további vizsgálatok céljából. A thrombophiliát „kompenzáló” protektív tényezők jelenlétére jó példa egy általunk vizsgált család, ahol antitrombin deficiencia és vérzékenységgel járó dysfibrinogenaemia kombinációja fordult elő (az értekezésben az 5.1.5.3 fejezetben), de az irodalomban is ismertek hasonló esetek, például antitrombin deficiencia és von Willebrand betegség kombinációja (*Pezeshkpoor B et al. Modulation of Haemostatic Balance in Combined von Willebrand Disease and Antithrombin Deficiency: A Comprehensive Family Study. Haemophilia 2025; 31:140-7.*). Az eddig közölt eseteírásokban a pro-és antitrombotikus tényezők együttes előfordulása általában véletlen találatok eredménye, és szisztematikus vizsgálatok nem készültek.

A hemosztázis diagnosztikában is jelen van ma egy olyan törekvés, ami a komplex genetikai diagnosztikát (NGS módszerek) helyezi előtérbe a funkcionális vizsgálatok, illetve a célzott véralvadási tényezőkre irányuló vizsgálatok helyett. E komplex genetikai vizsgálatok szerepe a véralvadás diagnosztikában ma még vitatott, de az előrevehető, hogy amennyiben a betegeket NGS módszerrel teljes exom- vagy genomsekválásnak vetnénk alá, többször találunk pro-és antitrombotikus variánsok együttes előfordulását. Nem véletlen azonban, hogy tudományos, szakmai körökben vita tárgya az, hogy vajon váltsunk-e stratégiát a thrombophiliák, illetve vérzékenységek laboratóriumi kivizsgálásában a genetikai vizsgálat javára. Ma még a detektált mutációk jelentős része a VUS, azaz ismeretlen jelentőségű variáns kategóriába esik, így nemhogy könnyítené a diagnosztikát az adott találat, hanem interpretációs problémát okoz. Másrészt viszont, ha nem végzünk genetikai vizsgálatokat nagy számban, akkor a VUS-okat nagyon nehezen tudjuk tisztázni, így csak nagyon sokára jutunk el optimális, a klinikusi munkát valóban segítő genetikai adatbázisokhoz. A Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság (ISTH) genomikai munkacsoportja kezdeményezésére 2021 óta létezik egy „gold variants” adatbázis (https://www.isth.org/page/GinTh_GeneLists), amibe az NGS módszerrel kapott variánsokat klinikai és laboratóriumi adatokkal együtt be lehet jelenteni és amit évente felülvizsgálunk. Ettől azt remélik, hogy a különböző, hemosztázis rendellenességben azonosított genetikai eltérések interpretációja a jövőben könnyebb és hatékonyabb lesz. A funkcionális vizsgálatok szerepe azonban, véleményem szerint soha nem lesz elhanyagolható, már csak azért sem, mert a talált genetikai eltérések kóroki szerepének igazolására, az adott fehérjére gyakorolt hatásának vizsgálatára ezek a módszerek mindig elengedhetetlenek lesznek.

5, Az antitrombint kódoló SERPINC1 gén kilenc új defektusa közül az egyik, a heparinkötő helyet érintő p.Arg78Gly IIHBS típusú szubsztitúció esetében kiderül (81. és 200. oldal), hogy az eltérést hordozó fiatal nőnek soha nem volt VTE eseménye. A molekuláris predikciós modelleknek csak egy része találta ezt az eltérést patogénnek, míg más modellek neutrális jellegűnek ítélték. A fehérjeexpressziós vizsgálatok szerint a normál ütemben szekretált mutáns antitrombin fehérje hc-anti-Xa aktivitása enyhén csökkent ($61,5 \pm 8,5\%$), hasonlóan a némi bizonytalansággal mért p-anti-Xa aktivitáshoz ($67,54 \pm 59,85\%$). Ez összhangban áll a felszíni plazmonrezonancia-vizsgálatok eredményével, amelyek enyhe (kétszeres) csökkenést mutattak az összesített (egyensúlyi, KD) affinitásban. Mindazonáltal a megközelítőleg ezerszer alacsonyabb asszociációs ráta a lassabb disszociációval csak részlegesen kompenzálódik, ami összességében lényeges in vivo funkcionális defektus lehetőségére utal. Kérdésként merül föl azonban, hogy eleve miért vizsgálta a munkacsoport egy klinikailag egészséges fiatal nő antitrombin rendszerét. Ezzel összefüggésben megfontolandó, hogy az az információ, miszerint ő egy potenciálisan életveszélyes genetikai eltérés hordozója, miként befolyásolta – vagy

befolyásolhatta – az érintett személy életét, különösen annak fényében, hogy a rendelkezésre álló, fentebb összefoglalt adatok alapján az eltérés patogenitása nem tekinthető egyértelműen igazoltnak.

A mutációt hordozó 34 éves nőbeteg thrombophilia irányú vizsgálata más intézményben történt, infertilitás előzménnyel. A csökkent antitrombin aktivitást észelve, ezt követően érkezett hozzánk vérmintája a deficiencia igazolására és mutációanalízisre. Laboratóriumunkban szintén csökkent, 54%-os antitrombin aktivitást találtunk, majd elvégezve a genetikai vizsgálatot, detektáltuk a p.Arg78Gly mutációt heterozigóta formában. A lelet interpretáció során hangsúlyoztuk, hogy még ismeretlen jelentőségű, új eltérésről van szó, melynek megítélése a további bizonyítékok függvényében változhat. A kérdés betegre vonatkozó részére adott válaszómban kiemelem, a korábbi kérdések kapcsán kifejtettekkel összhangban, hogy egy-egy új variáns detektálása esetén a beteggel közvetlenül kapcsolatban álló klinikus számára, a beteg felé történő interpretáció nem könnyű. Teljes mértékben egyetértek az opponensi véleménnyel a thrombophilia kivizsgálás célcsoportjának megválasztása tekintetében. Ebben az esetben, arra tekintettel, hogy a beteg anamnesisében VTE nem szerepel, anticoagulálás természetesen nem jön szóba. A IIHBS típusú antitrombin deficienciák heterozigóta formában (ha bizonyítottan okozati eltérésről van is szó) sokkal enyhébb kockázati tényezőnek számítanak, mint az egyéb típusú antitrombin deficienciák (Corral J et al. *The genetics of antithrombin. Thromb Res* 2018;169:23-9.), ezért hosszú távú anticoagulálást (egyéb rizikófaktor hiányában) általában még MVT-t követően sem javasolnak, bár e tekintetben nincs egységes álláspont.

A kérdés másik oldala a p.Arg78Gly mutáció okozati jellegének bizonyításával kapcsolatos. Az in silico módszerek ellentmondásos eredményeket adtak, habár a heparin kötő régió vonatkozásában e módszerek nem eléggé megbízhatóak. A fehérje expressziója a mutáció következtében nem csökkent, a heparinnal történő kötődése azonban csökkent mértékű volt. Így összességében, enyhe hatású, IIHBS típusú variánsról beszélhetünk. A J. Corral vezette spanyol munkacsoport által detektált, azonos pozíciót érintő p.Arg78Gln esetében ők szintén enyhe IIHBS defektust igazoltak (Bravo-Perez et al. *Molecular and clinical characterization of transient antithrombin deficiency: A new concept in congenital thrombophilia. Am J Hematol* 2022;97:216-25.), ami összhangban áll a mi eredményeinkkel. A munkacsoport tovább vizsgálta az arginin reziduumokat érintő, az antitrombin heparin kötő régiójában elhelyezkedő mutációk hatásait (a kézirat közlésre elfogadva a HemaSphere folyóiratba 2026 február 1-jén) és a kérdés komplexitását és bonyolultságát jól szemléltetve, megállapította, hogy az antitrombin glikozilációs állapota befolyásolja (alfa glikoforma: Asn167-en glikozilált, vagy béta glikoforma: Asn167-en nem glikozilált) a heparin kötő régióban található arginineket érintő mutációk klinikai súlyosságát és laboratóriumi jellemzőit. Az Arg78 közvetlen elektrosztatikus interakcióban van a heparinnal, így aminosavcsere esetén elméletileg is várjuk azt, hogy következménnyel járjon az antitrombin-heparin kapcsolat vonatkozásában. Az in vitro expresszált béta-antitrombin frakcióban az Arg78 pozíciót érintő mutáns antitrombin normál mennyiségben szintetizálódott és expresszáldott, és heparin iránti affinitása sem különbözött a vad típusú antitrombintól. Alfa-antitrombin esetén azonban alacsony heparin affinitást detektáltak, ami magyarázza a betegek laboratóriumi vizsgálatakor észlelt csökkent heparin-kofaktor antitrombin aktivitást, az in silico predikciós analízisek heterogenitását, valamint felveti, hogy egyes mutációk hatását az antitrombin glikoziláltságának mértéke befolyásolja. Az, hogy az alfa-béta antitrombin arány interindividuallyan 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.

Apróbb, technikai, vagy formai jellegű megjegyzések:

1, A 22. oldalon a Bevezetés a ritka betegségek előfordulását hazánkban 830 ezer főre becsüli. A jelölt által is idézett irodalom a populáció 3.5-6%-ára szokta becsülni ezt az adatot – ehhez képest magasnak tűnik a hazai számarány. Megalapozott-e és honnan származik ez a becslés?

Egyetértek az opponensi felvetéssel, vagyis a 3,5-6%-os populációs arányt figyelembe véve hazánkban kb. 400 ezer-600 ezer fő ritka betegséggel rendelkező személy élne. A különböző, ritka betegségekkel foglalkozó szervezetek (pl. RIROSZ), vagy Orphan készítményeket gyártó és forgalmazó cégek becslései azonban ennél magasabb, 800 ezer fő körüli értékeket adnak meg. Az eltérés feltételezésem szerint azzal magyarázható, hogy a hazai betegszervezetek konkrét hazai adatokkal rendelkezhetnek, ami eltérhet a nemzetközi, 3,5-6%-os általános populációs aránytól, de magyarázható a „ritka betegség” definíció eltérő értelmezésével is.

2, A 29. oldalon a FV hiányt bevezető rész az autoszómális recesszív betegség előfordulásának 1/1millió incidenciájából a heterozigóta állapot 1/1000 előfordulására következtet. Ez a szám helyesen 1/500, hiszen a mindkét oldalon heterozigóta házaspárok gyermekeinek csak 25%-a lesz beteg.

Köszönöm szépen a pontosítást, az opponensi megjegyzéssel teljesen egyetértek, az 1/1000 számérték elírás következménye az értekezésben. A homozigóta frekvencia érték valójában a q^2 -et jelzi a populációgenetikai törvények szerint, így a ritka allél, vagyis a mutáns allél gyakorisága (q)= 1/1000, amiből következően a gyakori, vagyis itt normál allél gyakorisága (p)= 999/1000, a heterozigóta gyakoriság ($2pq$)= 1/500.

3, A Bevezetésben a 33. oldalon a jelölt a von Willebrand betegséget mutatja be. Amint helyesen jelzi, a 2A altípus általában autoszómális domináns öröklődésmenetet mutat. Ám érdemes itt megjegyezni, hogy ez alól a szabály alól van egy kivétel, a 2A altípus ritka IIC variánsa ugyanis autoszómális recesszív öröklődésű.

Köszönöm a pontosítást, valóban, érdemes figyelembe venni a ritka IIC altípusú 2A vWD-t is, ami kivételesen AR öröklődésmenetet mutat, a mutációk a pro-peptid régiót érintik, a D1-D2 doménben helyezkednek el, és hibás multimer összeszereléssel, a normál triplet struktúra helyett abnormális, egyszeres sávok megjelenésével jár a multimeranalízis során (*Uno et al. Investigation of type IIC von Willebrand disease. Int J Hematol 1994;59:219-25.*, *Sadler et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. J Throm Haemost 2006;4:2103-14.*).

4, A VIII. táblázat összefoglalja a von Willebrand betegek laboratóriumi jellemzőit. Bár részletek itt nem állnak rendelkezésre, szembetűnő a 3-as típus alatt felsorolt 3 beteg egyikének 20%-os VWF:Ag szintje. Itt valószínűleg elírásról lehet szó, hiszen ilyen magas VWF:Ag szint egyértelműen kizárná a 3-as típus diagnózisát.

Nagyon köszönöm a megjegyzést. Az opponensnek teljesen igaza van, hogy egy 20%-os von Willebrand antigén szint eleve kizárja a III-as típusú vWD lehetőségét. A táblázatban feltüntetett érték azonban valóban 20%, de ennek hátterében a beteg magas titerű reuma faktor

pozitivitása állt, ami az általunk használt, von Willebrand faktor antigén szintjének meghatározására szolgáló immunturbidimetriás tesztben interferenciát okozva, föléértékelést eredményez (Favaloro EJ, et al. *Possibility of potential VWD misdiagnosis or misclassification using LIA technology and due to presence of rheumatoid factor. Am J Hematol. 2001;66:53-6.*). E megjegyzés sajnálatosan lemaradt a táblázat magyarázó szövegrészéből, így teljesen jogosan, félreértést okozott. Az érintett beteg bizonyítottan III-as típusú vWD-ben szenved, a c.3379+1G>A mutációt hordozza homozigóta formában.

5, Az antitrombin hiányról szóló fejezet 24. ábrája (144. old) nagyon szépen összegzi az eddig talált genetikai defektusokat. Néhány később részletesebben is tárgyalt mutáció (p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg) azonban lemaradt az ábráról, és az AT Debrecen (p.Leu205Pro) pedig hibásan van föltüntetve (T>C helyett C>T, és Pro helyett Phe).

Nagyon köszönöm az opponens figyelmességét. Az AT Debrecen mutáció valóban elírásra került az ábrán. A három másik mutáció ezek az ábrán azért nem szerepel még, mert itt a 2017-ig talált mutációkat szerettem volna szemléltetni, az értekezésben ismertetett vizsgálataink kronológiai sorrendjét figyelembe véve. A p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly és p.Met121Arg mutációkat ezen összefoglalást követően detektáltuk.

6, Szintén apróbb elírás található a 145. oldalon, ahol a IIHBS és az I-es típusú ATD VTE gyakorisága fordított sorrendben került a szövegbe (helyesen I-es típus 66% és IIHBS 41.8% a XII. Táblázat adatai alapján).

Egyetértek az opponenssel és köszönöm az észrevételt. A 145. oldalon valóban felcseréltem az I-es típus és a IIHBS típusra vonatkozó VTE gyakorisági értékeket. A XII. táblázatban található értékek a mérvadóak.

7, A 28. ábrán (168. old) az ábra alatti szöveg szerint a p-anti-FXa teszt kondícióinak kialakításakor a legalacsonyabb abszorbanca érték 5 percnél adódott. Ezzel szemben magán az ábrán a legalacsonyabb értéket 600 s (vagyis 10 perc) mellett látjuk.

Egyetértek az opponenssel és köszönöm az észrevételt. A 600 sec valóban 10 percnél felel meg, az ábra alatti szövegben szereplő 5 perc elírás.

Az opponensi értékelést és kérdéseket, melyek nemcsak rávilágítanak e szakterület szépségére és komplexitására, de tovább gondolkodásra is késztettek, még egyszer hálásan köszönöm és tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Debrecen, 2026. február 13.


Dr. Bereczky Zsuzsanna