

Válasz

Dr. Tordai Attila

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

Hálásan köszönöm opponensemnek az MTA doktori értekezésem részletes, releváns kritikai megjegyzésekkel ellátott, az elmúlt 16 éves kutatómunkám elismerését kifejező, támogató bírálatát.

Tartalmi észrevételeivel teljes mértékben egyetértek, azokat elfogadom. Valóban szerencsés lett volna az egyes – eredményeket taglaló – fejezetekben megjelölni az azokra vonatkozó, az értekezés alapjául szolgáló közleményeimet és mellékelni a dolgozathoz, a könnyebb követhetőség érdekében. Megerősítem, hogy az értekezés eredményeket bemutató fejezeteiben az ábrák aláírásában megjelölt közlemények mindegyike az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények közül került ki. A második kritikai észrevétellel is egyetértek, az új eredmények mellett az azokra vonatkozó közlemények feltüntetése, időrendi kontextusba helyezve, valóban segítette volna az olvasót eligazodni a kutatómunkám közel 2 évtizedes időtengelyén.

Külön köszönöm az opponensi kérdéseket, melyek további gondolkodásra sarkallnak, és melyekre - pontról pontra - az alábbiakban válaszolok.

a, A témaválasztás során a jelöltnek milyen sajátos kihívásokkal kellett szembenéznie? Miért maradt ki néhány szintén izgalmas ritka hemosztázis-zavar miatti kórkép, pl. thrombocyta-funkció zavarok, ritka von Willebrand-kór formák, dysfibrinogenaemia?

Köszönöm opponensemnek ezt a kérdést, melyből kiderül számomra, hogy ismerve a szakterület komplexitását, opponensem átlátja, hogy a témaválasztás során kompromisszumokat kellett kötnöm. Az értekezés témájának kijelölése során igyekeztem egyensúlyt teremteni a vérzékenységek és a thrombophiliák kutatása során elért eredményeim bemutatása között, érzékeltetve azt, hogy a ritka hemosztázis rendellenességek mindkét nagy (alap) típusát egyformán fontosnak tartom betegellátó, oktató és kutató munkámban egyaránt. A terjedelmi korlátokat azonban figyelembe kellett vennem, ezért ki kellett hagynom bizonyos betegségekkel kapcsolatos eredményeink ismertetését a dolgozathoz. Fontosnak tartottam továbbá bemutatni azt is, hogy a ritka vérzékenységek és thrombophiliák között is vannak olyan kórképek (Osler-kór és antitrombin deficiencia), melyek hazánkban, alapító hatás jelenléte miatt, sajátos jellegzetességekkel bírnak. Tekintettel a ritka vérzékenységek és thrombophiliák sokszínűségére, a sokféle kórképre, az orvosi biológiai kutatásokban tapasztalható metodikai fejlődésre, ami lehetővé teszi egy-egy szűkebb problémakör igen mélyreható kutatását, ma már egyre nehezebb minden tématerülettel egyforma mélységgel foglalkozni és – bármennyire is frusztrálóan hat – be kell látni, hogy igazán hatékonyan csak egy kiválasztott problémakört tudunk vizsgálni. Számomra az antitrombin deficiencia jelenti ma ezt a kiválasztott területet, ahol nagy lelkesedéssel, kiváló nemzetközi kollaborációs partnerekkel, egymást segítve és inspirálva tudunk dolgozni. Az értekezésben ezért foglal el viszonylag terjedelmes részt az antitrombin deficienciával kapcsolatos kutatások ismertetése. Mindez természetesen nem jelenti azt, hogy a ritka hemosztázis rendellenességek bármelyikét is hagynám elhanyagolni, kutatócsoportommal például próbálunk megbírkózni a veleszületett thrombocyta rendellenességek diagnosztikai kihívásaival, az új generációs szekvenálás adta lehetőségek kihasználásával, illetve felkaroljuk a haemophiliás betegek új koncepció (nem

helyettesítő terápia, „rebalancing” terápia) szerinti profilaxisának laboratóriumi monitorozását és próbálunk módszereket standardizálni ennek érdekében. E klinikai laboratóriumi kutatások jelenleg zajlanak, az értekezésben ezért még nem kerülhettek ismertetésre.

b, Az 5.1.5. alfejezetben tárgyalt „differenciáldiagnosztika haemorrhagias diathesisek” témakörben milyen körülmények esetén lát a jelölt kedvező lehetőséget az új generációs szekvenálás (NGS) bevezetésére a rutin diagnosztikai algoritmusba, melyek a bevezetés legfontosabb pozitív hatásai, illetve melyek a költségek és a logisztikai kihívások?

Nagyon köszönöm az elgondolkodtató és jövőbe mutató kérdést. Az NGS módszerek egyre szélesebb körben való elterjedése nyomán a genetikai diagnosztika, legalábbis módszertani szempontból, ma már realitás. A rutin diagnosztikába való bevezetése és algoritmusokba illesztése vonatkozásában azonban számos szempont merül fel.

Először is, szakmai szempontból, illetve a betegellátás során a diagnosztikai folyamat gyorsasága szempontjából jól meg kell tudni határozni azokat a kórképeket, ahol a genetikai diagnosztika és az ezzel járó – ma még – hosszabb időt igénylő diagnosztikai folyamat valóban segíti az ellátást, illetve egyértelműen befolyásolja a beteg terápiáját, profilaxisát. A ritka coagulopathiák esetében például az alvadásifaktor meghatározások egyértelmű és gyors diagnózist nyújtanak, ott a genetikai vizsgálatok inkább megerősítő szereppel bírnak, bár a komplex diagnosztikai folyamatból véleményem szerint nem elhagyhatóak. Ezzel szemben, például a thrombocyt funkció zavarok és a vascularis vérzékenységek diagnosztikájában a genetikai vizsgálatok (NGS) szerepe felértékelődik, egyrészt a hiányos laboratóriumi vizsgálati lehetőségek, másrészt a betegségek háttérben potenciálisan részt vevő extrém nagy számú gén és variáns miatt. Bizonyos kórképek esetén (pl. von Willebrand betegség, Osler-kór), az NGS vizsgálatok rutin diagnosztikai algoritmusba illesztésével kapcsolatban léteznek nemzetközi ajánlások (*James et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. Blood Advances 2021;5:280-300., Hammill et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT): a practical guide to management. Hematology 2021;1:469-77*). Von Willebrand betegséggel kapcsolatban az ajánlás jól definiált helyre illeszti a genetikai vizsgálatot a számos laboratóriumi vizsgálómódszer sorában, és 2B, illetve 2N altípusok gyanúja esetén előtérbe helyezi azt. A von Willebrand betegség 2B altípusa esetén ez egyrészt azért indokolt, mert a differenciáldiagnosztikában gyakorlatilag egyedül a risztocetin indukálta thrombocyt aggregáció (RIPA) segít, ugyanakkor ezt a vizsgálatot csak frissen vett vérmintából, arra felkészült laboratórium tudja elvégezni. A beteg vérmintája tehát – a genetikai vizsgálatra szánt mintával ellentétben - nem szállítható, logisztikai szempontból viszont egyszerűbb, ha a minta utazik és nem a beteg, vagyis a genetikai vizsgálat elvégzése könnyebben megszervezhető. Másrészt, vannak olyan atípusos 2B esetek, ahol a multimerszerkezet normál és a vérzéses kockázat megítélése bizonytalan, itt is a konkrét mutáció ismerete segít eldönteni a beteg további kezelését. A 2N von Willebrand esetekben a haemophilia A-tól való elkülönítésben alkalmazott von Willebrand faktor-FVIII kötődés vizsgálata (vWF:FVIIIIB) szintén limitáltan érhető el a laboratóriumok számára és ma már egyszerűbb és a jövőben egyre olcsóbb lesz a genetikai vizsgálat elvégzése a vWF:FVIIIIB vizsgálathoz viszonyítva, valamint ismert, kóroki mutáció detektálása esetén a további tesztek feleslegessé válnak. Osler-kór esetén pedig egyáltalán nem léteznek egyszerű laboratóriumi tesztek, így a klinikai gyanú felvetését követően közvetlenül a génpanel szekvenálás jön szóba, ami ma az *ENG*, *ACVRL1*, *SMAD4*, *RASA1*, *GDF2*, *BMPT2* és az *EPHB4* gének együttes vizsgálatát jelenti.

Másodszor, igen fontos szempont a genetikai találatok interpretációjának kérdése. A korábban már leírt, karakterizált és egyértelműen patogénnek, vagy éppen benignusnak ítélt mutációk interpretációja egyértelmű, és egyértelmű segítséget jelent a betegellátásban részt

vevő, a beteggel közvetlen kapcsolatban álló klinikus számára. Minél több genetikai vizsgálatot végzünk, annál gyakrabban találkozunk azonban bizonytalan jelentőségű variánsokkal, úgynevezett VUS-okkal („variant of undetermined significance”), melyek interpretációs problémákat okoznak. Az NGS vizsgálatok rutin diagnosztikai algoritmusokba illesztésének ez ma egy jelentős kihívása és számos esetben inkább a vizsgálatok rutinszerű végzése ellen szól. Az nem kérdés, hogy a jövőben a genetikai vizsgálatok döntő szerepet fognak játszani a véralvadási rendellenességek diagnosztikájában, hiszen a diagnosztikai folyamatokat leegyszerűsítik, de ehhez hatékony interpretációs segítségre van szükség. A Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság (ISTH) „OMICS” albizottsága (<https://my.isth.org/communities/community-home?CommunityKey=d74cfe3a-34bf-42db-8c5c-5e6e6d70da70>) felvállalta ezt a küldetést és célja, hogy a hemosztázis rendellenességek diagnosztikájában meghatározza azon gének (Tier 1, Tier2 kategóriába tartozó 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 valóban hatékony segítséget fog nyújtani a leletinterpretációban. A gyakorlati betegellátás szempontjából tehát fontosnak tartom, hogy megalapozottan végezzünk NGS vizsgálatot, azaz jól kivizsgált, klinikai és laboratóriumi szempontból jól karakterizált betegben, ezzel csökkentve a fals pozitív (és fals negatív) találatok lehetőségét. Az NGS egyre szélesebb körben való elérhetősége, ugyanakkor a fentiekben vázolt interpretációs nehézségek miatt azonban szintén fontos, hogy olyan szakemberek vezessék a diagnosztikai folyamatokat, akik mindkét szakterületen, a hemosztazeológiában és a klinikai genetikában is jártasak.

Harmadik szempontként említem meg a vizsgálatok anyagi és szervezési kérdéseit. Az NGS vizsgálatok költsége egyre csökkenő tendenciát mutat, és ha figyelembe vesszük, hogy egy analízissel számos kérdést megválaszolunk, voltaképpen megéri. A vizsgálatokat ma már hazánkban is végezhetjük NEAK finanszírozás mellett. Azt is érdemes azért megemlíteni, hogy a szükséges műszerpark és a kisegítő szoftverek beszerzése igen költséges. Ez, és a kellő számú szakember hiánya ma szűk keresztmetszetet jelent. Így nem életszerű, hogy számos, parallel laboratóriumban történjenek ilyen jellegű vizsgálatok, hanem inkább regionális centrumokban, klinikai genetika, illetve klinikai és laboratóriumi hemosztazeológiai ellátást biztosító intézményekbe szerveződve célszerű ezt az igen speciális szeletét a betegellátásnak, végezni.

c, Az 5.2.1.1. alfejezetben értékes adatok kerültek bemutatásra jelentős számú antitrombin deficienciában szenvedő beteg elemzésével, amely 3 cikkben került közlésre (Gindele et al. Thromb Res 2017, Bereczky et al, Front Card. Med 2021 és Gindele et al. J Thromb Haemost 2016). Már a 2016-os és 2017-es cikkekben is azonosításra került az alapító (founder) hatás a AT Budapest 3 (ATBp3, p.Leu131Phe) mutáció hátterében, a roma (cigány) eredet viszont csak a 2021-es cikkben került közlésre. Volt-e lehetőség a roma származásra vonatkozó információ szisztematikus, retrospektív feldolgozására az eredeti, 2016-2017-es n=102 beteg-kohorszban?

Köszönöm szépen az alapító hatásra és az ATBp3 mutáció roma eredetére vonatkozó kérdést. A mutáció alapító hatását valóban, már 2016-ban közzétettük, és roma eredetére már ekkor voltak sejtéseink, de ezt a roma populációra vonatkozó szisztematikus minta-és adatgyűjtést követően, elegendő számú minta elemzése után tudtuk csak közölni, 2021-ben. Ekkorra vált lehetővé számunkra egy nagy elemszámú (n=1185 főből álló), az általános roma populációt reprezentáló kohorsz és megerősítő vizsgálat céljára egy n=402 főből álló, észak-kelet magyarországi szegregált roma településeken élőktől származó minta. Sajnos, retrospektív, szisztematikus adatfeldolgozásra nem volt később lehetőségünk, a roma származás nem minden korábban

toborzott betegnél volt egyértelműen igazolható, de az n=102 fő korábban toborzott beteg közül biztosan roma származású volt n=14 ATBp3 homozigóta személy (az n=26 személy közül) és n=32 ATBp3 heterozigóta személy (az n=76 személy közül). Mivel a fennmaradó betegek származása egyértelműen nem volt besorolható, ebből az adathalmazból megbízható statisztikai elemzést nem lehetett végezni.

d, Van-e megerősítő nemzetközi információ az ATBp3 gyakori jelenlétére más roma populációkban, esetleg Indiában?

Tekintettel arra, hogy más populációkban a miénkhez hasonló szisztematikus vizsgálatot nem végeztek, és arra, hogy – legalábbis az ismert adatok szerint - más európai országokban az ATBp3 előfordulási gyakorisága igen alacsony, megbízható megerősítő információkkal nem rendelkezünk. Szórványos eset leírásokban, illetve kisebb kohorsz vizsgálatokban tettek eddig utalásokat ATBp3 mutációval rendelkező roma betegekre, de ezek a közlések nem a mutáció eredetének vizsgálatára irányultak és nem gyűjtöttek adatokat a betegek származásáról (pl. *Kuhle et al. Homozygous antithrombin deficiency type II (99 Leu to Phe mutation) and childhood thromboembolism. Thromb Haemost 2001; 86: 1007–11.*, *Olivieri et al. Arterial thrombosis in homozygous antithrombin deficiency. Hamostaseologie. 2012; 32 Suppl 1:S79-82.*). A magyar adatok után a legtöbb információ a spanyolországi antitrombin deficiens kohorszból származik, az ott diagnosztizált ATBp3 betegek között is gyakoriak a roma származású betegek, melyről a spanyol munkacsoporttal közös közleményünkben említést tettünk (*de la Morena-Barrio et al. 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 2021;96:1363-73.*). A közelmúltban megjelent „How we treat” típusú közös közleményünkben szereplő spanyolországi és magyarországi beteg is roma származású (*Bravo-Pérez et al. How we treat severe inherited antithrombin deficiency: lessons from cases homozygous for the Budapest 3 variant. J Thromb Haemost 2025;23:1648-56.*). Az opponens Indiára vonatkozó felvetése nagyon érdekes, és meggyőződésem, hogy indiai beteg populációk célzott vizsgálatával közelebb jutnánk annak a kérdésnek a megválaszolásában is, hogy az ATBp3 mutáció milyen körülmények között került be Európába (amennyiben nem itt alakult ki), illetve melyik indiai népcsoporthoz köthető a jelenléte. Jelenleg nincs kapcsolatunk indiai thrombosis munkacsoportokkal, de ez egy izgalmas jövőbeli kutatási együttműködés lehetne.

e, Hogyan látja a jelölt annak lehetőségét, hogy a származási információ ismeretében a diagnosztikai algoritmus korai szakaszában megtörténjen a célzott genetikai vizsgálat a AT Budapest 3 mutáció kimutatására?

Köszönöm szépen az antitrombin deficiencia diagnosztikai algoritmusára vonatkozó, nagyon releváns kérdést. Az ATBp3 mutáció alapító hatásának igazolását követően a célzott genetikai vizsgálatot beépítettük a diagnosztikus algoritmusunkba, ahogyan azt az értekezés 30. ábráján (173. oldal) bemutattam. Ekkor a kivizsgálás során, az elsővonalbeli, heparin kofaktor antitrombin aktivitás tesztben kapott kóros eredményt az antitrombin mennyiségi meghatározása követte, amellyel eldifferenciáltuk a kvantitatív I-es típusú eseteket a minőségi, II-es típusú esetektől, majd – amennyiben II-es típusú antitrombin deficienciáról volt szó – elvégeztük a progresszív antitrombin aktivitás tesztet, aminek normál eredménye (vagy legalábbis a heparin kofaktor aktivitáshoz képest aránytalanul magas értéke) utalt a IIHBS típusú, azaz a heparin kötés zavarával járó állapotra. A célzott, ATBp3 mutáció kimutatására irányuló genetikai vizsgálat ezen a ponton került beillesztésre az algoritmusba, ami az esetek többségében (több mint 70%-ban) biztosította a diagnózist. Az ATBp3 mutációra negatív esetekben történt csak további genetikai vizsgálat.

Az ATBp3 mutáció roma populációban észlelt és bizonyított magas előfordulási gyakoriságára tekintettel (ami egyébként hatással van a teljes, főként kelet-magyarországi lakosság antitrombin deficiens eseteinek genotípusára), ma a célzott genetikai vizsgálatot még előrébb helyeztük az algoritmusban és – eltérve a nemzetközi trendektől – az elsővonalbeli, heparin kofaktor antitrombin aktivitás kóros értékének észlelésével egy időben megtörténik a progresszív antitrombin aktivitás meghatározás, melynek normál (vagy aránytalanul magasabb) értéke esetén a kivizsgálást azonnal az ATBp3 célzott detektálása felé irányítjuk. Nem várjuk tehát meg az antitrombin antigén mérés eredményét, de azért annyit megteszünk, hogy a IIHBS típust, a genetikai vizsgálatot megelőzően, igazoljuk. Ez nem jelent semmiféle időbeli késlekedést, hiszen azonos mintából, egy időben történik a kétféle aktivitás meghatározás. Az algoritmusban, negatív ATBp3 eredmény, de IIHBS típus igazolódása esetén a *SERPINC1* gén 2-es exonjának analízise történik, amivel megtaláljuk a szintén gyakran előforduló egyéb IIHBS típusokat (AT Basel, AT Padua). Ezzel a lépéssel gyakorlatilag 20%-nál kevesebb mutáció negatív eset marad. Ezen a ponton észlelt negatív eredmény esetén folytatjuk a kivizsgálást az AT antigén meghatározás és a teljes *SERPINC1* szekvenálással. Tapasztalatunk szerint ezzel a stratégiával tudunk ma leghatékonyabban és leggyorsabban diagnózist biztosítani az antitrombin deficiencia felmerülése esetén.

A roma populáció thromboticus betegségek iránti fokozott fogékonysága nemcsak életmódbeli tényezőkből fakad, hanem genetikai meghatározottságból is. A hazai roma közösségek nagy áteresztőképességű genetikai vizsgálatával, népegészségügyi kutatásokban igen magas genetikai rizikó pontszámot állapítottak meg, melynek az ATBp3 mutáció is egyik összetevője (*Fiatal et al. Genetic profiling revealed an increased risk of venous thrombosis in the Hungarian Roma population. Thromb Res 2019;179:37-44., Natae et al. 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. 2021; 8:647416.*). A magasabb genetikai kockázat háttérben az alacsonyabb genetikai diverzitást és alapító mutációk jelenlétét feltételezik, melyek közül a FV Leiden mutáció magas előfordulási arányát Balogh István és munkatársai már korábban leírták (*Balogh et al. High frequency of factor V Leiden mutation and prothrombin 20210A variant in Romanies of Eastern Hungary. Thromb Haemost 1999;82:1555-6.*), az ATBp3 mutációt pedig mi igazoltuk és jelen értekezésben ismerttettem. A roma népesség méretét és az ATBp3 előfordulási gyakoriságát figyelembe véve régiókban kb. 20-25 ezer érintett roma él, de ez a szám a környező országokat is beleszámítva, még magasabb lehet (*Commission E. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. An EU Framework for National Roma Integration Strategies Upto 2020. Brussels (2011).*). Mindezen adatok birtokában opponensem kérdése még inkább időszerű és előre mutat egy differenciált, a személyre szabott orvoslás és a preventív medicina irányába történő stratégiaváltás szükségessége felé.

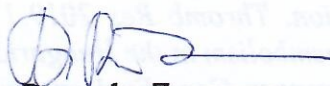
f, A gyakori elterjedés oki tényezőjeként felvetődhet-e szelekciós előny az AT Budapest 3 (ATBp3, p.Leu131Phe) mutáció heterozigóta hordozó nőknél, ami esetleg kisebb perinatális vérzési kockázattal járhat hasonlóan az V. faktor Leiden mutációnál feltételezettekhez?

A FV Leiden mutációnál, annak alapító hatásának igazolását követően valóban felvetődött szelekciós előnye, a különböző vérvesztéssel járó állapotokban a túlélésre kedvező hatása. A FV Leiden mutáció esetében egy mintegy 21 ezer éves mutációról van szó, ami a földünk jelentős számú lakosságát érinti, a mutáció főleg az európai népességben van jelen és feltételezik, hogy az Afrikából történő elvándorlást követően keletkezett (*Rees et al. World distribution of factor V Leiden. Lancet. 1995;346:1133-1134.*) A mutáció heterozigóta formájának jelenléte nem okoz súlyos thrombophiliát, a fertilitásra sincs hatással, azonban a

perinatalis és egyéb vérveszteségek mérséklésében előnyös lehet, ezért maradhatott fent, illetve terjedhetett el (*Lindqvist et al. Activated protein C resistance (FV:Q506) and pregnancy. Thromb Haemost. 1999;81:532-537.*). Az ATBp3 mutáció vonatkozásában is logikus ez a feltételezés, ugyanis – az egyéb típusú antitrombin deficienciákkal szemben – szinte ez az egyetlen olyan variáns, ami heterozigóta formában kevésbé súlyos thrombophiliát jelent, és ahol a homozigótaság sem letális. A roma törzsek vándorlása során feltehetően előnyösnek bizonyult minden olyan genetikai variáns, ami a vérveszteségek ellen hatott. A mutáció elterjedésének hátterében annak szelekciós előny mivolta azonban jelenleg inkább spekuláció lenne, úgy gondolom, hogy ebben a vonatkozásban az eddig rendelkezésre álló adataink nem elegendőek. Nem ismerjük a mutáció valódi eredetét, Európán és Észak-Amerikán kívüli elterjedtségének mértékét és nem vizsgáltuk kombinált előfordulását sem egyéb hemosztázis tényezőkkel. Érdekes epidemiológiai vizsgálatot jelenthetne a peripartum vérzések és a fiziológiás antikoagulánsokat érintő gyakori variánsok összefüggéseinek tanulmányozása.

Az opponensi értékelést és izgalmas kérdéseket, melyek rávilágítanak e szakterület komplexitására, még egyszer hálásan köszönöm és tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Debrecen, 2026. február 13.



Dr. Bereczky Zsuzsanna