

zsbereczky_271_24

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

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



DR. BERECHKY ZSUZSANNA

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

DEBRECEN, 2025

ELŐSZÓ

Doktori értekezésem megírásával céloim annak a pontosan húsz éve folytatott munkának az összefoglalása volt, amit a ritka hemosztázis rendellenességekben szenvedő betegek ellátásával kapcsolatban végeztem. Ez idő alatt a klinikai kutatások több területét is megismerhettem, úgymint a „betegágytól a laboratóriumig” (pl. esettanulmányok), vagy a „laboratóriumtól a betegágyig” (pl. diagnosztikai módszerfejlesztések) típusú kutatások, vagy a különböző típusú obszervációs klinikai tanulmányok, és a ritka betegségek kutatásának speciális módszertanával foglalkozhattam. Az a cél vezérelt és vezérel ma is, hogy a ritka betegségekkel, ezen belül a ritka véralvadási rendellenességekkel élő betegek számára jobb ellátást biztosíthassunk. Ennek egyik legfontosabb eleme a hatékonyabb diagnosztikai lehetőségek megtalálása, ami lerövidítheti a definitív diagnózisig eltelt időt, ami az ún. gyakori betegségekhez képest gyakran aggasztóan hosszú. A jobb teljesítőképességű laboratóriumi tesztek kidolgozása, valamint a hazai betegpopulációra jellemző eltérések észrevétele és leírása mind hozzájárulnak a diagnosztikai hatékonyság növeléséhez. A ritka hemosztázis rendellenességek hátterében álló molekuláris mechanizmusok megértése és e folyamatokban szerepet játszó fehérjék struktúrájának-funkciójának feltérképezése nemcsak a diagnosztika fejlesztését segíti, de terápiás konzekvenciával is bír.

A klinikai és laboratóriumi hemosztazeológia már egyetemi tanulmányaim során érdeklődésem középpontjában állt, ami nem véletlen, hiszen mentoromnak tudhattam Muszbek László akadémikus urat, akitől a tudományos kérdések felé történő lelkes odafordulást és a kutatómunka iránti elkötelezettséget, a becsületes, kitartó és állhatatos munkamorált tanulhattam meg. Ő igazi példakép, tanítványaként ma is az ő zsinórmértéke mentén képzelem el a szakmai életemet.

A betegekhez és problémáikhoz való odafordulás tekintetében példaképeim egyértelműen a gyakorló orvosként dolgozó szüleim. Az ő lelkiismeretes, empátikus személyiségük, végtelen szorgalmuk és fáradhatatlanságuk számomra ma is lenyűgöző. Tőlük olyan biztos alapot és támogatást kaptam, ami felbecsülhetetlen; megfeleléskényszer nélkül, de mégis a megfelelés vágyával végeztem a tanulmányaimat és végzem szakmai munkámat ma is.

zsbereczky_271_24

Az értekezésben áttekintem a ritka vérzékenységek és ritka thrombophiliák területén végzett kutatásaimat, terjedelmi korlátok miatt a teljesség igénye nélkül, de kiemelve a legfontosabb eredményeimet, melyek a hazai és a nemzetközi szakmai - tudományos közösség számára is érdekesnek, hasznosnak bizonyultak.

TARTALOMJEGYZÉK

1	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
2	BEVEZETÉS.....	15
2.1	A hemosztázis modern koncepciója, pro-és antikoaguláns tényezői.....	16
2.2	A ritka betegségek definíciója, vizsgálatuk korlátai, tanulmányozásuk lehetőségei.....	21
2.2.1	A ritka, veleszületett vérzékenységek	23
2.2.1.1	A XIII-as faktor deficiencia.....	24
2.2.1.2	Az V-ös faktor deficiencia	27
2.2.1.3	A X-es faktor deficiencia	30
2.2.1.4	Egyéb ritka vérzékenységek: a von Willebrand betegség ritka formái	32
2.2.1.5	Egyéb ritka vérzékenységek: a dysfibrinogenaemia	34
2.2.1.6	Egyéb ritka vérzékenységek: a hereditaer haemorrhagias teleangiectasia	36
2.2.2	A ritka veleszületett thrombophiliák.....	37
2.2.2.1	Az antitrombin szerepe a hemosztázis szabályozásában, az antitrombin deficiencia klinikuma, jellegzetességei, laboratóriumi diagnosztikája.....	40
2.2.2.2	A protein C-protein S rendszer szerepe a hemosztázis regulációjában, a protein C deficiencia klinikai és laboratóriumi jellegzetességei	50
3	CÉLKITŰZÉSEK	59
3.1	Vérzékenységek.....	59
3.2	Thrombophiliák.....	60
3.2.1	Antitrombin deficiencia	60
3.2.2	Protein C deficiencia.....	60
4	BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	62
4.1	Vizsgálatok haemorrhagias diathesisekben	62
4.1.1	Betegek.....	62
4.1.1.1	XIII-as faktor deficiencia.....	62
4.1.1.2	V-ös faktor deficiencia	63
4.1.1.3	X-es faktor deficiencia.....	63
4.1.1.4	Hereditaer haemorrhagias teleangiectasia	64
4.1.1.5	A von Willebrand betegség (vWD) fibrinogén rendellenességek és HHT differenciáldiagnosztikai problémát jelentő esetei.....	64
4.1.1.6	Populációs kontroll személyek	65
4.1.2	Laboratóriumi vizsgálatok.....	65
4.1.2.1	Rutin hemosztazeológiai módszerek	65
4.1.2.2	Rutin genetikai vizsgálatok	67
4.1.2.3	Speciális genetikai vizsgálatok.....	67
4.1.2.4	Speciális, in-house hemosztázis laboratóriumi módszerek.....	71
4.1.2.5	Biokémiai vizsgálatok mutáns fehérjéken	73
4.1.2.6	In silico analízisek.....	75
4.1.3	Etikai engedélyek	75
4.2	Vizsgálatok ritka thrombophiliákban	76
4.2.1	Betegek.....	76
4.2.1.1	Antitrombin deficiencia	76
4.2.1.2	Protein C deficiencia.....	81
4.2.2	A ritka thrombophiliák laboratóriumi vizsgálatai	82
4.2.2.1	Rutin laboratóriumi és hemosztazeológiai módszerek.....	82
4.2.2.2	Az antitrombin aktivitásának meghatározására szolgáló, munkacsoportunk által kidolgozott módszerek	83
4.2.2.3	Rutin genetikai vizsgálatok az antitrombin és Protein C deficienciák diagnosztikájában	86
4.2.2.4	Speciális genetikai vizsgálatok antitrombin deficienciában	88

4.2.2.5	Vad típusú és mutáns antitrombin variánsok, illetve protein C variánsok in vitro expressziója	91
4.2.2.6	Speciális hemosztázis laboratóriumi módszerek és biokémiai vizsgálatok antitrombin és protein C deficienciában.....	92
4.2.2.7	A vad típusú és mutáns antitrombin és protein C intracelluláris megjelenésének vizsgálata immunfestéssel és konfokális lézer szkennning mikroszkópiával	95
4.2.2.8	In silico vizsgálatok antitrombin és protein C deficienciában.....	96
4.2.2.9	Statisztikai módszerek.....	100
4.2.3	Etikai engedélyek	101
5	EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	102
5.1	Vizsgálatok haemorrhagias diathesisekben	102
5.1.1	XIII-as faktor deficiencia.....	102
5.1.1.1	Rutin és speciális diagnosztika	102
5.1.1.2	Klinikai és laboratóriumi tanulságok, a XIII-as faktor deficiencia kivizsgálásának irányelvei	104
5.1.2	V-ös faktor deficiencia.....	107
5.1.2.1	Rutin és speciális diagnosztika	107
5.1.2.2	A p.Gly521Arg mutáció strukturális következményei – In silico analízis	110
5.1.2.3	Megbeszélés, klinikai tanulságok.....	111
5.1.3	X-es faktor deficiencia	113
5.1.3.1	Rutin és speciális diagnosztika	113
5.1.3.2	A p.Gly244Arg mutáció következményeinek vizsgálata in vitro expressziós kísérletekben.....	113
5.1.3.3	A p.Gly244Arg mutáció következményeinek vizsgálata in silico kísérletekben	117
5.1.4	Hereditaer haemorrhagias teleangiectasia	119
5.1.4.1	A kórkép rutin klinikai diagnosztikája	119
5.1.4.2	Alapító mutáció igazolása hereditaer haemorrhagias teleangiectasiában ...	119
5.1.4.3	A hereditaer haemorrhagias teleangiectasia diagnosztikai hatékonyságának javítása érdekében tett lépéseink	123
5.1.5	Differenciáldiagnosztika haemorrhagias diathesisekben.....	124
5.1.5.1	Differenciáldiagnosztikai problémát jelentő esetek Osler-kórban	124
5.1.5.2	Differenciáldiagnosztikai problémák megoldása és tudományos szempontból érdekes esetek von Willebrand betegségben.....	125
5.1.5.3	Differenciáldiagnosztikai problémák megoldása és tudományos szempontból érdekes esetek fibrinogén rendellenességekben	135
5.2	Vizsgálatok ritka thrombophiliákban	143
5.2.1	Az antitrombin deficiencia előfordulása Magyarországon, a p.Leu131Phe (AT Budapest 3) variáns magas gyakorisága; klinikai jellegzetességei	143
5.2.1.1	Az antitrombin deficiencia hazánkban előforduló típusai és klinikai jellemzői	143
5.2.1.2	Az antitrombin deficiencia megjelenése speciális betegcsoportokban.....	154
5.2.2	Az antitrombin deficiencia laboratóriumi diagnosztikájára szolgáló funkcionális tesztek, elsősorban a hc-anti-FXa és p-anti-FXa tesztek evaluációja.....	163
5.2.2.1	Az anti-FXa alapú teszt összehasonlítása az anti-FIIa alapú teszttel	163
5.2.2.2	A p-anti-FXa esszé kidolgozása és evaluációja.....	167
5.2.2.3	A különböző anti-FXa tesztek szenzitivitásának összehasonlítása a IIHBS ATD diagnosztikájában	174
5.2.3	Az Antitrombin Budapest 3 mutáció alapító hatása.....	177
5.2.3.1	A mutáció alapító hatásának igazolása.....	177
5.2.3.2	Az alapító mutáció korának meghatározása	182
5.2.4	A különböző IIHBS antitrombin deficienciák heparin-kötésének vizsgálata, a különbségek felderítése biokémiai és in silico módszerekkel.....	185
5.2.4.1	A különböző IIHBS ATD típusok heparinnal való kapcsolatának in vitro és ex vivo biokémiai vizsgálata.....	185
5.2.4.2	A különböző IIHBS ATD típusok vizsgálata in silico módszerekkel.....	189

5.2.5	Az új Antitrombin mutációk klinikai, laboratóriumi és biokémiai karakterizálása	196
5.2.5.1	Az AT Debrecen klinikai és laboratóriumi jellemzői	196
5.2.5.2	Az AT Debrecen biokémiai karakterizálása és in silico jellemzése	197
5.2.5.3	A kilenc új, korábban nem karakterizált antitrombin mutáció klinikai és laboratóriumi jellemzői	200
5.2.5.4	A kilenc új, korábban nem karakterizált antitrombin mutáció biokémiai vizsgálata	201
5.2.6	Vizsgálatok protein C deficienciában	206
6	ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK RITKA HEMOSZTÁZIS RENDELLENESSÉGEKBEN	216
6.1	Vérzékenység.....	216
6.1.1	XIII-as faktor deficiencia.....	216
6.1.2	V-ös faktor deficiencia.....	216
6.1.3	X-es faktor deficiencia	217
6.1.4	Hereditær haemorrhagias teleangiectasia (Osler-Weber-Rendu kór)	217
6.1.5	Differenciáldiagnosztikai problémák megoldása veleszületett vérzékenységekben komplex speciális hemosztazeológiai vizsgálatokkal.....	217
6.2	Thrombophilia	218
6.2.1	Antitrombin deficiencia	218
6.2.2	Protein C deficiencia.....	220
7	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	221
8	REFERENCIÁK	224
9	AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	256
10	AZ ÉRTEKEZÉSBEN NEM TÁRGYALT, A PhD FOKOZAT MEGSZERZÉSE ÓTA MEGJELENT NEMZETKÖZI ÉS HAZAI KÖZLEMÉNYEK.....	259
11	CSOPORTOS (MULTICENTRIKUS) KÖZLEMÉNYBEN SZAKMAI KÖZREMŰKÖDŐ	267
12	SZERKESZTETT FELSŐOKTATÁSI TANKÖNYV, SZAKKÖNYV.....	267
13	FELSŐOKTATÁSI TANKÖNYV RÉSZEK	267
14	KÖNYVFEJEZET, SZAKTANULMÁNY.....	268
15	TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK.....	270

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5'LP	-	5' hossz polimorfizmus
ACMG	-	„American College of Medical Genetics” (Amerikai Orvosi Genetikai Társaság)
<i>ACVRL1</i>	-	aktivin 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	-	aktivin 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 immunelektroforézis
CLSI	-	„Clinical and Laboratory Standards Institute” (Klinikai és Laboratóriumi Standardizációs Intézet)
CLSM	-	konfokális lézer szkennig mikroszkóp
cM	-	centiMorgan
CM-AVM1	-	capillaris malformatio- arteriovenosus malformatio syndroma
CV	-	variációs koefficiens
DAB	-	3,3'-diaminobenzidin

zsbereczy_271_24

des-Gla APC	-	aktivált protein C, melyben nincs gamma-karboxi-glutamát domén
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle Médium
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	-	esélyhányados
<i>ENG</i>	-	endoglin gén (humán)
EPCR	-	endoteliális protein C receptor
ER	-	endoplazmatikus retikulum
ERN	-	European Reference Network
<i>F5</i>	-	a véralkadás V-ös faktort kódoló gén (humán)
<i>F8</i>	-	a véralkadás VIII-as faktort kódoló gén (humán)
<i>F13A1</i>	-	a véralkadás XIII-as faktortnak A alegységét kódoló gén (humán)
<i>F13B</i>	-	a véralkadás XIII-as faktortnak 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 véralkadás IX-es faktora
FIXa	-	a véralkadás aktív IX-es faktora
FII	-	protrombin
FIIa	-	trombin
Fng	-	fibrinogén (Clauss módszerrel mérve)
Fng Ag	-	fibrinogén antigén
FRET	-	fluoreszcencia rezonancia energia transzfer
FV	-	a véralkadás V-ös faktora
FVa	-	a véralkadás aktív V-ös faktora

zsbereczy_271_24

FVi	-	a vérárvadás inaktivált V-ös faktora
FVII	-	a vérárvadás VII-es faktora
FVIIa	-	a vérárvadás aktív VII-es faktora
FVIII	-	a vérárvadás VIII-as faktora
FVIIIa	-	a vérárvadás aktív VIII-as faktora
FVL	-	Faktor V Leiden polimorfizmus
FX	-	a vérárvadás X-es faktora
FXa	-	a vérárvadás aktív X-es faktora
FXIII	-	a vérárvadás XIII-as faktora
FXIIIa	-	a vérárvadás aktivált XIII-as faktora
FXIII-A	-	a XIII-as faktor A (katalitikus) alegysége
FXIII _{A₂B₂}	-	a vérárvadás 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>GPIBA</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 vizsgálatokhoz használt szoftver)
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 sejtvonat
HeZ	-	heterozigóta
HGMD	-	„Human Genom Mutation Database” (Humán Genom Mutációs Adatbázis)
HGVS	-	„Human Genom Variation Society”

zsbereczky_271_24

		(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
IIE	-	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
MRCA	-	legközelebbi közös ős
MVT	-	mélyvénás thrombosis
NET	-	neutrophil extracelluláris csapda
NGS	-	új generációs szekvenálás

zsbereczy_271_24

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 (vérlemezke receptor)
PAR4	-	proteáz-aktivált receptor 4 (vérlemezke 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>PROSI</i>	-	a protein S-t kódoló gén (human)
PRP	-	„platelet rich plasma” (thrombocyta dús plazma)
PS	-	protein S
PVDF	-	polivinilidén difluorid

zsbereczky_271_24

<i>RASAI</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 gél elektroforézis
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)

zsbereczy_271_24

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 antagonist
VMD	-	„Visual Molecular Dynamics” (biomolekulák elemzésére, ábrázolására szolgáló szoftver)
VSD	-	„variable secondary dichroic beamsplitter” (változtatható szekunder dikroikus sugárnyalábosztó 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 GpIbα 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 funkcionyerő mutáns rekombináns GpIbα fragmens jelenlétében risztocetin nélkül

zsbereczky_271_24

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 diagnosztikájának 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 véltnél 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 éreztem 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 [1]. 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 [2]. 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 [3].

Az intakt érfal számos olyan aktív mechanizmussal rendelkezik, ami a véralvadást nyugvó állapotban tartja [4,5]. A teljesség igénye nélkül megemlítve ilyenek például az endothel által expresszált ekto-ADP-áz (CD39), vagy a termelt prosztaciklin és nitrogén-monoxid; mindezek blokkolják a thrombocyta egészséges endotheliumhoz történő adhézióját és az aktivációt. Ugyanakkor az is ismert ma már, hogy nyugvó helyzetben is zajlik egy folyamatos, alacsony szintű alvadásifaktor aktiváció, egy ún. „üresjárat”, ami ugrásra készen azonnal képes a sérülésre gyors és hatékony választ adni. Az „üresjárat” létezésének bizonyítékai a keringésben normál állapotban is kimutatható kis mennyiségű X-es és IX-es alvadásifaktor aktivációs peptidek, valamint a szintén alacsony mennyiségben, de jelen lévő szöveti faktor (TF)-VII-es alvadásifaktor komplex [6,7]. A TF a vaszkuláris simaizomsejteken és az erek mentén

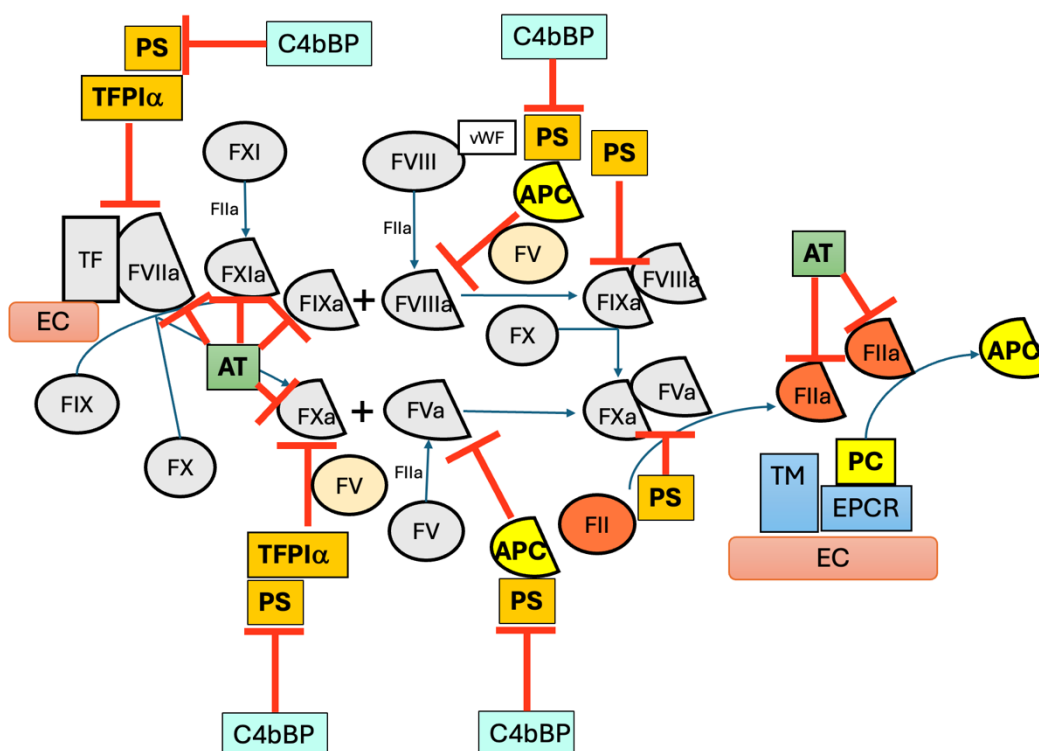
elhelyezkedő pericitákon expresszálódik, így ez a TF-FVIIa „készenléti egység” nem az intravascularis, hanem inkább az extravascularis térbe lokalizálódik. Szintén megtalálható itt IX-es alvadásifaktor (FIX) az extracelluláris matrix kollagén IV-hez kötve [8]. Az érfal sérülésekor az extracelluláris 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 kollagénszínhez, részben a von Willebrand-faktor (vWF) közreműködése révén [9]. A vWF a vérlemezék GPIb-V-IX receptorához kapcsolódik, ezzel horgonyozva azokat a kollagénszínhez, de közvetlen vérlemezke-kollagén kapcsolat is létrejön, amiben a thrombocytá GPVI és GPIIb/IIIa receptoroknak van szerepe [10]. A véralvadás ezen kezdeti fázisában az aktív 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 a 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 seregülő vérlemezék 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 nyilvánvalóan 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. A vérlemezék esetében azok GPIb receptorához kapcsolódva, majd konformációváltozáson keresztül menve képes a thrombocytá proteáz-aktivált receptorait (PAR) hasítani, így aktiválni azokat. Ez thrombocytá alakváltozást („shape change”), valamint a foszfatidil-szerin külső membrán felszínén történő expresszióját eredményezi, ami az alvadásifaktor komplexek számára elengedhetetlenül fontos horgonyzó és aktiváló felszín [11]. A kis mennyiségű trombin által aktivált thrombocyták kiürítik granulumaik tartalmát. 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 [12]. 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 thrombocytákhoz és a trombinhoz a GPIb receptorhoz kötődés révén. Az amplifikációs lépés végén így rendelkezésre állnak az aktivált thrombocyták, 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 aktív kofaktorok és az iniciációs lépés óta rendelkezésre álló FIXa indítja. A FIXa-FVIIIa komplex (tenáz) aktiválja a FX-et a thrombocytá 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 thrombocyták GPIIb/IIIa receptorához – stabilizálja a „thrombocytá dugót”, azáltal, hogy elősegíti a thrombocytá aggregációt [13]. A trombin generáció sebessége hatással van a keletkező fibrinalvadék minőségére. A fibrinhez kapcsolt trombin egyrészt nem hozzáférhető az inhibitorok számára (ld. később), másrészt szerepe van abban, hogy ellenállóvá tegye az alvadékot a fibrinolízissel szemben. 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. (Ez az útvonal a korábban „intrinszik”-nek nevezett alvadási út, szemben a TF-FVIIa komplex által indított „extrinszik” úttal; ma már világos, hogy a fiziológiás alvadás az „intrinszik” úton nem tud elindulni, a FXI aktiválásával ennek az útnak csak itt, a propagációban van fiziológiás szerepe. Az in vitro előidézett alvadási folyamatokról itt most nem szólunk.) A trombin további thrombocytá aktivációhoz is vezet a PAR4 receptoron keresztül. Fontos szerepe van a trombinnak a vér alvadás 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 [14] (1. ábra).

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 [18,19]. Az aktivált PC (APC) hatékonyan inaktiválja a FVa és FVIIIa faktorokat három, illetve két kitüntetett helyzetben lévő arginin reziduum mellett történő hasítással [20]. A FVa inaktivációjakor az egyik hasítási hely az Arg506, ami a FV Leiden mutációja következtében Gln506-ra változva az ismert APC rezisztenciához vezet [21](ld. később). Az APC hatékony kofaktora a FVa inaktivációban a PS, a FVIIIa inaktivációban a PS és a natív FV [22]. Amint eddig láthattuk, a PS két különböző limitáló tényező mellett is kofaktorként szerepel, azonban az újabb adatok birtokában kijelenthetjük, hogy önálló antikoaguláns funkciókkal is rendelkezik [16]. A FXa és FVa, valamint FIXa és FVIIIa iránti közvetlen interakciója eredményeképpen a protrombináz és az intinszik tenáz komplexeket direkt módon gátolja, és e gátló funkciója mind a szabad PS frakciónak, mind pedig a C4bBP fehérjével kötött frakciónak megvan. (Ellentétben a kofaktor funkcióival, ahol csak a szabad frakciónak van aktivitása.)

Az antitrombin (AT) egy szerin proteáz inhibitor (SERPIN), a trombin és a FXa, valamint egyéb szerin proteáz alvadásifaktorok progresszív (lassan ható) inhibitora [23]. A gátlás sebessége heparin, vagy heparán szulfát proteoglikán jelenlétében jelentősen fokozódik. Az értekezésben az AT szerkezetével, funkciójával később részletesen foglalkozunk még, hiszen az AT deficienciák (ATD) vizsgálatával elért eredményeink az értekezés egyik hangsúlyos elemét képezik (**2. ábra**).

A fibrinthrombus degradációjáért a fibrinolitikus rendszer felelős [24-27]. Ennek kulcsenzime a plazmin, amely plazminogénből keletkezik elsősorban a szöveti plazminogénaktivátor hatására (t-PA). A fibrinolitikus rendszer és betegségei nem képezik az értekezés témáját, így e rendszer felépítéséről és fiziológiás működéséről sem írunk itt bővebben.



2. ábra. A véralvadás limitációs fázisának sémás ábrázolása.

EC, endothelsejt; TF, szöveti faktor; AT, antitrombin; PC, protein C; APC, aktivált protein C; PS, protein S; C4bBP, komplement 4b kötő fehérje; TM, trombomodulin; EPCR, endoteliális protein C receptor; TFPI α , szöveti faktor út inhibitor alfa; az alvadásifaktorokat a hagyományos, római számmal történő jelölés azonosítja; a gátló folyamatokat a piros tompa végű nyilak jelzik; az ábra bővebb magyarázata a fenti szövegben olvasható.

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 érdekérvényesítési tevékenységének és nagy részben különböző ritka betegségekkel foglalkozó kutatócsoportok nemzetközi szintű munkásságának köszönhetően – a ritka betegségeket egyre nagyobb figyelem övezi [28,29]. A ritka betegségekre ma már intézmények és bizottságaik szakosodtak az Európai Unióban (EU) és az Amerikai Egyesült Államokban (USA) egyaránt [30,31]. Az EU definíciója értelmében ritka betegségek azok a súlyos, akár életet veszélyeztető, vagy tartós egészségkárosodást okozó kórképek, melyek az általános populációban 1:2000, vagy annál alacsonyabb arányban fordulnak elő [32]. A becslések, illetve jelenleg

rendelkezésre álló adatbázisok szerint, kb. 5000-8000 ritka betegséget tartunk számon, melyek többsége veleszületett, monogénis betegség (pl. OMIM, Online Mendelian Inheritance in Men, <https://www.omim.org>). 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 (az USA-ban e betegek száma 25 millióra, az EU-ban 30 millióra tehető) ritka betegségben szenvedő egyént tartanak nyilván, ami nem elhanyagolható érték [33]. 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 [34]. Deklarációjában kiemeli, hogy a ritka betegséggel élőköt ugyanolyan figyelem és minőségi ellátás illeti meg, mint más kórképekben szenvedőket [35]. 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 (pl. European Reference Network, ERN, https://ec.europa.eu/health/european-reference-networks/networks_en), a ritka betegségek nomenklatúrájának, kódolásának egységesítését (pl. az International Classification of Diseases, ICD-11 fejlesztését), adatbázisok kialakítását, „orphan” gyógyszerek fejlesztésének, azok klinikai kutatásainak támogatását, ajánlások megfogalmazását, illetve tudományos publikációk közlését [36-41]. 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. Éppen abból kiindulva, hogy egy-egy konkrét ritka betegségben, vagy betegségcsoportban kis számú beteg szenved, nagy klinikai tanulmányok nem kivitelezhetőek, 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, különösen a haemorrhagias diathesisek egy jól elkülönített csoportot képeznek [42]. A Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság (International Society on Thrombosis and Haemostasis, ISTH) 2004-ben megalapította a Ritka Vérzékenységek (Rare Bleeding Disorders, RBD) munkacsoportot, mely összefogja e betegségekkel kapcsolatos kutatásokat, diagnosztikai ajánlásokkal és új terápiás lehetőségek megismertetésével segíti a betegekkel, betegségekkel foglalkozó szakembereket (<https://rbddorg.serversicuro.it/>) [43]. Az ISTH definíciója szerint a haemophilia A és B, illetve a von Willebrand betegség (vWD) gyakoribb altípusának kivételével (bár a haemophilia A és B az általános EU definíció szerint ritka betegségek, hiszen prevalenciájuk 1:5000, illetve 1:30000 férfi) minden coagulopathia és thrombocytá funkció zavar, valamint a hereditær haemorrhagias teleangiectasia (HHT) ritka vérzékenységnek minősül [44,45]. A vWD általános prevalenciája 1:1000, azonban egyes altípusai ennél jóval ritkábbak, így azok már az ISTH besorolás szerint is ritkák [46]. 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. A Debreceni Egyetemen a ritka vérzékenységek ellátásának (a diagnosztikát és kutatásokat is beleértve) hagyománya van. Nagyon szerencsésnek érezhetjük magunkat a kiváló klinikusi és laboratóriumi miliőben, ahol mind a felnőtt, mind a gyermek hemosztazeológiai betegellátást magas színvonalon művelő kollégák inspiráló együttműködését élvezhetjük és olyan mesterektől tanulhattuk a klinikai laboratóriumi hemosztazeológiát, mint Muszbek László akadémikus, aki munkájának továbbvitelét kötelességemnek és egyúttal szerencsémnek is érzem.

A ritka hemosztázis rendellenességekkel kapcsolatos kutatások több szempontból is előremutatóak lehetnek; egyrészt a betegségek hátterében kimutatott új

mutációknak az adott fehérje struktúrájára, funkciójára gyakorolt hatásának tanulmányozása által a fiziológiás, patofiziológiás folyamatokat jobban megérthetjük, új mechanizmusokat fedezhetünk fel. Másrészt a kutatások által szerzett ismeretek új diagnosztikus lehetőségek fejlesztéséhez, illetve új, hatékonyabb terápiás eljárások kidolgozásához vezetnek [47]. Az egyén diagnózisa és a tudományos célú megközelítés mellett bizonyos esetekben a prenatális diagnosztika igénye is felmerül, mely speciális felkészültséget igényel a vizsgálatot végző laboratóriumoktól.

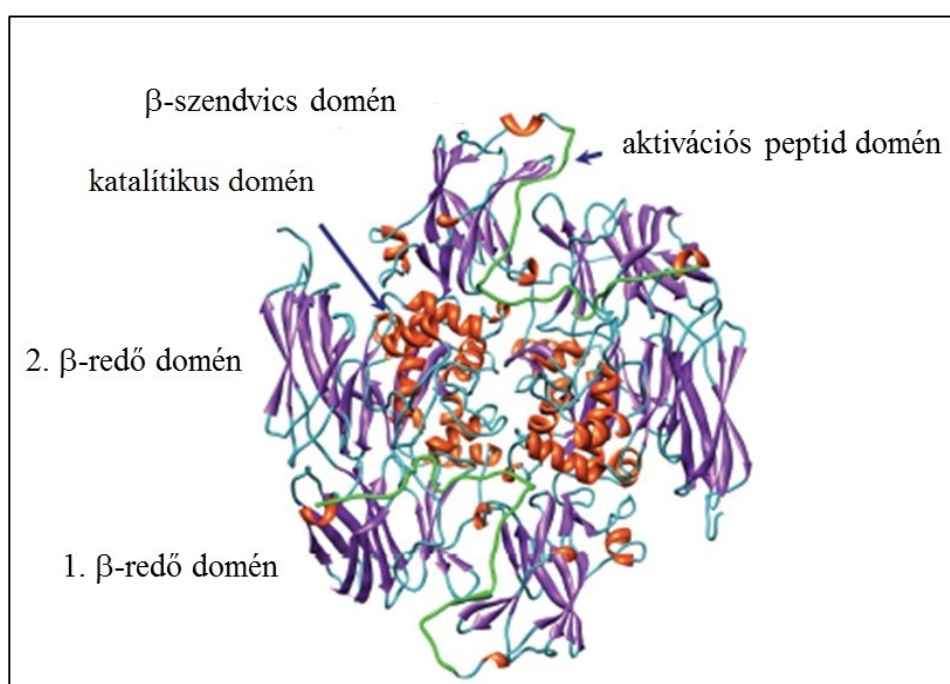
A ritka vérzékenységek genetikai háttere meglehetősen heterogén, akár úgy is fogalmazhatnánk, hogy „minden vérzékeny családnak megvan a maga mutációja”. E mutációk többsége direkt szekvenálással jól karakterizálható misszensz, vagy nonszensz pontmutáció, kis inszerció, vagy delécio. Az eddig talált és publikált mutációk (többnyire a betegek részletes tünettanával, a fehérjebiokémiai vizsgálatok eredményeivel és az alkalmazott terápiával együtt) különböző adatbázisokban fellelhetők. Legkimunkáltabb az európai kezdeményezéssel létrehozott „Rare Bleeding Disorders Database (RBDD; <https://rbdd.org>), de egyes vérzékenységek vonatkozásában külön adatbázisok is léteznek, pl. a Glanzmann thrombasthenia database (<https://glanzmann.mcw.edu/>), vagy a fibrinogén rendellenességeket tartalmazó adatbázis (<https://site.geht.org/base-fibrinogene/>) [48].

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 és a genetikai háttér feltérképezésével. 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.

2.2.1.1 A XIII-as faktor deficiencia

A FXIII pro-transzglutamináz, ami heterotetramer formában fordul elő a keringésben. A plazmában található FXIII (pFXIII) két katalitikus A (FXIII-A) és két gátló/hordozó B alegységből (FXIII-B) épül fel [14,49,50]. A celluláris FXIII (cFXIII), ami nagy

mennyiségben a thrombocytákban (a thrombocyta fehérjék 3%-át adja) található, de kifejeződik a monocytákban, macrophagokban is, valamint leírták osteoblastokban, osteocytákban és chondrocytákban, a plazma formától eltérő módon nem tartalmaz B-alegységet, azaz homodimer formában van [51,52]. A FXIII-A struktúrája röviden: a 732 aminosavból álló alegység vezető szekvenciát nem tartalmaz, a lánckezdő metionint egy szerin követi, ami a metionin poszttranszlációs lehasadását követően N-acetilálódik és válik a fehérje első aminosavává. A FXIII-A alegység négy fő szerkezeti elemből áll: tartalmaz egy 37 aminosav hosszúságú N-terminális aktivációs peptidet, melyet egy β -szendvics domén, egy katalitikus domén és két β -redő domén követ (**3. ábra**).



3. ábra A FXIII-A alegység szerkezete.

(Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komáromi I, Katona É. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev* 2011; 91: 931–72.)

A FXIII-A alegységet kódoló gén (*F13A1*) a 6p25.3–p24.3 pozícióban található, 15 exont és 14 intront tartalmaz [53].

A FXIII-B egy mozaik szerkezetű fehérje, mely 10 sushi domént tartalmaz [14]. Az A-alegységgel ellentétben erősen glikozilált, 8,5% szénhidrátot tartalmaz; 641 aminosavból áll, a májban szintetizálódik. A FXIII-B alegységét kódoló gén (*F13B*) az 1q31–32.1 pozícióban található, 12 exonból és 11 intronból áll. Az 1. exon a 20 aminosavból álló vezető szekvenciát kódolja, a további exonok az egyes sushi

doméneket kódolják, az utolsó exon a B-alegység C-terminális részét és a 3'-szerkezeteket kódolja [54].

A FXIII-A és B alegység tehát a keringésben találkozódik és alkotja a fent említett heterotetramert (FXIII_{A₂B₂}), mely egészséges személyekben 14-28 mg/L koncentrációban található meg a plazmában [55].

A plazmában a FXIII-t trombin és Ca²⁺ ionok aktiválják: a trombin lehasítja az A-alegységről az aktivációs peptidet, majd Ca²⁺ ionok jelenlétében a B-alegység disszociál és a megmaradó FXIII-A dimer aktív konformációt vesz fel [14]. Az aktív forma (FXIIIa) egy transzglutamináz, mely keresztköti a glutamin és lizin oldalláncokat izopeptid kötések kialakításával. Fő szerepe a hemosztázisban a fibrin láncok keresztkötése és az α 2-plazmin inhibitor fibrinhez kötése. A fibrin γ -láncok kovalens dimerizációja és a fibrin α -láncok keresztkötése nagy molekulatömegű polimerekké stabilizálja a fibrint és védi a nyíróerőkkel szemben. Az α 2-plazmin inhibitor kovalens kötése a fibrin alvadékhoz megakadályozza annak a fibrinolitikus rendszer által történő gyors degradációját [56]. A véralvadásban betöltött kulcsszerepe mellett a FXIII a sebgyógyulásban, terhesség kiviselésében is elengedhetetlen, de felvetették szerepét az angiogenesisben, porc- és csontfejlődésben is [14,57-59].

A normál átlag 1%-a alatti FXIII szint súlyos vérzékenységet eredményez [60]. Ilyen alacsony FXIII aktivitás az öröklött FXIII deficienciákban abban az esetben fordul elő, ha a FXIII-A alegység érintett. Öröklött FXIII-B deficienciában szenvedő betegek FXIII aktivitása magasabb (rendszerint 5-10%) és a vérzékenység általában közepes vagy enyhe [61]. 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 [62]. 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 az értekezésben). 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 [63-69]. A helytelen klinikai-laboratóriumi gyakorlatot jól szemlélteti az az általános hozzáállás, hogy vérzékeny beteg kivizsgálása során a normál koaguláció szűrőtesztek

eredményei esetén, azaz normál protrombinidő (PI) és aktivált parciális tromboplasztinidő (APTI) mellett a coagulopathia lehetőségét elvetik. A FXIII deficiencia azonban e szűrőtesztekben nem okoz eltérést, így e diagnózis elvetése helytelen, a beteg adekvát diagnózisát és terápiáját hosszan késlelteti (egyes esetekben soha nem derül ki a FXIII deficiencia). Másik probléma a nem adekvát laboratóriumi módszer alkalmazása a FXIII deficiencia kivizsgálása során. Az urea oldékonysági tesztet 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 [61]. A veleszületett FXIII deficiencia genetikai hátterét tekintve mind a *F13A1* (A-alegység deficiencia), mind a *F13B* (B-alegység deficiencia) génekben számos mutációt közöltek napjainkig (ld. HGMD adatbázis, www.hgmd.org). A genetikai defektus, 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 [70-81]. Az értekezésben bemutatásra kerülnek olyan FXIII deficiens betegek, ahol Speciális Klinikai Hemosztazeológiai laboratóriumunk molekuláris diagnosztikai részlegén derítettük fel a deficiencia hátterében 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 értekezésben).

2.2.1.2 Az V-ös faktor deficiencia

Az V-ös faktor (FV) egy egyláncú, 330 kDa molekulatömegű glikoprotein, mely a májban és a megakaryocytákban szintetizálódik [82-84]. Plazmakoncentrációja 20 nM (7 µg/mL), az összmenyiség közel 20%-a a vérlemezkék α-granulumaiban tárolódik multimerinnel asszociálva (hozzávetőlegesen 4600-14000 molekula/ thrombocyta); ez részben a megakaryocytákból származik, részben a plazmából kerül felvételre. Génje (*F5*) az 1q21–25 lokalizációban található, hozzávetőlegesen 80 kilobázis terjedelmű, 25 exonból és 24 intronból áll. A FV szerkezete mozaik-szerű, a FVIII-éhoz hasonló

domén szerkezettel. Három hasonló szerkezetű A, két C és egy nagy mértékben glikozilált B domént tartalmaz, ez utóbbi köti össze az N-terminálison elhelyezkedő A1-A2 doméneket (az aktiváció után ezek képezik a nehéz láncot) a C-terminálison lévő A3-C1-C2 doménekkal, melyek az aktiváció után a könnyű láncot alkotják (A1-A2-B-A3-C1-C2) [85,86]. Az aminosav- számozás hagyományosan csak az érett fehérje aminosavait veszi figyelembe a FV esetében is, azonban a „Human Genome Variation Society” (HGVS) irányelv alapján történő számozás szerint a fehérjék első aminosavának a lánckekezdő első metionint tekintjük, függetlenül attól, hogy poszttranszlációs érés során lehasad-e az adott fehérjéről propeptid, vagy sem (www.hgvs.org/mutnomen). A FV esetében az érés során 28 aminosav hasad le az eredeti fehérjéről, ezért a hagyományos számozás és a jelenleg elfogadott HGVS számozás ennyivel tér el egymástól. Mivel azonban a FV esetében a Leiden mutáció, p.Arg506Gln (rs6025), elterjedtsége miatt a laboratóriumi leletekben és a nemzetközi irodalomban még ma is a hagyományos számozást követik, így az értekezés – a félreértések elkerülése végett – szintén ezt követi.

A FV fehérje potenciálisan képes pro, illetve antikoaguláns folyamatokban is szerepet játszani, attól függően, hogy mely enzimek aktiválják [22,87]. Ennek a kettős szerepnek köszönhetően a FV génjében bekövetkező hibák ellentétes fenotípusokban nyilvánulhatnak meg (vérzés vagy thrombosis). A molekula prokoaguláns irányú fiziológiás aktivátora a trombin, mely limitált proteolízissal eltávolítja a B domént, az így szabaddá váló nehéz és könnyű láncot ezentúl egy Ca^{2+} -híd kapcsolja össze aktív heterodimerré [88]. Az aktivált FV (FVa) nagyságrendekkel meggyorsítja a protrombin aktivációját. A FVa inaktivációját az aktivált protein C végzi (APC) három Arg (Arg506, Arg306 és Arg679, klasszikus aminosav számozás szerint) mellett történő szekvenciális hasítással. Amennyiben az APC a negatív töltésű foszfolipidekhez kötött natív FV-öt hasítja az Arg506 mellett, úgy a fehérje antikoaguláns funkcióhoz jut, és a membránhoz kötött aktív VIII-as véralvadási faktor (FVIIIa) inaktiválásában az APC kofaktora lesz [89-92]. Ha ezt az antikoaguláns funkciójú fehérjét hasítja a trombin az Arg709, Arg1018 és Arg1545 mellett, úgy a fehérje gyenge kofaktor aktivitást nyer a protrombin aktivációjában. Ekkor is az APC mediálta, Arg306 melletti hasítással lesz teljesen inaktív a fehérje. Újabb kutatások eredményeként derült fény a FV egy alternatív splicing-gal keletkezett, 702 aminosavval rövidebb formájának (FV-short) antikoaguláns szerepére [93,94]. A B-domént érintő in-frame deléciónak következtében

kialakult forma ugyanis a TFPI α -hoz kapcsolódva részt vesz a FXa-t gátló komplexben.

A régebben parahaemophiliának, Owren's disease-nek is nevezett FV deficiencia (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM +227400) ritka, autoszomalis recesszív coagulopathia, homozigóta (súlyos) formájának prevalenciája 1:1 millió [95-97]. A homozigóta FV deficiens betegek FV aktivitása 10% alatti (általában 1% alatt van) és általában súlyos vérzékenység jellemzi őket [98-100]. 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 [101]. A súlyos vérzések (ISTH Grade III) nem csupán 1% alatt, de már 15% FV szintek alatt is jelentkezhetnek, enyhébb vérzékenység pedig még ennél magasabb FV aktivitás esetén sem kizárható [102,103]. A legtöbb heterozigóta egyén tünetmentes, de a FV véralvadásban betöltött igen komplex és bonyolult szerepe miatt, lehetnek kivételek [104]. Ezeknek a heterozigóta vérzékeny betegeknek a felismerése kihívás elé állítja a klinikust és a 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 késhehet egyes betegeknél. A homozigóták előfordulási gyakoriságából kiindulva, a heterozigóta állapotnak kb. 1:1000 frekvenciával kellene megjelenie, az esetek többsége azonban felderítetlenül marad, hiszen nem jellemző az alvadásiidők megnyúlása és legtöbbször vérzékes tüneteket sem mutatnak. Amennyiben azonban egy klinikailag vérzékeny betegnél heterozigóta FV deficienciát állapítunk meg, csak abban az esetben jelenthetjük ki, hogy a vérzékenysége hátterében a FV deficiencia áll, 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 vérzései hátterében heterozigóta FV deficienciát diagnosztizáltunk, a mutáció patogenitását kísérletesen igazoltuk és eredményeinket klinikai és laboratóriumi tanulságot szolgáltató esetleírás formájában közzétettük.

h3>2.2.1.3 A X-es faktor deficiencia

A X-es faktor (FX) egy májban, egyláncú fehérjeként szintetizálódó szerin proteáz proenzime [105]. Az intracelluláris érési folyamat során a pre-pro vezető szekvencia (40 aminosav) lehasadását követően a Golgi apparátusban egy tripeptid (Arg140-Lys141-Arg142) kihasad a polipeptid láncból; az érett fehérje egy 17 kDa tömegű könnyű és egy 45 kDa tömegű nehéz láncból áll [106]. A két láncot egyetlen diszulfid híd tartja össze Cys132 és Cys302 között. (Az értekezésben a FX vonatkozásában is feltüntetjük a hagyományos nomenklatura szerinti aminosavszámozást, illetve ahol lehet, azt követjük, mert az itt bemutatott esetek diagnózisa idején az új, HGVS ajánlások még nem voltak érvényben és a hivatkozásul szolgáló közleményünk is e hagyományos számozást követi.) A könnyű lánc egy γ -karboxi-glutamátokban gazdag régióból (Gla domén), két epidermális növekedési faktor (EGF) doménből és egy rövid, ún. kapcsoló régióból (CR) áll [107-109]. A nehéz lánc tartalmazza az aktivációs peptid domént (AP) és a szerin proteáz domént (SP). A FX génje (*F10*) a 13q34 régióban helyezkedik el, 8 exont és 7 intront tartalmaz [110,111]. Az I. exon a pre-peptidet, a II. a pro-peptidet és a Gla domain-t, a III. a rövid, aromás aminosavakból álló régiót, a IV. és V. a két EGF domént, a VI. az aktivációs peptid domént, a VII. és VIII. exonok pedig a katalitikus domént kódolják [112]. A humán des(1-45) FXa három dimenziós szerkezetét régóta ismerjük [113].

Az alvadási kaszkádban a FX aktiválódhat a szöveti faktor/FVIIa, vagy a FIXa/FVIIIa komplex által, mindkét esetben az Arg194-Ile195 kötés hasad, az AP felszabadul és a katalitikus triádot felszínre hozó konformációs változások következnek be [114]. A foszfolipid felszínen az aktivált FX (FXa) kapcsolódik az aktív FV (FVa)-hoz és Ca^{2+} ionokkal együtt a protrombináz komplexet alkotják, mely a protrombin-trombin átalakulást katalizálja. Emellett számos egyéb véralvadást szabályozó mechanizmusban is részt vesz, pl. aktiválja a FVII-et, hasítja a FV-öt. A TFPI FXa-hoz, majd a TF-FVIIa-hoz kapcsolódása hatékony, az extrinszik útvonalat gátló tetra-komplexet képez. A FXa fő fiziológias inhibitora az antitrombin (AT).

Az öröklött FX deficiencia (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM 227600) autoszomalis recesszív, homozigóta formában 1:1 millió gyakorisággal előforduló ritka coagulopathia [42,115]. A RBDD adatbázis szerint FX deficienciát a ritka coagulopathia esetek 11%-ában regisztráltak [101]. A homozigóta FX deficiens betegek alvadásifaktor aktivitása általában 10% alatt, leggyakrabban 1% alatt van és a

homozigóta betegek súlyos vérzéses tüneteket produkálnak [116]. A FX deficiencia súlyosságát bizonyítja az a megfigyelés is, hogy a tünetmentességhez legalább 56%-os FX aktivitás szükséges, valamint, hogy a Grade III típusú vérzések már 10% faktorszint alatt jelentkeznek [101,117]. Súlyos deficienciában jellemzőek az ún. nagy vérzések: haemarthrosis, intracranialis vérzés, gastrointestinalis vérzések, intramuscularis bevérzések [118-120]. Enyhébb esetekben epistaxis, foghúzást követő vérzés, vagy sebészi beavatkozások kapcsán jelentkező vérzés lehet a vezető tünet [121]. A FX deficiencia (a FV deficienciához hasonlóan) felismerése általában a parallel megnyúlást mutató és normál plazmával korrigálható PI és APTI eredményeken alapul, melyet az ún. közös út faktorok aktivitásának meghatározása követ általában egyfázisú alvadási tesztekben [44,122,123]. A betegségek típusba sorolásához az antigén koncentráció mérése nyújthat segítséget; I-es típusú (kvantitativ) deficiencia esetén az aktivitás és az antigén szint arányos csökkenése tapasztalható, míg II-es típusú (kvalitativ) zavar esetén csökkent aktivitás mellett normál antigén koncentráció mérhető [124]. A FX deficiens betegek (a FV deficienciához hasonlóan) többsége I-es típusú deficienciában szenved. Mivel FX deficienciában a háttérben álló mutációk a *F10* génben bárhol elhelyezkedhetnek „mutációs predilekciós helyről” nem beszélhetünk. Eddig kb. 100 különböző mutációt írtak le (www.hgmd.cf.ac.uk), a mutációk túlnyomó többsége misszensz pontmutáció, különböző molekuláris következményekkel. A súlyos I-es típusú deficiencia egyik oka elvileg a mutáns FX molekula szekréciós defektusa lehet, amit pl. a FX Santo Domingo mutáció esetében igazoltak, ahol a mutáció (p.Gly-20Arg) a szignál peptidet érintette [125]. Ebben az esetben – in vitro biokémiai vizsgálatok tanulsága szerint – a mutáns fehérje az endoplazmatikus retikulumban rekedt meg, így nem szekretálódott a sejtkultúra médiumába. Érdekes módon, nemcsak a szignál peptid mutációival összefüggésben találtak szekréció zavarra utaló laboratóriumi fenotípust FX deficienciában [115,126], 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 egy, nem a szignál peptidet érintő eltérés esetén is szekréciós zavar következhetett be.

2.2.1.4 Egyéb ritka vérzékenységek: a von Willebrand betegség ritka formái

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” (a vWD prevalenciáját figyelembe véve ez alapvetően nem ritka betegség, de egyes altípusai azok), hanem a legbonyolultabb is laboratóriumi differenciáldiagnosztikai szempontból [127]. A von Willebrand faktor (vWF) egy nagy, több funkcióval rendelkező multimer glikoprotein [128-130]. Ma már pontosan ismerjük a vWF különböző régióinak funkcionális szerepét [131-133]. A vWF segíti a thrombocyták szubendoteliális régióhoz történő adhézióját: az A1 és A2 domének felelősek elsősorban a thrombocyta GpIb-V-IX, a C2 domén a GPIIb-IIIa receptor komplexhez történő kötődésért. Az A3 domén a vWF-kollagén kapcsolatért felelős. A nagy molekulatömegű multimerek (HMWM) jelenléte és az intakt multimer struktúra kulcsfontosságú a thrombocyta adhézió és a kollagénhez történő kötődés elősegítése szempontjából. A nagy multimerek hiánya áll bizonyos vWD funkcionális altípusok hátterében (ld. később). Az ultranagy multimerek jelenléte azonban szintén problémát okozhat, ami TTP-ben (thromboticus thrombocytopenias purpura) nyilvánulhat meg. Ennek megakadályozására az ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin type 1 repeats, member 13) képes, ami a vWF A2 doménben történő hasításával szabályozza a multimer struktúrát [134-138]. A vWF D'-D3 doménjén keresztüli kapcsolat révén a véralvadás VIII-as faktorával (FVIII) asszociáltan kering, ami a FVIII keringésben töltött fél-életidejét jelentősen növeli [139]. 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 [140,141]. VWD-ben leggyakrabban mucocutan jellegű vérzések jelentkeznek, pl. erőteljes, akár transzfúzió igényű menstruáció, vagy

jellegzetesek az intervenciókat követő utóvérzések is [142-145]. A vWF génje a 12p13.3 régióban található, 52 exonból álló óriás gén, ami a vWD genetikai diagnosztikáját egészen az utóbbi időkig megnehezítette [146-148]. A kvantitatív deficiencia típusok közül az enyhébb type 1 AD, az extrém súlyos, a laboratóriumi tesztekben a vWF teljes hiányával járó type 3 AR öröklődést mutat [46,149-154]. A funkcionális defektusok közül a 2A altípus (AD) a nagy multimerek hiányával, ennek következtében a thrombocyta GpIb α receptorok iránti csökkent affinitással jár. A defektus tovább csoportosítható annak megfelelően, hogy az A2, D2, D3 vagy a CK domének érintettek, vagy az alapján is, hogy a multimerstruktúra miképpen torzul (IIA, IIC, IID, IIE variánsok) [155-157]. A type 2B (AD) a vWF thrombocyta GpIb α receptorok iránti fokozott affinitással jár [158]. A nagy multimerek ilyen esetben is leggyakrabban hiányoznak. A molekuláris defektus az A1 domént érinti. Differenciáldiagnosztikai szempontból problémát jelent, hogy a 2B esetek egy részében a multimerstruktúra nem mutat eltérést, valamint, hogy a vWF-thrombocyta fokozott kapcsolat hátterében állhat a thrombocyta GpIb α receptorban bekövetkezett mutáció is. Utóbbi esetben, a thrombocyta típusú, vagy pszeudo-vWD esetében, laboratóriumi módszerekkel megközelítve a 2B vWD típussal egyezőnek tűnő fenotípust detektálunk, az elkülönítésre elvileg alkalmas risztocetin indukálta thrombocyta aggregáció keverékes vizsgálat eredményei pedig gyakran ellentmondásosak. A 2M típus (AD) esetén a multimer szerkezet ugyan megtartott, de a vWF-thrombocyta kapcsolat mégis abnormálisan csökkent főleg az A1, vagy A3 doménekben bekövetkező mutációk miatt [159-161]. Végül, a 2N típusú (AR) esetekben a vWF-FVIII kapcsolat sérült, szekunder módon csökkent FVIII szinthez vezetve [162]. A mutációk leggyakrabban homozigóta D', vagy D3 doméneket érintő variánsok, de – a diagnosztikát megnehezítő módon – a betegek egy része összetett heterozigóta és az egyik mutáció a D1, vagy D3 doménben helyezkedik el, a másik mutáció viszont a vWF génjében bárhol kialakuló null mutáció [163]. Mindezek fényében jól látható, hogy a vWD diagnosztikája igen komplex laboratóriumi teszt arzenált és bonyolult interpretációt igényel [164-170]. Röviden: a vérzéses anamnesis részletes felvételét követően a laboratóriumi kivizsgálás a koaguláció szűrőtesztjeivel (különösen APTI), a thrombocyta szám és funkció (PFA-100/200 záródási idő meghatározása, ami egy globális, a thrombocyta funkció megítélésére szolgáló, citrátos teljes vérből történő vizsgálat) gyors megítélésével kezdődik [171]. Mivel ezek a tesztek sem kellően specifikusak, sem kellően szenzitívek a vWD-re, ezért a szűrőtesztek sora itt bővebb: meghatározzuk a vWF antigén koncentrációt (vWF:Ag) és elvégzünk valamilyen, a

vWF-thrombocyták kötődését jellemző funkcionális tesztet [172]. Ma már több ilyen teszt is rendelkezésre áll, és a nemzetközi ajánlások jelenleg nem tesznek különbséget ezeket illetően [173]. Meghatározhatjuk a vWF-thrombocyták kapcsolatát risztocetin és normál thrombocyták preparátum jelenlétében (risztocetin kofaktor aktivitás, vWF:RCO), vagy egy, a vWF GpIb α epitópja elleni monoklonális antitest jelenlétében (vWF:Ab), vagy a thrombocytákat helyettesíthetjük a funkcionális tesztben rekombináns GpIb α -val. Ha utóbbi variációban a rekombináns GpIb α normál, akkor szükség van risztocetinre (vWF:GPIbR), ha azonban egy funkciónerő mutáns rekombináns GpIb α fragmenst alkalmazunk, akkor a risztocetin jelenlétére már nincsen szükség (vWF:GPIbM). A vWD szűrőpaneljébe végezve a FVIII aktivitás meghatározása (FVIII:C) is beletartozik, elsősorban a 2N altípus felismerése érdekében. Funkcionális defektusra akkor van gyanúnk, ha bármelyik, az aktivitás megítélésére elvégzett teszt eredménye és a vWF:Ag teszt eredményének hányadosa 0,6, vagy annál alacsonyabb. (Ez természetesen feltételezi azt, hogy mindkét tesztet az ISTH ajánlásoknak megfelelően végezzük és az eredményeket is annak megfelelően, a normál plazma százalékában fejezzük ki.) A funkcionális variánsok altípusba sorolásához szükségesek további, speciális tesztek [164]. Ezek a kollagén-kötési teszt (vWF:CB), a FVIII-kötődési vizsgálat (vWF:FVIIIb), a vWF multimer struktúrájának analízise SDS-agaróz gél elektroforézissel, a risztocetin-indukálta thrombocyták aggregáció (RIPA), ami különböző koncentrációjú risztocetint alkalmazva diszkriminálhatja a csökkent-normál és fokozott thrombocyták-vWF kötődés között [174,175]. A molekuláris genetikai vizsgálatra a legtöbb vWD esetben nincsen szükség ezen tesztek összességének birtokában, de hasznos segítség lehet egyes diagnosztikai fejtörést okozó dilemma feloldásában [176]. Azon túl, hogy a szerzett-öröklött vWD eseteket elkülöníti, abban is segít, hogy a – vWF nagyfokú biológiai variabilitása miatt – elkülöníthessük a valódi vWD-et az ún. „alacsony vWF” esetektől, mely utóbbiakhoz nem köthető a vWF genetikai eltérése [177]. Továbbá, a 2-es típus heterogenitása miatt előfordulhatnak esetek, amikor a fenti teszt arzenál sem biztosítja a pontos diagnózist.

2.2.1.5 Egyéb ritka vérzékenységek: a dysfibrinogénémia

A ritka, veleszületett fibrinogén rendellenességek diagnosztikája és differenciáldiagnosztikája szintén érdekes kérdés [178,179]. Ezek lehetnek kvantitatív (hypo-és afibrinogénémia), vagy kvalitatív (dysfibrinogénémia, vagy hypo-dysfibrinogénémia) esetek. A Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság

(ISTH) fibrinogén rendellenességekkel foglalkozó munkacsoportja 2018-ban ajánlást adott ki a deficienciák csoportosítására [180]. A súlyos, mennyiségi fibrinogén rendellenességek általában könnyen felismerhetők markáns vérzéses anamnesis és a koaguláció szűrőtesztjeinek megnyúlása, majd az egyszerű Clauss-módszerrel meghatározott csökkent fibrinogén érték alapján [181,182]. A fibrinogén szintek, hypofibrinogenaemiában jól korrelálnak a vérzéses tünetekkel és az 1g/L feletti fibrinogén szinttel rendelkezők általában tünetmentesek. Az enyhe kvantitatív zavarok tehát gyakran tünetmentesek, nem kerülnek a klinikum és laboratórium látószögébe. A dysfibrinogenaemia azonban egy rendkívül becsapós, heterogén kórkép [179,183,184]. Klinikailag a vérzés-tünetmentesség-thrombosis spektrumon bárhol elhelyezkedhet [183]. A trombinidő (TI) meghatározása egyszerű és legtöbbször hasznos, mint szűrőteszt, bár számos laboratóriumban rutinszerűen nem végzik. A TI megnyúlást mutat a legtöbb hypo-, a-, dys-, és hypo-dysfibrinogenemia esetben [185]. A másik egyszerű és hasznos laboratóriumi szűrőteszt a reptilázidő (RI), ami sok esetben még jelentősebb megnyúlással jelzi a fibrinogén rendellenességet, bár általában még a TI meghatározásnál is ritkábban végzik. A dysfibrinogenaemiát a Clauss-módszerrel végzett fibrinogén meghatározás jelzi (abnormál alacsony érték), míg az immuneszében mért fibrinogén szint nem. Ezt a diagnosztikában kihasználva a diszproporcionális Clauss-fibrinogén és fibrinogén antigén felveti a dysfibrinogenaemia gyanúját [186]. A fibrinogén rendellenességek háttérében álló molekuláris defektusok különböző hatással lehetnek az aladási tesztek eredményeire [180]. Vannak olyan variánsok, ahol az aladást mechanikai elven működő készülékekkel mérve nem, csak optikai detektálással kapunk aladásiidő megnyúlást, de olyan mutációkat is ismerünk, melyek egyáltalán nem nyújtják az aladásiidőket egyik detektálási módszerrel sem. A veleszületett fibrinogén rendellenességek háttérében az *FGA*, *FGB* és *FGG* gének mutációi állhatnak [185,187,188]. Az afibrinogenaemia esetek homozigóták, vagy összetett heterozigóták, a hypofibrinogenaemia esetek többnyire heterozigóták az adott mutációra nézve. A dysfibrinogenaemia általában AD öröklésmentet mutat, és két forrópontot is ismerünk, az *FGA* p.Arg35 és az *FGG* p.Arg301 aminosavakat kódoló pontokat [189]. E két pontot érintő mutációk következményei klinikailag általában benignusak, de számos egyéb mutáció ismert az irodalomban, amelyek vérzéssel, vagy thrombosisal mutatnak összefüggést és azonosításuk klinikai predikció szempontjából hasznos [190,191]. Más

mutációk esetében sajnos nem tudunk egyértelműen következtetni a klinikai kimenetelre.

2.2.1.6 Egyéb ritka vérzékenységek: a hereditaer haemorrhagias teleangiectasia

A hereditaer haemorrhagias teleangiectasia (HHT), vagy Osler-Rendu-Weber kór egy AD öröklésmenetet mutató multiszisztémás vaszkuláris vérzékenység [192]. Prevalenciája kb. 1:5000-1:8000-re tehető, azonban ennek becslését bizonytalanná teszi többek között a betegség inkomplett penetranciája és az, hogy e betegség erősen aluldiagnosztizált [193,194]. A HHT diagnózisa alapvetően a Curacao kritériumok meglétén alapul [195,196]. 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 ajkak, szájüreget, kézujjakat és az orr külső felszínét érintik), a zsigeri vasculáris léziókat, úgymint gastrointestinalis teleangiectasia (20-80%), pulmonalis (30-50%), hepaticus (32-48%), cerebralis, vagy spinalis (23%) arteriovenosus malformatiok (AVM) és az első fokú rokon HHT érintettsége [195,197,198]. 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 [199,200]. Ezek a transzformáló növekedési faktor béta (TGF- β) szupercsalád tagjai. Ritkábban a SMAD4-et (ami egy transzkripció faktor és mediátor szerepe van a TGF- β /bone morphogenetic protein-BMP útvonalban) kódoló *MADH4* génben, vagy a *GDF2* génben (ami a BMP-t, az ALK1 ligandját kódolja) lehet eltérést találni [201-203]. A *RASAI* gén (ami a RAS P21 fehérje aktivátor 1-et kódolja és a sejtproliferációban és differenciációban játszik szerepet) mutációi is HHT-szerű fenotípussal járnak [204]. E gén eltérései voltaképpen a capillaris malformatio-arteriovenosus malformatio (CM-AVM1) szindrómával járnak, ami tünettanát tekintve átfedést mutat a HHT-vel [205]. Mivel laboratóriumi teszt nem áll rendelkezésre, a HHT klinikai gyanúja esetén a diagnózis megerősítése közvetlenül genetikai vizsgálattal lehetséges. Mivel a betegség háttérében 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 tünettanát is, hiszen a *ACVRL1* és *MADH4* gének érintettsége például a klasszikus HHT tünetek mellett pulmonalis hypertóniával, vagy juvenilis polyposissal is járhat, vagy a *RASAI* mutációk esetében

basal sejtes tüdőcarcinomát írtak le [206]. 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 [207]. A HHT-ben alkalmazható új terápiás lehetőségek, pl. bevacizumab miatt is fontos, hogy a klinikai gyanú – a genetikai vizsgálatok eredményei által – bizonyosságot nyerjen [41,208].

2.2.2 A ritka veleszületett thrombophiliák

A vénás thromboembolia (VTE) és a kialakulására hajlamosító thrombophilia klasszikus példája a komplex betegségeknek, melyek háttérében genetikai és környezeti tényezők együttesen szerepet játszanak [209,210]. 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 [211-215]. A természetes antikoaguláns rendszer fehérjéinek funkcióvesztéssel járó mutációi vezetnek az antitrombin (AT), protein C (PC) és protein S (PS) deficienciákhoz, melyek tehát a ritka thrombophiliák közé sorolandók [216-219]. A genetikai fogékonysággal rendelkező személyek esetében a VTE bekövetkezésének esélye azonban meglehetősen változatos: függhet az adott genotípustól (milyen gén milyen konkrét mutációjáról van szó), egyéb társuló genetikai eltérések jelenlététől és a környezeti tényezők hatásától [220,221]. A ritka thrombophiliákkal kapcsolatos alap- és klinikai kutatások koordinálását vállalta fel az ISTH „Plasma Coagulation Inhibitors” albizottsága, új elnevezése szerint „Physiological Anticoagulants and Thrombophilia”, melynek 2019 óta magam is vezetőségi tagja, illetve egyik projektjük vezetője vagyok (https://cdn.ymaws.com/www.isth.org/resource/resmgr/subcommittees/bereczky_ssc_subcommittee_pr.pdf). Ezekkel a betegségekkel kapcsolatos kutatások több szempontból is előremutatóak: a súlyos, ritka thrombophiliák háttérében felfedezésre kerülő új mechanizmusok által jobban megérthetjük egyes hemosztázis tényezők szerepét és biológiai-biokémiai jelentőségét, bizonyos mutációk adott fehérje struktúrájára, funkciójára gyakorolt hatásának tanulmányozása által az adott fehérje fiziológiás, patofiziológiás folyamatait is jobban megérthetjük. A kutatások által szerzett ismereteink új diagnosztikus lehetőségek fejlesztéséhez, illetve új, hatékonyabb terápiás eljárások kidolgozásához vezethetnek [222]. 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 vénás thromboembolia (VTE, mélyvénás thrombosis (MVT), tüdőembólia (TE) társadalmunkat érintő egyik leggyakoribb morbiditási és mortalitási tényező [209]. A VTE továbbra is egyik fő oka a terhességi morbiditásnak és viszonylag gyakori orális fogamzásgátlót szedő fiatal nők körében is [223]. A rekurrens VTE és a krónikus, kifejezett fájdalommal és gyakran fekélyképződéssel járó postthromboticus syndroma jelentősen hozzájárul a rossz életminőséghez [224]. Veleszületett thrombophilia jelenléte általában a nem provokált, rekurrens, fiatal korban kialakuló, és familiáris VTE esetekben merül fel, melynek kivizsgálásával kapcsolatban legalább két évtizede folyó klinikai és módszertani vitasorozatnak lehetünk tanúi [225-233]. Az APC rezisztencia, illetve a protrombin gén 20210 A allél szerepének felfedezésével, az 1990-es évek végétől jellemző volt egy – mai szemmel nézve – túlzott lelkesedés és gyakran klinikai konzekvenciát nélkülöző thrombophilia kivizsgálási hullám. Az APC rezisztencia hátterében szinte kivétel nélkül az V-ös alvadási faktor p.Arg506Gln mutációja áll (FV Leiden mutáció, rs6025), ami a magyar népességben kb. 10%-os karrier frekvenciával fordul elő, vagyis igen gyakori [234-236]. A protrombin gén (F2) 20210 G>A polimorfizmusa (rs1799963) szintén nem elhanyagolható gyakoriságú (kb. 4% hazánkban) és egyértelmű összefüggést mutat a VTE előfordulásával [215]. E két genetikai kockázati tényező felfedezése indította el és zúdította ránk, klinikai laboratóriumokra, a thrombophiliák laboratóriumi kivizsgálásának (inkább kivizsgáltatásának) lavináját. A „veleszületett thrombophilia laboratóriumi vizsgálati panel” elemei a 2000-es években a FV Leiden mutáció, a protrombin 20210A allél, az AT, a PC és a PS deficienciák különböző tesztjei voltak. A gyakran megalapozatlanul kért laboratóriumi vizsgálatok azon túl, hogy a klinikai döntéshozatalt nem segítették, finansziális szempontból is óriási terhet róttak a laboratóriumokra. Később, amint szembesültünk különböző preanalitikai és analitikai problémákkal az egyes tesztekkel illetően, illetve kezdtük felismerni a thrombophilia kivizsgálás korlátait, előbb ellentmondó, majd egyre letisztultabb vélemények és ajánlások fogalmazódtak meg

egyrészt a kivizsgálendő célpopulációra, másrészt a laboratóriumi módszertanra vonatkozóan [227,233,237-249]. A módszertani ajánlásokhoz saját kutatócsoportunk eredményei is nagy mértékben hozzájárultak (ld. később).

A célpopulációt illetően ma már csak az a szemlélet fogadható el, hogy a thrombophilia irányú vizsgálatokat gondosan válogatott betegcsoport számára végezzük el, azon betegeknél, akik számára a vizsgálat eredménye közvetlenül befolyásolja a klinikai döntéshozatalt, akár a primer, akár a szekunder thromboprofilaxis vonatkozásában. Vannak tehát olyan klinikai helyzetek, amikor a thrombophilia tesztelés előremutató. Ezek az idiopathias (nem provokált) vénás thromboembolia (VTE), különösen fiatal korban, szokatlan lokalizációban megjelenő thrombosis, rekurrens thrombosis, első VTE erőteljes pozitív családi anamnesis birtokában, terhességi, vagy oralis contraceptivumok mellett kialakuló thromboticus szövődmények, illetve profitálhatnak a tesztelésből azok a (még) tünetmentes személyek is, akik családjában súlyos öröklött thrombophilia igazolódott. Az artériás thrombosisok vonatkozásában a thrombophilia tesztelés nagy általánosságban nem ajánlott, azonban izolált esetekben – különösen fiatal betegeknél klasszikus kockázati tényezők hiányában – detektálható thrombophilia, ami a betegek hosszabb távú thromboprophylaxisát befolyásolhatja. Saját diagnosztikai gyakorlatunkban leginkább AT deficiencia kapcsán talákoztunk artériás thrombosisokkal, mely izolált esetek indítottak arra, hogy később szisztematikusan vizsgáljuk az AT deficiencia különböző altípusaiban az artériás, illetve vénás thrombosisok előfordulását, és összefüggéseket keressünk az AT deficiencia háttérében álló molekuláris eltérések és a klinikai fenotípus között [250].

A ritka thrombophiliák, konkrétan az AT/PC/PS deficienciák korrekt laboratóriumi diagnózisa lényeges, hiszen befolyásolhatja a terápiás modalitást, a másodlagos prevenciók stratégiát; a tünetmentes, mutáció-hordozó családtagok számára pedig a primer prevenció lehetőségét kínálja bizonyos klinikai szituációkban. Az AT/PC/PS deficienciák diagnosztikája, illetve klasszifikációja ugyanakkor a mai napig problematikus. A kérdés manapság már nem az, hogy tudjuk-e vizsgálni a fenti rizikófaktorokat (természetesen igen), hanem inkább az, hogy milyen laboratóriumi vizsgáló módszert alkalmazzunk ahhoz, hogy minden kockázatnak kitett személyt biztosan azonosítsunk, ugyanakkor elkerüljük a szintén nagy veszélyt jelentő fals pozitív interpretációkat [251]. Munkacsoportunk tevékenysége hozzájárult ahhoz, hogy egyes módszertani problémákat megoldva, ma hatékony és biztonságos laboratóriumi

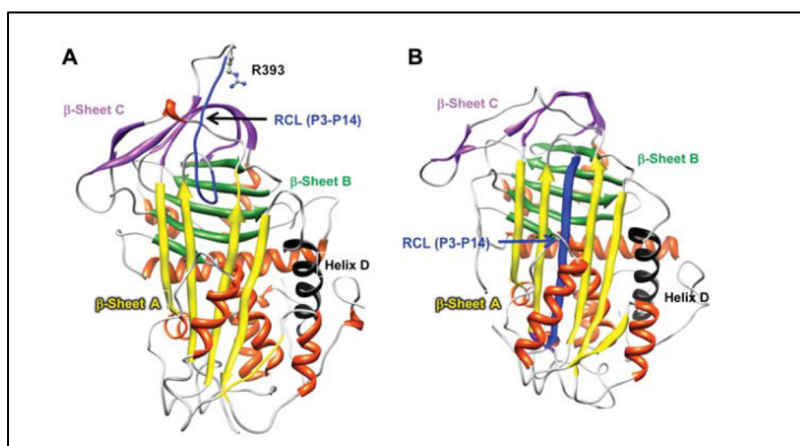
protokollokat ajánlhassunk a klinikai hemosztázis laboratóriumok számára. Továbbá felismertünk olyan egyedi, populáció-specifikus szempontokat, amivel kifejezetten a hazai thrombophilia diagnosztikát tudjuk segíteni. Mindezeket a szempontokat sorban tárgyalom az értekezés során.

A ritka thrombophiliák kapcsán érdekes kérdés az is, hogy egy-egy újonnan detektált genetikai eltérés (mutáció) milyen molekuláris következményekkel jár. Nemcsak azért lehet ez a kérdés érdekes, mert bizonyítanunk kell azt, hogy az új genetikai eltérés 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 molekuláriszletek szerepét is jobban feltárhatjuk. Ezek a funkcionális és szerkezeti vizsgálatok potenciális gyógyszer-celokat is azonosíthatnak. Munkacsoportunk számos új mutáció *in vitro* karakterizálását végezte el AT és PC deficienciákban. Az értekezésben ezen vizsgálatainkra is mutatok példát.

2.2.2.1 Az antitrombin szerepe a hemosztázis szabályozásában, az antitrombin deficiencia klinikuma, jellegzetességei, laboratóriumi diagnosztikája

Az AT a szerin proteáz inhibitorok (szerpinek) családjába tartozó egyláncú glikoprotein, mely a májban szintetizálódik, molekulatömege 58 200 Da [252,253]. A propeptid (32 aminosav) lehasadása után az érett fehérje 432 aminosavból épül fel. A keringésben az AT-nak két glikoformája található, túlnyomó többségben (90-95%) az α -glikoforma, míg <10%-ban a β -glikoforma [254]. A két forma csupán abban különbözik egymástól, hogy míg az α -glikoforma 4 aszparagin reziduumon (új, HGVS nomenklaturát alkalmazva 128, 167, 187 és 224) glikozilált, addig a β -glikoforma csak három ponton glikozilált, azaz a 167-es pozícióban nem glikozilált [254-256]. Ez utóbbi forma közismerten erősebben képes a negatív töltéssel rendelkező glikozaminoglikánokhoz, pl. a heparinhoz kapcsolódni, ezáltal hatékonyabb antikoaguláns hatást tulajdonítanak neki. A fehérje harmadlagos szerkezetét tekintve – hasonlóan egyéb szerpinekhez – három β -redőt (A-C) és kilenc α -hélixet (A-I) tartalmaz [257,258]. A molekula külső részén helyezkedik el a reaktív center hurok (RCL), mely régió a target proteázokkal komplementer szekvenciát tartalmazza [259]. Az AT jelentős szerkezeti flexibilitással rendelkezik, ami drámai konformáció változást tesz lehetővé az AT és a target proteázok kölcsönhatása során [255]. A target proteáz belehasít az RCL-be, majd kovalensen kötve marad az AT molekulához, azaz csapdába

esik. Az AT nem hasított („nyugalmi”) formájának két konformációs állapota létezik. A natív forma esetén a 24 tagú RCL, beleértve a P1-P1' (Arg425-Ser426) hasítási helyet, a molekula külső felszínén helyezkedik el (4. ábra). A látens konformációban viszont az RCL a β -redőbe illeszkedik be. Az utóbbi konformáció termodinamikailag stabilabb, mint a natív forma; a natív forma ugyanis egy magas energiájú állapotban rekedt meg. Az AT elsősorban ebben a kinetikusan csapdába ejtett, natív állapotban található meg a keringésben.

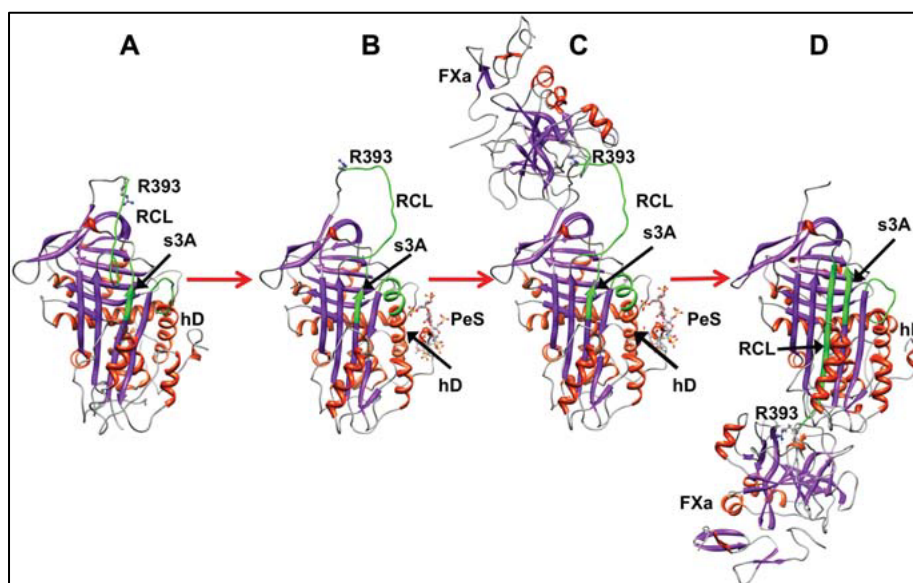


4. ábra. A natív (A) és látens (B) antitrombin szerkezeti sajátosságai.

Az A, B és C β -redőket sárga, zöld és lila szín jelzi. A helikális szerkezeti elemek narancssárgák, kivéve a D-helixet, ami feketével jelzett. Ez utóbbinak van kritikus szerepe a pentaszacharid kötésben. Az RCL (reactive center loop) fontos részletét sötét kékkel színeztük. Jól látható, hogy látens forma esetén az RCL e részlete az A β -redőbe ékelődik addicionális β -redőként. Az ábrán a kritikus helyzetben lévő aminosav R393 jelöléssel látható, ami az érett fehérjére vonatkozó számozás. A HGVS szerinti számozás szerint ez a R425 lenne. (Muszbek L, Bereczky Z, Kovács B, Komáromi I. Antithrombin deficiency and its laboratory diagnosis. Clin Chem Lab Med 2010; 48: S67–78.közleményünk alapján.)

Korábbi, Rtg-diffrakciós szerkezeti vizsgálatokból ismert, hogy e natív formában a kritikus Arg425 reziduum az AT molekula felszíne felé mutat, miközben a P14-P15 reziduumok az A β -redőbe vannak ékelődve, ami egy rigid konformációt eredményez, a szerin proteázok gátlása ebben a formában kevésbé hatékony. Ha azonban pentaszacharid, vagy a nagyobb heparin molekula pentaszacharid egysége kötődik az AT-hoz, az RCL és az ahhoz közeli régiók jelentős konformációváltozáson mennek keresztül [260,261]. Az RCL A β -redőbe ékelődött része kifordul, az A β -redő harmadik β -lemezének vége közelebb kerül az ötödik lemezhez, és a D-hélix megnyúlik. Az AT és a pentaszacharid egység közötti kölcsönhatás egy érdekes, többlépéses folyamat, melynek egyes részleteit munkacsoportunk tárta fel és az

értekezésben később részletesen ismertetésre kerül. A pentaszacharid-AT kapcsolat allosztérikus hatása során bekövetkező konformáció változás következtében valósul meg a FXa és a FIXa gátlása, mely folyamatban az AT Arg425 és a környező RCL jó szubsztrátjává válik e szerin proteáz alvadási faktoroknak. A trombin gátlás mechanizmusa különbözik a fentiektől annyiban, hogy az enzim-szubsztrát komplex kialakulásához nem elegendő a pentaszacharid allosztérikus hatása (sőt nem is vagyunk abban biztosak, hogy feltétlenül szükséges lenne), hanem a trombin maga is kötődik a heparinhoz, melynek 18, vagy annál hosszabb szacharid egysége képez hidat a trombin és az AT között. Ez a heparin híd a legfontosabb tényező a trombin-AT interakció kialakulásában [262,263]. A sebesség meghatározó Michaelis komplex kialakulása után az aktív alvadási faktorok gátlása már a szokásos szerpin séma szerint történik. A proteolitikus reakció első lépésében egy acil-enzim intermedier képződik az AT Arg425 és a szerin proteáz aktív centrumában lévő szerin közötti észter kötéssel, majd az AT egy drámai, irreverzibilis konformáció változáson megy át. Ennek során az RCL P14-P3 részlete inkorporálódik az A β -redőbe, mintegy plusz szálát képezve abban, és az AT egy hasított, relaxált állapotot vesz fel. Az Arg425-höz kovalensen kötődött, csapdába ejtett szerin proteáz az AT molekula „tetejéről” az „aljára” kerül, kb. 70 Angström távolságot „utazva”. Az acil-intermedier ezáltal stabilizálódik és a proteolitikus reakció második lépése, azaz az elhasított peptid felszabadulása, nem következik be. E folyamat során a proteáz, vagyis a gátolt alvadási faktor, szerkezete sérül, az aktív centrum megbomlik (**5. ábra**).



5. ábra. Az antitrombin aktiválódásának és az aktív X-es faktor antitrombin által történő gátlásának szerkezeti sajátosságai.

A, Az antitrombin (AT) natív formája; B, a pentaszacharid által aktivált AT; C, az AT-aktív X-es faktor (FXa) komplex (a FXa esetén csak annak epidermális növekedési faktor és szerin proteáz doménjei látszanak); D, az acil-enzim komplex, ahol a FXa kovalensen van kötve az AT-hoz. A β -redőket, illetve helixeket lilával, illetve narancssárgával jelöltük. A jelentős konformációváltozást szenvedő elemeket (reactive center loop, RCL kritikus része, az A β -redő harmadik β -lemeze (s3A) és a helix D (hD) zölddel van színezve. Az R393 (új nomenklátúra szerint R425) és a pentaszacharid (PeS) golyó-pálca modellel (ball-and-stick) van szemléltetve. (Musbek L, Bereczky Z, Kovács B, Komáromi I. Antithrombin deficiency and its laboratory diagnosis. Clin Chem Lab Med 2010; 48: S67–78. közleményünk alapján.)

Az AT leghatékonyabban a trombin és a FXa-t gátolja, azonban egyéb aktív szerin proteázokat (FIXa, FXIa, FXIIa, plazmin, kallikrein) is képes gátolni [264]. A FVIIa gátlása csak annak szöveti faktorról alkotott komplexe esetén lehetséges [265]. Előbbiek ismeretében érthető, hogy az AT egy progresszív inhibitor, azaz reakciója az aktív szerin proteázokkal alapvetően lassú. A pentaszacharid, heparin, heparán szulfát proteoglikánok jelenlétében képes a gátló hatása több százszorosára fokozódni [266]. A laboratóriumban ma már mind a progresszív, mind a heparin jelenlétében történő 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. Ismert, hogy az AT gátló hatása a keringő alvadási faktorokra irányul. A fibrinhez kötődött trombin, vagy thrombocytá felszínén aktivációs komplexben található FXa gátlása nem hatékony [267]. Ismerve az AT molekuláris kölcsönhatásait, ma úgy gondoljuk, hogy mind a progresszív, mind a

heparin jelenlétében fokozott gátló hatásnak jelentősége van. Az AT egyrészt szabályozza a trombin generációt a szöveti faktor-FVIIa, FXa és egyéb szerin proteázok gátlásával, másrészt scavenger funkciót is betölt azzal, hogy az alvadékba be nem épült aktív alvadási faktorokat gátolja. Ez utóbbi mechanizmus lehet az, ami érfal sérülés esetén a sérüléstől távolabbi területek felé történő thrombus propagációt megakadályozza. In vivo, az AT-proteáz komplex gyorsan eliminálódik a keringésből, az LDL-receptor család tagjaihoz kötődve [268]. Antikoaguláns aktivitásán kívül az AT gyulladáscsökkentő, antiproliferatív, antiangiogén, és vírusellenes tulajdonságokkal is rendelkezik [269-271].

A humán AT génje (*SERPINC1*) az 1q23-q25 pozícióban helyezkedik el, 1,4 kb mRNS-t eredményező 7 exont és 6 intront tartalmaz [272,273]. Minden exon-intron határ követi a GT-AG szabályt. A vezető szekvencia 32 aminosavat tartalmaz, mely az érés során lehasad. A 2. és 3. exon a heparin kötő régiót (heparin binding site, HBS), míg a 7. exon a C'-terminális végen elhelyezkedő reaktív helyet (reactive site, RS) kódolja. Kilenc teljes és egy részleges Alu ismétlődő szekvenciát azonosítottak az 1., 2., 4., 5. és 6. intronban [274]. Több, egy nukleotidot érintő polimorfizmus (SNP) is ismert a gén teljes hosszában, melyek általában ártalmatlanok és különböző gyakorisággal fordulnak elő a különböző populációkban. Ezek ismerete elsősorban az AT deficienciákkal kapcsolatos populációgenetikai vizsgálatok szempontjából érdekes.

Az AT deficienciát először Egeberg írta le 1965-ben [218]. Az első funkcionális defektusról (AT Budapest) 1974-ben Sas Géza professzor úr és munkatársai számoltak be [275]. Nagy megtiszteltetés volt számomra, amikor 2016-ban, a Magyar Thrombosis és Haemostasis Társaság konferenciájára Sas professzor úr személyesen jött el meghallgatni és méltatni munkacsoportom AT deficienciákkal kapcsolatos kutatási eredményeit. A Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság (ISTH) ajánlása szerint az AT deficienciákat két alaptípusba sorolják, a kvantitatív (I-es típus) és kvalitatív (II-es típus) típusokba [276,277]. Az I-es típusú kvantitatív AT deficienciában az AT aktivitása és antigén szintje egyaránt csökken, 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 deficiencia alapvetően autoszomalis domináns öröklésmentet követ, azonban a IIHBS deficienciákban inkomplett penetrancia vagy autoszomalis recesszív

mintázat is előfordulhat [278]. Az AT deficiens betegek többsége heterozigóta formában hordozza a genetikai eltérést, az AT deficiencia homozigóta formában az étellel összeegyeztethetetlen, kivéve egyes IIHBS variánsokat [279]. A betegség molekuláris genetikai háttere igen heterogén, mára már több mint 300, a háttérben meghúzódó okozati mutációról számoltak be (HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk>). Az adatbázisban szereplő *SERPINC1* mutációk körülbelül 50%-a misszensz eltérés, a kis deléciók/inszerciók szintén gyakoriak (28%). A nonszensz és splicing eltérések (6%), valamint a nagyobb génszakaszokat érintő átrendeződések kisebb arányban fordulnak elő. Az I-es típusú AT deficienciát nagy arányban inszerciók vagy deléciók okozzák (10%), melyek kereteltolódáshoz, ezáltal korai STOP kodon kialakulásához és csonkolt fehérje szintéziséhez vezetnek. Multiplex ligáció függő próba amplifikáció (MLPA) módszerrel számos I-es típusú AT deficienciában sikerült nagy génszakaszt érintő deléciót is igazolni [280]. I-es típusú AT deficienciában rendellenes szerkezetű AT-t és ezért szekréción defektust eredményező misszensz mutációkat is találunk. A II-es típusú AT deficiencia háttérében leggyakrabban misszensz mutációk állnak. A IIRS altípusért felelős eltérések a reaktív helyet és a „hinge” régiót érintik, pl. AT Stockholm (p.Gly424Asp) [281]. 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 [282-284]. 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 [274]. Az ATBp3 alapító hatását nemzetközi mércével mérve is kiemelkedően nagy számú beteg bevonásával és polimorf genetikai markerek alkalmazásával munkacsoportunk igazolta (lásd később az értekezésben). A IIPE altípust eredményező eltérések jellemzően a 434, 436-439 és 461 aminosavakat érintik, mely régiók az AT szerkezeti és funkcionális integritásáért jelentős mértékben felelősek.

Az I-es típusú eltérést okozó mutációk homozigóta formában az étellel összeegyeztethetetlenek, míg a heterozigóta egyének általában fiatal korban súlyos thromboticus eseményeken esnek át [285]. Hasonló fenotípusos megjelenést írtak le a IIRS és IIPE altípusok esetében is. A IIRS deficienciák közé sorolható p.Ala416Ser (AT Cambridge II) eltérés egy kivétel, ugyanis ez homozigóta formában is előfordulhat és enyhébb klinikai fenotípussal társult a klinikai vizsgálatokban [286,287]. A IIHBS

altípus feltehetően kisebb thrombosis-kockázatot jelent a többi altípusnál [288]. Egyes homozigóta IIHBS mutációt hordozó egyének életképesek, azonban korai életkorban alakul ki náluk thrombosis, míg egyes heterozigóta betegek későbbi életkorban és enyhébb thromboticus eseményeket szenvednek el. A IIHBS AT deficiencia azonban a korábban leírtakhoz képest sokkal heterogénebb klinikummal rendelkezik és még ebben az altípusban is jelentős fenotípusbeli különbségek figyelhetők meg attól függően, hogy a beteg melyik mutációt hordozza. Az utóbbi tíz évben bővültek ismereteink ezzel kapcsolatban és munkacsoportunk volt azon kevesek egyike, aki nagy számú betegen értékes klinikai és laboratóriumi adatokat tudott szolgáltatni a nemzetközi irodalom számára. Ezekről részletesen beszámolok az értekezésben.

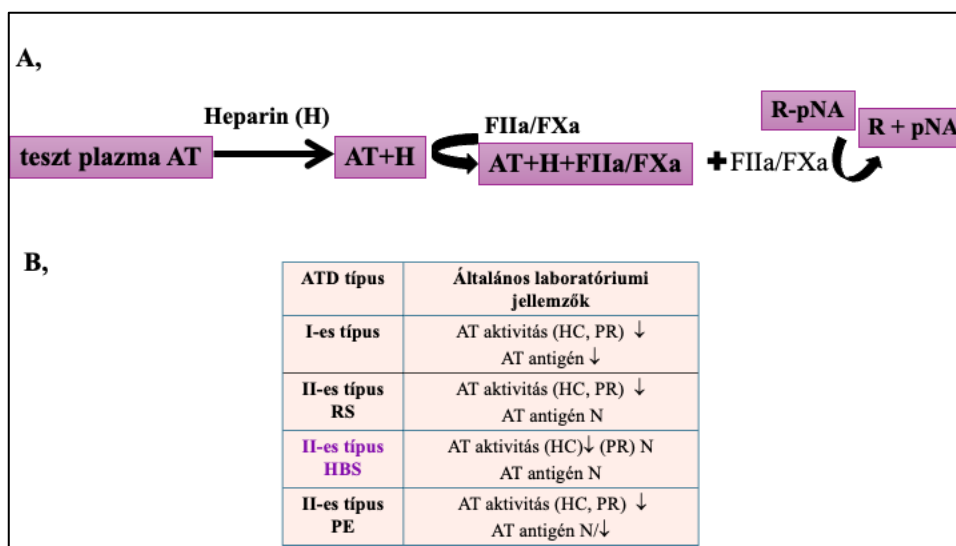
Az AT deficiencia tünetei a mélyvénás thrombosis (MVT) és/vagy tüdőembólia, ami gyakran visszatérő is lehet. A thrombosis gyakran szokatlan helyen is kialakulhat, így a felsővégtagokban, a mesenterialis, vese, portalis, retina és agyi erekben, valamint intarcordialisan [289-292]. Artériás thrombosisokról (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 [293]. Terhes, AT deficiens nőknél kiemelkedően magas lehet a thrombosis kockázata, habár itt is heterogenitás figyelhető meg az AT deficiencia típusa szerint [294].

Szerzett AT deficienciát figyelhetünk meg májbetegségben (csökkent fehérjeszintézis), nephrosisban, illetve más fehérjevesztéssel járó betegségekben (fokozott fehérje vesztés). Alacsony AT koncentrációt észlelhetünk sepsisben, disseminált intravascularis coagulatióban, thromboticus microangiopathiákban, akut haemolitikus transzfúziós reakció során és rosszindulatú megbetegedésekben (konszumpció). A heparin hosszú távú alkalmazása esetén nagyobb mértékben képződik trombin-AT komplex (mérsékelt konszumpció), valamint az L-aszparaginázzal végzett terápia intracelluláris AT-visszatartást eredményez (interferáló hatás a fehérje glikozilációjával és feltehetően a foldinggal is) [295-298].

A VTE-n átesett AT deficiens betegek akutan általában heparin és heparin-AT koncentrátum terápiában részesülnek. Profilaxisra K-vitamin antagonistákat, vagy az új típusú orális antikoagulánsokat (NOAC) alkalmazzák [299-303]. Az antikoagulálás javasolt időtartama VTE után nem egyértelmű, különösen nehéz a profilaxis stratégiáját megválasztani AT deficienciában [304-309]. Úgy gondoljuk, hogy a deficiencia altípusa (és esetleg a konkrét mutáció azonosítása) segíthet a kérdés eldöntésében,

természetesen egyéb faktorok figyelembevétele mellett. Profilaktikus heparin terápia és esetleg AT koncentrátum adása lehet szükséges a tünetmentes *SERPINC1* mutáció hordozókban terhesség, műtét, trauma és fertőzések esetén. Az AT deficiencia ritka előfordulása miatt a terápiás kérdések megválaszolása is nehézségekbe ütközik és leginkább eset-riportok, szakértői vélemények állnak rendelkezésre e téren is [244,310-312].

Az AT deficiencia rutin laboratóriumi diagnosztikája során elsővonalbeli szűrőtesztként, a thrombophilia panel részeként egy funkcionális teszt, az AT aktivitás meghatározása történik [245,252]. Ma már kizárólag kromogén amidolitikus tesztet használunk [313]. Az amidolitikus tesztben az AT által gátolt trombin, vagy FXa maradék aktivitását határozzuk kromogén szubsztát hozzáadása segítségével **(6. ábra)**. A teszt során a vizsgálandó plazmához trombint, vagy FXa-t adunk feleslegben, amit a plazmában lévő AT funkcionális épségétől (és mennyiségétől) függő mértékben gátol. A maradék, gátlás alá nem került trombin, vagy FXa aktivitását specifikus kromogén szubsztát hozzáadásával teszteljük, vagyis spektrofotometriás módszerrel detektáljuk azt az abszorbancia változást, ami a kromogén szubsztát elhasítása során jön létre [314-316]. Minél nagyobb az abszorbancia változás, annál több a maradék trombin vagy FXa, vagyis annál alacsonyabb az AT aktivitása. A kromogén szubsztátok rövid, három-, vagy négytagú peptidek, paranitroanilin (pNA) csoporttal a C-terminális végen. A trombin, vagy FXa által elhasított szubsztátról felszabaduló pNA erőteljes fényabszorpcióval rendelkezik 405 nm-en. Az AT aktivitásának meghatározása elvégezhető heparin jelenlétében (heparin-kofaktor aktivitás) vagy annak hiányában (progresszív aktivitás). Az előbbi teszt esetében az aktív véralvadási faktorok gátlása igen gyorsan valósul meg, míg utóbbi esetben hosszabb időre van szükség az AT gátló hatásának kifejlődéséhez **(6. ábra)**.



6. ábra. Az antitrombin aktivitás meghatározásának alapelve (A) és az antitrombin deficiencia típusokra jellemző laboratóriumi eltérések (B).

AT, antitrombin; H, heparin; FIIa, trombin; FXa, aktív X-es faktor; R-pNA, para-nitroanilinnal kapcsolt aminosavlánc (kromogén szubsztát); ATD, antitrombin deficiencia; RS, reaktív centrum zavara (reactive site); HBS, heparin kötőhely zavara heparin binding site); PE, pleiotrop effektus; HC, az antitrombin heparin kofaktor aktivitása; PR, az antitrombin progresszív aktivitása; N, normál; a lefelé mutató nyíl az adott laboratóriumi tesztben mért csökkent értéket szimbolizálja.

Mivel a heparin kofaktor AT aktivitás elvileg minden típusú AT deficienciában kóros eredményt (csökkent értéket) ad, a diagnosztika során ezt a tesztet javasolt elsőként elvégezni és további tesztek elvégzésére csak ennek kóros eredménye esetén van létjogosultsága [245]. A heparin kofaktor funkcionális teszt során a heparin a vizsgálandó plazma mintában lévő AT-hoz kapcsolódik, amely fokozza a trombinnal vagy a FXa-val történő AT-trombin, vagy AT-FXa komplex képződését. Egy adott funkcionális teszt során csak az egyik enzimet (trombint vagy FXa-t) visszük a rendszerbe, tisztított formában, feleslegben. A feleslegben bevitt trombint vagy FXa-t az AT gátolja, majd a szabadon maradó (nem gátolt) enzim aktivitását határozzuk meg trombinra, vagy FXa-ra specifikus kromogén szubsztát alkalmazásával. Korábban humán eredetű trombint alkalmaztak a trombint gátló esszékben, azonban ez a heparin kofaktor II molekulával is reagál, ezáltal nem volt kellően érzékeny az AT deficienciára [317]. A legtöbb tesztben ezért ma már szarvasmarha eredetű trombint használnak, vagy FXa-t alkalmaznak trombin helyett, mivel ezek nem reagálnak a heparin kofaktor II-vel és elvileg megfelelő érzékenységgűek. Normál AT aktivitással rendelkező személyekben a ma használt bovin trombin, vagy FXa alapú funkcionális tesztek azonos eredményt adnak, amit a nemzetközi körkontroll vizsgálatok is tanúsítanak

[313]. Az AT deficiens betegek esetében azonban a mutációk típusa szerint lehet különbség a tesztek érzékenysége között. Az AT Cambridge II (p.Ala416Ser) mutáció esetében például, ami viszonylag gyakorinak számít elsősorban a brit AT deficiens populációban, a FXa alapú tesztek nem kellően érzékenyek [287]. A IIHBS AT deficienciákban ezzel szemben 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 **(6. ábra)**. Használata kevésbé elterjedt, ugyanis a legtöbb diagnosztikai cég kínálatában ez a változat nem szerepel és a heparin-kofaktor AT aktivitás esszék úgy vannak felépítve, hogy a heparin mellőzése nem megoldható azok használata során, vagy ha kihagyható is lenne e komponens a tesztből (ami egyes kereskedelmi forgalomban lévő tesztek esetében elvileg megtehető lenne), akkor sem kínálnak protokollt a progresszív AT aktivitás meghatározására [318]. A teszt kondíciók megváltoztatására viszont szükség van ezekben az esetekben (pl. inkubációs idő hossza, plazmahígítás megváltoztatása), így e protokollok híján a progresszív AT aktivitás meghatározás nem elterjedt annak ellenére, hogy a teszt eredménye fontos információt szolgáltat az AT IIHBS betegek elkülönítéséhez. Az AT antigén koncentráció meghatározás szintén az AT deficienciák osztályozásában segít. Manapság az immunefelometriás, vagy immunturbidimetriás módszert alkalmazzák legtöbbször az AT koncentráció meghatározására [319,320]. Az AT aktivitás referencia tartománya meglehetősen szűk, 80-120% között van.

Amennyiben csökkent heparin kofaktor aktivitást tapasztalunk, AT antigén meghatározás is történik. A három módszer (heparin kofaktor aktivitás, progresszív aktivitás és antigén) együttes elvégzése lehetőséget ad az AT deficiencia típusba sorolására. A módszerek kiegészíthetők a heparin jelenlétében elvégzett keresztezett immunelektroforézissel (CIE), ez azonban csak speciális laboratóriumokban elérhető.

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 az értekezésben ezt a problémakört emelem ki és fejtem ki legrészletesebben.

2.2.2.2 *A protein C-protein S rendszer szerepe a hemostázis regulációjában, a protein C deficiencia klinikai és laboratóriumi jellegzetességei*

A protein C (PC) egy K-vitamin függő glikoprotein, egyláncú fehérjeként szintetizálódik a májban [321]. Az érett, 62 kDa molekulatömegű fehérje egy nehéz (41 kDa) és egy könnyű (21 kDa) láncból áll, melyeket egy diszulfid híd köt össze a – hagyományos számozás szerint – Cys141 és Cys265 között (új nevezéktan szerint Cys183 és Cys319). Az érett PC plazma koncentrációja 3–5 mg/L [18]. Félélettideje rövid, kb. 8 óra a keringésben. Doménstruktúrája a K-vitamin függő alvadási faktorokhoz igen hasonló: a pre-pro vezető szekvenciát (a hagyományos számozás szerint –42-től –1-ig, mely szerint a fehérje első metioninja a –42-es számot kapja) a Gla-domén (1-37. aminosavak), majd egy rövid amfipatikus hélix (38–45 aminosavak) követi, ezek után a két EGF domén (46-91. és 92-136. aminosavak) következik. A Gla-domén kilenc, a poszttranszlációs módosítások során karboxilálódó glutamátot tartalmaz. A könnyű láncban található még az aktivációs peptid domén (137–184. aminosavak), illetve az a szakasz, ami tartalmazza a poszt-transzlációs érés során kihasításra kerülő Lys156–Arg157 dipeptidet, valamint a trombin által történő aktiváció helyét (Arg169). A PC nehéz lánc tartalmazza magát az aktivációs peptidet és a katalitikus domént (185–419. aminosavak). A PC aminosavsorrendjét figyelembe véve a hagyományos aminosav sorszámmal 42-t kell hozzáadni, hogy az új HGVS nevezéktan szerinti sorszámmal megkapjuk. Az értekezésben a továbbiakban mindenhol az új nevezéktant követjük.

A PC és kofaktora a protein S (PS), mint természetes antikoagulánsok jelentős szerepet játszanak a koaguláció szabályozásában [322-324]. A PC-t trombin aktiválja trombomodulin (TM) jelenlétében [325]. A TM az endothel sejtek felszínén található fehérje, melyhez történő kötődést követően a trombin a PC potens aktivátorává válik. Az endoteliális protein C receptor (EPCR) szintén fontos szerepet játszik az aktiválási folyamatban: az EPCR annak Gla-doménjén keresztül köti a PC-t és bemutatja a trombin-TM komplexnek. Az aktivált PC (APC) leválik az EPCR-ról, majd kofaktorával, a protein S-sel (PS) kapcsolódva inaktiválja a membránhoz kötött FVIIIa-

t és FVa-t azáltal, hogy bizonyos arginin aminosavaknál hasítja őket (FVa esetében p.Arg306, p.Arg506 és p.Arg679; FVIIIa esetében pedig p.Arg336 és p.Arg562, hagyományos számozás szerint). Az APC az intakt FV-öt is tudja hasítani a p.Arg506 mellett, melynek hatására e hasított, de előzőleg nem aktivált FV az APC kofaktoraként működik és segít a FVIIIa inaktiválásában. A PS szabad formája az APC fontos kofaktora, növeli annak affinitását a negatívan töltött foszfolipid felszínekhez. Azt is tudjuk, hogy az antikoaguláns APC komplex számára szükséges foszfolipid membrán összetétele különbözik a prokoaguláns komplexekétől, ugyanis itt foszfatidil-etanolamin szükséges a prokoaguláns komplexek számára érdekes foszfatidil-szerin helyett. [326]. A PS a komplement 4b kötő fehérjével (C4bBP) is alkot komplexet, ennek a komplexnek nincs APC kofaktor aktivitása. A PS-nek direkt, APC-től független antikoaguláns hatásai is vannak, melyek nem képezik jelen értekezés alapját, így ezek ismertetésétől eltekintünk.

Az APC fő gátlója a protein C inhibitor (PCI), egy, a májban szintetizálódó egyláncú szerin proteáz inhibitor glikoprotein [327]. A PCI 1:1 arányú komplexet alkot az APC-vel és az aktív helyén hasítja (a p.Arg354-nél). Az APC-t az α -1-antitripszin is képes gátolni.

Antikoaguláns szerepén túl a PC fontos szerepet játszik a sejtvédelemben, valamint anti-inflammatorikus, anti-apoptotikus és neuroprotektív funkcióval is bír [328,329]. A citoprotektív hatást az EPCR-kötött APC főként az endotel sejtek PAR1 receptorain fejt ki és a következményes, intracelluláris molekuláris események még csak részben ismertek [330,331]. Az endotel homeosztázisának szabályozása mellett az APC-nek szerepet tulajdonítanak a gyulladás elleni küzdelemben is, eddig a monocyták, makrofágok és neutrophil granulocitákhoz való kötődését ismerték fel. A monocytákon indirekt antikoaguláns hatást fejt ki, gátolja a szöveti faktor aktivitását EPCR-dependens és independens módon is. Gátolja továbbá a gyulladásos citokinek termelődését. A makrofágokon kapcsolódik a CD11b/CD18 receptorhoz, ami végső soron a LPS-mediálta proinflammatorikus aktivitás csökkenéséhez vezet. Az APC szerepét a NET-osis (neutrophil extracelluláris csapdák képződése) folyamatának szabályozásában is felvetették [332]. Mindezen ismeretek a PC útvonal farmakológiai befolyásolásának ígéretes voltát vetítik előre. A PC koncentrátumot, a rekombináns PC-t sikerrel alkalmazták súlyos thromboticus kórképekben, de sepsisben is voltak jó eredmények [333]. Manapság a mesterségesen előállított, különböző pontokon mutáns

PC alkalmazásainak lehetőségeit vizsgálják és e mutációkat attól függően hozzák létre, hogy az antikoaguláns, vagy anti-inflammatorikus, citoprotektív, stb. hatások kerüljenek-e előtérbe. A rekombináns PC készítmények fejlesztésének fontos előfeltétele, hogy a molekula struktúra-funkció összefüggéseiről minél több ismeretünk legyen. A természetesen előforduló PC mutációk (melyeket ma általában PC deficiencia kapcsán ismerünk fel) molekuláris következményeinek in vitro elemzése hozzásegít ezen ismeretek gyarapításához.

A humán PC kódoló génje (*PROC*) a 2q13–q14 pozícióban található, kilenc exont tartalmaz, melyek egy 1,7-kb messenger RNS-t (mRNA) kódolnak [334]. Az exon/intron határok a GT-AG szabályt követik. Az 1. exon egy nem kódoló exon, egy hosszú intron követi a lánckezdő ATG kodon előtt, ez a jelenség egyedi a K-vitamin függő faktorok között. A fő transzkripció kezdő hely 1515 bázispárral az iniciátor ATG kodon előtt található. Két kisebb transzkripció start helyet is leírtak –7 és +13 bp távolságra a fő start helytől.

Az első PC deficiens esetet Griffin és munkatársai írták le 1981-ben, a beteg rekurrens vénás thrombosisoktól szenvedett [217]. Azóta már számos PC deficiens eset került közlésre és általában a háttérben álló genetikai defektust is igazolták [323]. A PC deficiencia becsült gyakorisága thrombosison átesett, szelektált betegpopulációban kb. 2-5% [335-337]. A Leiden Thrombophilia Study – ami a témában folytatott egyik első eset-kontroll tanulmány volt – eredménye szerint 3-szorosnak találták a VTE rizikót PC deficienciában nem szelektált betegekben [338]. Más tanulmányokban ennél magasabb, 3-11-szeres VTE rizikót találtak PC deficienciában és jelentős szerepet tulajdonítottak rekurrens thrombosisok kialakulásában is [339]. Az eredmények a betegek beválogatásától, beleértve az etnikai hovatartozást, a tanulmány szerkezetétől, és a PC aktivitás és antigén szint meghatározás módszerétől azonban jelentősen függenek. Sőt, a módszertani variabilitáson túl ez gén-gén, vagy gén-környezet kölcsönhatásoknak is tulajdonítható, melyek nagy részét ma még nem ismerjük. 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 cerebralis vénás thrombosis, esetenként szívüregi thrombus megjelenése [323,340,341]. 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 [342,343]. A K-vitamin antagonistá-indukálta

bőrnekrózis súlyos szövődmény lehet PC vagy PS deficiens betegeknél [344]. PC vagy PS deficiens betegekben artériás thrombosisokat is leírt több esettanulmány [345-347]. A PC deficienciában, mint más ritka betegségeknél, az egyedi esettanulmányok nagyobb hangsúlyt kapnak (amennyiben hitelesen, körültekintően és precízen készülnek el), a nagy populációkat érintő betegségekhez képest. A veleszületett PC deficiencia esetében azokat a tanulmányokat érdemes figyelembe venni, ahol az objektív thrombosis diagnosztika mellett a plazma PC szinteket is adekvát módszerekkel határozták meg (ld. később), illetve kizárható volt szerzett PC deficiencia lehetősége, valamint egyéb, klasszikus kockázati tényezők jelenlétét, vagy hiányát is pontosan rögzítették [348]. E szempontok szerint csupán maroknyi esettanulmány marad, ami a PC deficiencia és az artériás események összefüggéseire hitelesen rámutat [349-360]. A betegek rendre fiatal korban szenvedték el a myocardialis infarktust vagy stroke-ot és általában egyéb kockázati tényezővel nem rendelkeztek. Többeknél artériás és vénás események egyaránt előfordultak. A tanulmányok többségében a háttérben álló genetikai eltérést azonban nem vizsgálták.

Az obszervációs tanulmányokból (főleg kohorsz elrendezésben), amennyiben artériás eseményeket elszenvedett betegekben vizsgálták a PC deficiencia előfordulását, várható módon, igen ellentmondásos következtetések születhetnek, tekintettel a PC deficiencia ritka előfordulására. A több, mint 13000, acut coronaria syndromában vagy ischaemias stroke-ban szenvedő beteg bevonásával végzett ARIC kohorsz tanulmányban például a majdnem 17 éves követési időszak alatt azt találták, hogy az alacsony PC szintek összefüggtek stroke kialakulásával [361]. Fiatal, 65 év alatt ischaemias stroke-ot elszenvedett populációban a betegek 5%-a bizonyult PC deficiensnek és együttevve az AT és PS deficiens személyekkel, összességében a betegek egyharmadában a veleszületett thrombophilia diagnózisa terápia módosításhoz vezetett [362]. Amennyiben – megfordított koncepció szerint – PC deficiens betegeket követtek artériás események kialakulása, mint elsődleges végpont szerint, egy japán tanulmány szerint a PC deficiens betegek 10 évvel fiatalabbak voltak a myocardialis vagy cerebralis infarctus bekövetkeztekor, mint azok, akik nem szenvedtek a deficienciában [363]. Más tanulmányban a PC deficienciát az artériás thrombosisok független prediktorának találták fiatal, 55 év alatti személyekben [361]. Metaanalíziseket készíteni ritka betegségeknél nyilvánvalóan nagyon nehéz, főként a különböző, forrástanulmányokban található prediktorok és kimeneti változók heterogenitása miatt. A PC deficienciával kapcsolatosan két érdemi metaanalízis

készült, melyekben a PC deficiencia és az artériás események összefüggését vizsgálva a PC deficiencia szignifikánsan fokozta az ischaemias stroke kockázatát gyermekbetegekben (EH 6,49; 95%CI: 2,95-14,27 és EH 8,76; 95%CI: 4,53-19,96) [364,365].

A PC deficiencia – a laboratóriumi vizsgálatok eredményei alapján – I-es (kvantitatív) és II-es (kvalitatív) típusra osztható [323]. I-es típusú PC deficienciában a PC aktivitás és antigén szint 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. A PC deficiens betegek többsége heterozigóta *PROC* mutációt hordoz és a PC aktivitás jellemző módon 30-60% közötti. A homozigóta és összetett heterozigóta betegek PC aktivitása és/vagy antigén szintje gyakran detektálhatatlanul alacsony (ez a purpura fulminanssal járó forma). Ha a PC deficiencia molekuláris genetikai aspektusait nézzük, megállapíthatjuk, hogy a mutációk többsége I-es típusú deficienciát okoz, II-es típusú deficiencia az esetek körülbelül 10-15%-ában fordul elő, bár bizonyos populációkban éppen a II-es típusú PC deficiencia a gyakoribb, alapító mutáció(k) következtében (lásd később). Eddig kb. 250 különböző okozati mutációt közöltek, melyek adatbázisokban elérhetők (<http://www.hgmd.cf.ac.uk> és <http://www.isth.org>) (7. ábra). A PC deficiencia öröklésmenete nem olyan egyértelmű, mint korábban gondolták. Mutathat autoszomalis recesszív vagy domináns öröklődést is, gyakran inkomplett penetranciával.



7. ábra. A *PROC* génben talált okozati mutációk megoszlása a HGMD adatbázis szerint (www.hgmd.cf.ac.uk).

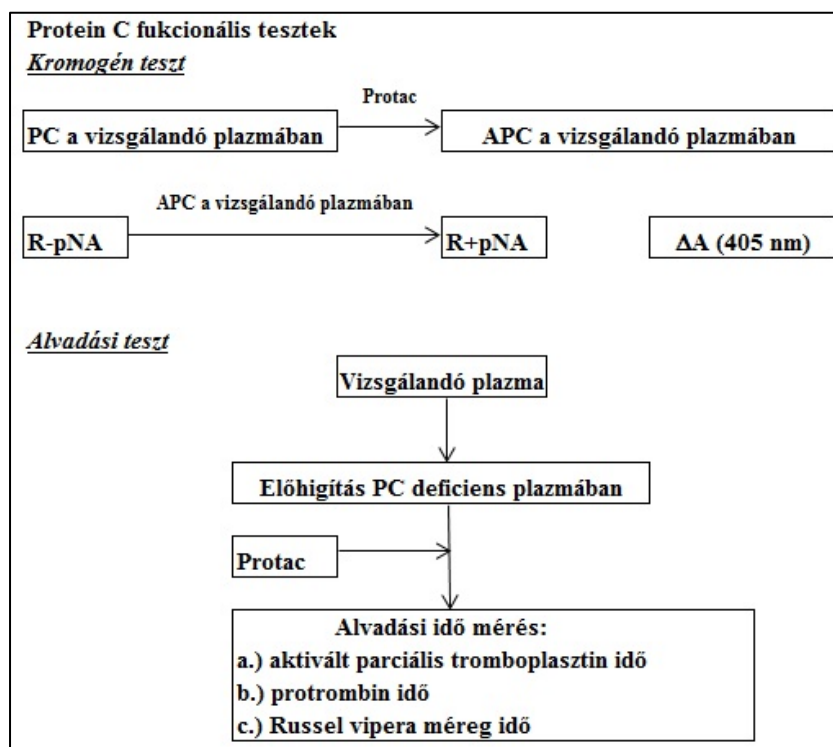
A nukleotid számozást az 1-es exonban és közelében a nem kódoló 1-es exon első nukleotidjához viszonyítva adtuk meg. A nukleotid számozást a kódoló régióban a lánckezdő ATG kodon első nukleotidjához viszonyítva adtuk meg. Az aminosav számozást az érett fehérjére vonatkoztattuk, az első metionin a –42-es. Az irodalom két nagyméretű deléciót is tartalmaz, egyik a teljes gént érinti, a másik az 1-9 exonokat (ezek az ábrán nincsenek feltüntetve). (Bereczky Z, Kovács KB, Muszbek L. Protein C and protein S deficiencies: similarities and differences between two brothers playing in the same game. Clin Chem Lab Med 2010; 48:S53–S66. közleményünk alapján.)

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 molekulamodellkezés majdnem minden esetben kóros fehérje feltekeredést és következményesen a mutáns fehérje instabilitását

jelezte. In vitro expressziós tanulmány az esetek csupán harmadában készült. Stop kodont eredményező pontmutációról is beszámoltak (kb. 5%). A pontmutációk egy kisebb hányada (az összes mutáció kb. 9%-a) az exon/intron határon fordult elő „splicing” zavart eredményezve. Habár majdnem minden misszensz mutáció teljes szekréción blokkot okoz, néhány mutáció esetén mégis szekretálódik a fehérje, a szekréción ráta azonban jóval alacsonyabb a vad típusú fehérje szekréciónjánál [366]. Az ilyen mutációkkal rendelkező homozigóta deficiens betegeknél a PC koncentráció alacsony ugyan, de 1% feletti.

A II-es típusú deficiencia diagnóza a funkcionális tesztek és az antigén szint mérés eredménye közötti diskrepanción alapszik. Misszensz mutáció fordul elő ilyenkor leggyakrabban és a Gla-domént vagy pro-peptidet érintő aminosavcsere károsodott Ca^{2+} - és foszfolipid-kötést eredményez [367-369]. A szerin-proteáz doménben előforduló mutációk károsodott proteáz aktivitást vagy csökkent szubsztát kötést eredményeznek [370]. Alapító *PROC* mutációt írtak le a finn populációban: az összes II-es típusú PC deficiens esetet ugyanaz a mutáció okozza [371]. Alapító mutációkat találtak továbbá a tajvani kínai VTE betegeknél és japán PC deficiens esetekben is [372,373]. Közös őst találtak egy stop kodonhoz vezető mutáció esetében holland betegeknél, továbbá Észak-Amerikába vándorló francia telepesek is honosítottak meg *PROC* mutációt [374,375]. Eddigi vizsgálataink során, húsz év távlatából áttekintve, hazánkban nem mutattunk ki alapító mutációt a *PROC* vonatkozásában.

A PC deficiencia diagnosztikája során szűrőtesztként funkcionális tesztek alkalmazunk [323]. E tesztek lehetnek alvadási idő meghatározáson alapulóak, vagy amidolitikus esszék kromogén szubsztátot alkalmazva (**8. ábra**).



8. ábra. A PC aktivitásának meghatározására alkalmas funkcionális tesztek vázlatos áttekintése.

(Bereczky Z, Kovács KB, Muszbek L. Protein C and protein S deficiencies: similarities and differences between two brothers playing in the same game. Clin Chem Lab Med 2010;48:S53-66. közleményünk alapján.)

Akár alvadási, akár kromogén tesztet használunk, első lépésben a beteg plazmájában lévő PC-t Protac-kal (az Agkistrodon contortrix mérgéből származó enzim) aktiváljuk. A kromogén tesztben az APC szintetikus szubsztrátjából annak APC által történő elhasítása során felszabaduló paranitroanilin okozta abszorbancia változás mértékét detektáljuk 405 nm-en. Az abszorbancia változás mértéke egyenesen arányos a PC aktivitásával. Az alvadási idő alapú tesztekben valamilyen alvadást aktiváló reagens jelenlétében (APTI, protrombinidő, Russel vipera méreg-idő) detektáljuk az APC-függő alvadási idő megnyúlás mértékét. A PC aktivitása egyenesen arányos az alvadási idő megnyúlás mértékével. Ismert PC aktivitású referencia plazmára kalibrálva mind az abszorbancia változás, mind az alvadási idő értéke közvetlenül PC aktivitássá konvertálható. Mindkét típusú tesztnek vannak előnyei és hátrányai a klinikai laboratóriumi diagnosztikában, melyek ismertetése az értekezés szempontjából nem releváns és feleslegesen növelné a dolgozat terjedelmét, de annyit azért röviden meg kell említeni, hogy a FV Leiden mutáció befolyásolhatja az alvadási tesztet alámérést okozva, míg ez a jelenség a kromogén tesztekben nem fordul elő. A

kromogén tesztek viszont nem érzékenyek bizonyos II-es típusú PC mutációkra, különösen azokra, amelyek a foszfolipid/kalcium kapcsolatokat befolyásolják. Tekintettel a FV Leiden mutáció zavaró hatására és a II-es típusú PC deficienciák – eddigi ismereteink szerint – kifejezetten alacsony előfordulási gyakoriságára, az ISTH Plasma Coagulation Inhibitors SSC ajánlása értelmében a kromogén amidolitikus esszé szuperior az aladási teszttel szemben [246]. Meg kell azonban fontolni azt a körülményt, hogy az aladási idő detektálásán alapuló teszt a fiziológiás viszonyokat jobban reprezentálja, és a PC deficiencia klinikai gyanúja esetén normál kromogén esszé eredmény birtokában javasolt az aladási idő alapú teszt elvégzése és csak annak negativitása esetén vethetjük el a PC deficienciát. A PC antigén koncentrációját manapság ELISA módszerrel mérik, a klinikai laboratóriumok többsége nem végzi e meghatározást.

3 CÉLKITŰZÉSEK

A ritka hemosztázis rendellenességekkel kapcsolatos korábbi kutatási eredményeinkre és a hemosztázis laboratóriumi diagnosztikában eltöltött több mint húsz év tapasztalatára 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. Egyrészt célul tűztük ki a diagnosztikai módszerfejlesztéseket és új laboratóriumi protokollok bevezetését, ajánlások megfogalmazását e témakörben, másrészt tanulmányozni kívántuk a ritka hemosztázis rendellenességek háttérében álló genotípus-fenotípus kapcsolatokat, melyekből számos érdekes, előremutató következtetést vonhattunk le.

Részleteiben:

3.1 Vérzékenységek

Adekvát laboratóriumi diagnózis biztosítását követően genotípus-fenotípus összefüggések tanulmányozása ritka coagulopathiákban, úgymint FXIII, FV és FX deficienciákban: invazív beavatkozások kapcsán súlyos vérzéseket mutató fiatal nőbeteg hemosztazeológiai kivizsgálása, a FV deficiencia karakterizálása, egy csecsemőkorban felismert, súlyos vérzékeny, FX deficiens fiúgyermek kivizsgálása, a háttérben álló mutációk azonosítása, az eltérések fehérje szinten történő magyarázata, valamint két, súlyos vérzéses tünetekkel rendelkező beteg, egy újszülött fiú és egy 13 éves lány esetében a FXIII deficiencia karakterizálása. Továbbá diagnosztikai ajánlás megfogalmazása FXIII deficienciában, valamint differenciáldiagnosztikai problémák megoldása ritka haemorrhagias diathesisekben, úgymint fibrinogén rendellenességek, von Willebrand betegség ritka típusai, hereditaer haemorrhagias teleangiectasia (HHT). A hazai HHT betegek kapcsán alapító mutáció felderítése. A molekuláris diagnosztika szerepének értékelése e ritka vérzékenységek diagnosztikájában, illetve differenciáldiagnosztikájában.

3.2 Thrombophiliák

3.2.1 Antitrombin deficiencia

AT deficienciában szenvedő betegek és családtagjaik bevonásával klinikai-laboratóriumi szempontokat is figyelembe vevő adatbázis kialakítása, melynek segítségével – az így létrehozott nagy létszámú AT deficiens populációban – egyrészt tanulmányozni kívántuk a heterogén betegség klinikai és laboratóriumi jellegzetességeit, másrészt fel kívántuk térképezni a hazai AT deficienciák típusait, a háttérben álló genetikai eltérésekkel együtt. Meg kívántuk határozni a mutációs detektálási arányt a hazai AT deficiens betegek körében. Gyakori mutáció esetén tanulmányozni és bizonyítani kívántuk alapító hatás jelenlétét, valamint meghatározni az alapító mutáció korát és eredetét. Új mutációk esetén azok biokémiai karakterizálását is el kívántuk végezni. Harmadrészt célunk volt laboratóriumi diagnosztikai problémák explorálása, a funkcionális AT esszék teljesítőképességének vizsgálata a különböző AT deficiencia típusok esetén, új laboratóriumi tesztek és diagnosztikai algoritmusok kidolgozása. Továbbá, in vitro biokémiai és in silico módszerekkel tanulmányozni kívántuk a IIHBS típuson belüli altípusok eltérő klinikai és laboratóriumi viselkedése háttérben álló molekuláris különbségeket.

Mindezen munkáink eredményei alapján célunk volt egy nemzetközi AT deficiencia regiszter létrehozása, valamint nemzetközi kollaborációk kialakításával az AT deficiencia új, klinikai szempontból érdekes aspektusainak vizsgálata; új diagnosztikus eljárás és protokoll kidolgozása, mely biztonsággal elkülöníti a IIHBS típusú heterozigótákat az egyéb típusú heterozigóktól és különbséget tesz a IIHBS hetero-és homozigóták között. Célunk volt a IIHBS deficiencia klinikai jelentőségének meghatározása.

3.2.2 Protein C deficiencia

PC deficiencia adatbázis kialakítása, az alvadási és a kromogén funkcionális tesztek diagnosztikus értékének megállapítása, új *PROC* eltérések detektálása, az érdekes pozíciókban lévő mutációk in vitro és in silico vizsgálata. Az értekezésben ezek közül két beteg összesen három mutációjának vizsgálatával kapott eredményeinket mutatom be: egy purpura fulminánsban szenvedő beteg összetett heterozigóta volt a p.Asp77Gly és az új p.Ala163Glu mutációkra, egy 27 évesen mélyvénás thrombosison átesett beteg heterozigóta formában hordozta az új p.Ala163Val mutációt. Célunk volt a mutáns

zsbereczky_271_24

fehérjéket in vitro kísérletekben vizsgálni és a mutációk szerkezeti következményeit molekulamodellezéssel és molekuladinamikai szimulációkkal szemléltetni.

4 BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Vizsgálatok haemorrhagias diathesisekben

4.1.1 Betegek

4.1.1.1 *XIII-as faktor deficiencia*

Két, súlyos vérzéses tünetekkel rendelkező beteget vizsgáltunk, egy újszülött fiút Hollandiából, Bredából (proband1) és egy 13 éves lányt Belgiumból, Gentből (proband2). A Proband 1 egy hetes újszülött volt a vizsgálatok kezdetén. Sárgaság és cephalhematoma miatt vették fel a hollandiai Amphia Kórház újszülött osztályára. A gyermek egy bába által felügyelt komplikációmentes otthonaszülés során született terminusra 3450 grammal. A családban nem fordult elő véralvadási zavar. Az egyéb tekintetben egészséges gyermeknél kifejezett sárgaság és nagy kiterjedésű temporo-occipitális cephalhematoma alakult ki. Három-négy napon keresztül fototerápiával kezelték, majd a 10. napon egészségesen bocsátották otthonába. Két nappal később újra felvették köldökcsomk vérzés miatt. A lokális nyomókötés és vérzéscsillapító zselatin szivacs alkalmazása ellenére a köldökcsomk vérzés nem állt el. Rutin hemosztázis szűrőteszt (APTI, PI, TI), fibrinogén szint és thrombocyták szám a referencia intervallumban volt. A FVIII szintje 211%, a FIX szintje 67% volt. (E laboratóriumi vizsgálatok a bredai kórházban történtek.) Nagy dózisú K-vitamin (5 mg) és tranexámsav adása hatástalan volt, míg friss fagyasztott plazma egyszeri dózisa (10 ml kg⁻¹ testsúlykilogrammmal) azonnal megállította a vérzést. A nem traumás szülés ellenére kialakuló jelentős cephalhematoma és a köldökcsomk vérzés kombinálódása felvetette öröklött FXIII deficiencia lehetőségét. Ezt a vérzéses epizódot követően a gyermeknél enyhe vérzékenységet vettek észre, és igény szerint FXIII koncentrátum adását jelentő faktorpótló terápiában részesült.

A Proband 2 nem rokon, vérzékenység szempontjából negatív anamnesissel rendelkező európai szülők első lánygyermeke. Tizenhárom éves korában diagnosztizálták az öröklött FXIII deficienciát a belgiumi Gent University Hospitalban. Születést követően nem volt köldökcsomk vérzése, először hároméves korában egy kisebb fejsérülést követően kialakult extradurális hematoma miatt hospitalizálták, melyet követően koponyalékelést végeztek. A hemosztázis szűrőteszt (PI, APTI) és thrombocyták szám referencia tartományon belül volt. Von Willebrand (vWF) faktor antigén szint és aktivitás, valamint a thrombocyták funkcionális tesztek normál

eredményűek voltak. (E laboratóriumi vizsgálatok a genti kórházban történtek.) A későbbiekben számos alkalommal fordultak elő kifejezett, de felszínes horzsolásos sérülések testszerte, melyek még gyermekbántalmazás lehetőségét is felvetették. Tizenkét éves korában egy, a jobb lágyékáról történt pyogen granuloma eltávolítását követően súlyos sebgyógyulási zavar jelentkezett. A sebgyógyulás alatt hányingere és hasi panaszai voltak. Ultrahang vizsgálat és MRI egy hasüregi masszát jelzett a bal petefészek közelében. Exploratív laparotomia során masszív vérzést találtak (legvalószínűbben az első ovulatio során bekövetkezett follikulus repedésből adódóan) és 1150 mL vért távolítottak el.

4.1.1.2 *V-ös faktor deficiencia*

A 34 éves nőbeteg szülést, illetve műtéti beavatkozásokat követően fellépő vérzéses tünetei háttérében álló hemosztázis rendellenesség kivizsgálása céljából érkezett egyetemünkre. A beteg családi anamnesise vérzékenység tekintetében negatív. Saját anamnesisében spontán vérzés nem fordult elő, a vérzések különböző invazív beavatkozások (tonsillectomia, emlő plasztikai műtét, illetve conisatio) és per vias naturales szülés során fordultak elő, több alkalommal friss fagyasztott plazma adását és transzfúziót igényelték. A vérzések háttérében lokális tényezők jelenléte nem volt igazolható. Betegünknek két lány gyermeke van (a vizsgálat időpontjában 16 és 4 évesek), spontán vérzéseik nincsenek, műtéten még egyikük sem esett át.

4.1.1.3 *X-es faktor deficiencia*

A diagnózis idején egy éves fiúgyermek inadekvát traumára bekövetkező súlyos subduralis vérzés miatt került felvételre a Debreceni Egyetem Gyermekklinikára. A beteg családi anamnesise vérzékenység tekintetében negatív volt. Saját anamnesisében kiemelendők voltak még a gyakori bőr-és nyálkahártya vérzések. A szülők közeli rokonok. Diagnózist követően a beteget Beriplex (II-es, VII-es, IX-es és X-es faktor koncentrátum) profilaxisra állították heti adagolással. A profilaxis mellett vérzések nem fordultak elő. A betegnek három évvel később fiútestvére született és arra tekintettel, hogy az idősebb testvér diagnózisa, genetikai eredménnyel együtt ekkor már rendelkezésre állt, a fiatalabb testvért még az első vérzéses epizód előtt diagnosztizáltuk. Mivel nála is igazolódott a súlyos FX deficiencia, azonnal profilaxisra került, mely mellett vérzései nem jelentkeztek.

4.1.1.4 *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. Kollaborációban, 2012 óta tanszékünk biztosítja a laboratóriumi diagnosztikát. Az eltelt idő alatt – diagnosztikai szolgáltatásunkat kiterjesztve az ország más régióira is – már százon felül van azon betegek száma, akik esetében igazoltuk a HHT jelenlétét az okozati mutációk kimutatásával a HHT fenotípust okozó génekben. Az értekezésben 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 férfitbeteg, 82 éves nőbeteg, 37 éves nőbeteg, 56 éves férfitbeteg és egy 56 éves nőbeteg) esetében került sor először genetikai vizsgálatra a Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszéken (KLKT), 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 [195]. Ez alapján a HHT-ra jellemző orrvérző és TA-val rendelkező betegeket alapos általános és fül-orr-gégészeti fizikai vizsgálatnak vetették alá. A családi anamnesis felvétele során az orrvérző, TA-val vagy AVM-mel rendelkező családtagok is azonosításra kerültek. Az agyi AVM szűrés kontrasztos MR-vizsgálattal, a tüdő és máj AVM-k vizsgálata CT-vel történt. A betegek szívultrahang vizsgálaton is átestek. Az emésztőrendszer felső szakaszának endoszkópos vizsgálatát akkor végezték el, ha felmerült a gyomor-bélrendszeri vérzés gyanúja vagy a beteg hosszú ideje fennálló vérszegénysége.

4.1.1.5 *A von Willebrand betegség (vWD) fibrinogén rendellenességek és HHT differenciáldiagnosztikai problémát jelentő esetei*

Az elmúlt 10 évben – az országban szinte egyedülálló módon rendelkezésre álló, teljes körű és részletes laboratóriumi hemosztazeológiai vizsgálataink során – számos olyan esettel találkoztunk, ahol a végső diagnózis felállításához a molekuláris vizsgálatok elkerülhetetlenek voltak. E vizsgálatok során többnyire megerősítettük a hemosztázis vizsgálatok eredményeire alapozott gyanúkat, 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 az értekezésben, ahol nem a gyakori (*ENG* és *ACVRL1*) génekben sikerült az okozati mutációt azonosítani, továbbá ahol a mutáció azonosításának prognosztikai szempontból is jelentősége van.

4.1.1.6 *Populációs kontroll személyek*

A magyar általános népességre reprezentatív, ún. populációs kontroll személyek DNS mintái a Háziiorvosi Morbiditási Adatgyűjtési Program (HMAP)-ból származtak [376]. Röviden, a HMAP a Debreceni Egyetem Népegészségügyi Iskola és az akkori Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat összefogásával indult el 1998-ban. A minták Hajdú-Bihar, Győr-Moson-Sopron, Szabolcs-Szatmár-Bereg, Zala, Bács-Kiskun és Komárom-Esztergom vármegyei ÁNTSZ intézetek, illetve a csatlakozó háziiorvosi 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

4.1.2.1 *Rutin hemosztazeológiai 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 (eseteinknél Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). A koaguláció vizsgálatához thrombocyta szegény plazmát (PPP) állítottunk elő 1500 g, 20 perc, szobahőn történő centrifugálással, a thrombocyta funkció vizsgálatához pedig thrombocyta dús plazmát (PRP) használtunk, amit 500 g, 20 perc, szobahőn történő centrifugálással nyerünk és a thrombocyta számot PPP segítségével 260 G/L-re állítottuk.

A koaguláció szűrőtesztjeinek és az alvadási faktoroknak egyfázisú alvadási tesztben történő meghatározása BCS koagulométerben (Siemens, Marburg, Németország) Siemens reagensekkel, illetve STA Compact koagulométerben (Diagnostica Stago, Asnieres, Franciaország) Stago reagensekkel történt. A trombinidő és a fibrinogén Clauss módszerrel történő vizsgálatát hazai fejlesztésű reagensekkel (Labexpert, Debrecen) végeztük. A fibrinogén antigén szintet Siemens immunnefelometriás módszerrel BN-Prospec analizátoron mértük. A FXIII aktivitásának meghatározása ammónia felszabadulásának detektálásán, NADPH

fogyást 340 nm-en kinetikus tesztben követő, Muszbek professzor úr irányítása alatt a 2000-es években fejlesztett és kereskedelmi forgalomban lévő teszttel történt (Reanal-Ker, Budapest) [377]. A módszer standardizációjában, az első nemzetközi plazma standard potenciáljának meghatározásában magam is részt vettem a 2000-es évek közepén. A FX antigén koncentráció meghatározása kereskedelmi forgalomban kapható ELISA-val (Diagnostica Stago) történt. A FXIII antigén szintek esetében TECHNOZYM® FXIII Ag, FXIII-A SUB és FXIII-B SUB ELISA-kat használtunk (Technoclone, Bécs, Ausztria) a FXIII-A₂B₂ komplex, az A-alegység és a B-alegység koncentrációk meghatározására. Az ELISA módszerek kidolgozása Dr. Katona Éva nevéhez fűződik [55,378].

A vérzékeny betegek részletes laboratóriumi kivizsgáláshoz – amennyiben nem csak coagulopathia jön szóba – hozzá tartozik a thrombocyta funkció vizsgálata is. Erre akkor is sor kerül, amikor a koaguláció és vérlemezke rendszert egyaránt befolyásoló kórképről van szó, pl. vWD és fibrinogén rendellenességek esetén. 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, Havertown, PA), kereskedelmi forgalomban kapható agonistákkal (kollagén, ADP, adrenalin, arachidonsav, trombin) történt.

A vWD diagnosztikáját a jelenleg érvényes nemzetközi irányelveknek megfelelően végeztük [140,164]. A vWF:Ag (BC von Willebrand reagent, immunnefelometria, von Willebrand antigén szintet detektálja) és vWF:GPIbM (vWF aktivitás, Innovance VWF Ac, funkciónyerő mutáns GPIb fragmenshez történő kötődés mértékét detektálja) meghatározásokat Siemens reagensekkel BCS-XP koagulométerben végeztük. A vWF kollagénhez történő kötődésének mértékét, a vWF:CB paramétert a Technoclone Technozym vWF:CBA ELISA kit felhasználásával határoztuk meg. A vWF VIII-as faktorhoz történő kötődésének mértékét, a vWF:FVIIIIB paramétert Asserachrom VWF:FVIIIIB kit (Diagnostica Stago, Asnieres, France) felhasználásával mértük. A vWF multimer strukturáját „in-house” immunoblot módszerrel, HRP-konjugált poliklonális nyúl anti-humán vWF antitesttel (Dako, Glostrup, Denmark) vizualizáltuk. PRP-ben risztocetin indukálta thrombocyta aggregáció (RIPA) vizsgálatát 0,6 mg/L-1,5 mg/L Helena risztocetinnel (Helena Laboratories, Beaumont, TX) végeztük. A reptilázidőt Stago reagenssel ST4 mechanikus koagulométerben detektáltuk. Bizonyos esetekben sor került globális,

viszkoelasztikus hemosztázis teszt elvégzésére, ekkor a ROTEM sigma készüléket (Werfen) használtuk.

4.1.2.2 Rutin genetikai vizsgálatok

A molekuláris genetikai diagnosztika érdekében perifériás fehérvérsejtekből DNS-t izoláltunk QIAamp DNA Blood Mini Kit-tel (Qiagen, Hilden, Németország). 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, Foster City, CA), 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). A szekvenciákat a National Center for Biotechnology Information GenBank adatbázisban elérhető *F5* (NG_011806), *F10* (NG_009258), *F13A1* (NG_008107), *ENG* (NG_009551), *ACVRL1* (NG_009549) és *SMAD4* (NG_013013) gének szekvenciáival hasonlítottuk össze. Az új, korábban még nem közölt mutációk esetében valós idejű PCR-t, FRET detektálást követő olvadáspont-görbe analízis módszerek beállítása történt (LightCycler, Roche, Mannheim, Németország) annak érdekében, hogy a mutáció patogenitásának egyik bizonyítékeként legalább 100, hemosztázis szempontjából egészséges személy DNS mintáján igazoljuk az adott, feltételezetten kóroki mutáció hiányát.

4.1.2.3 Speciális genetikai vizsgálatok

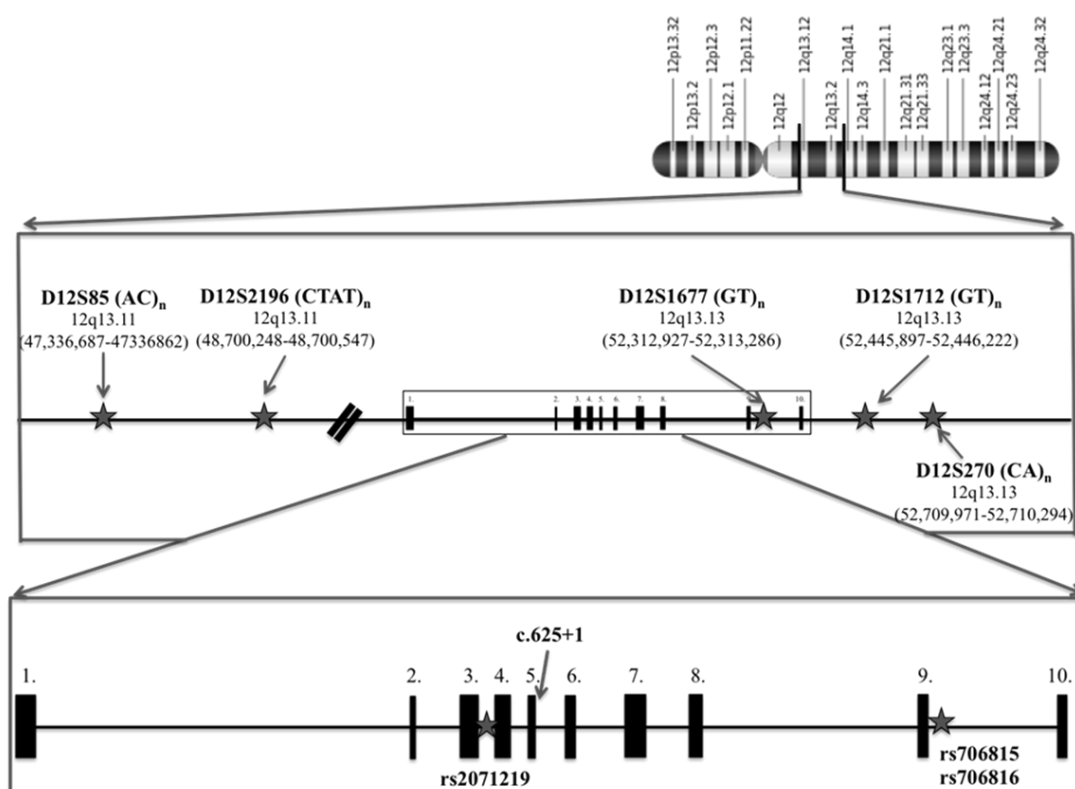
- A FXIII-A mRNS analízise

A Tempus Blood RNS csövekbe (Applied Biosystems) levett vérmintákból az RNS izolálást Tempus 12-port RNA Isolation kit (Applied Biosystems) használatával végeztük. A teljes RNS reverz transzkripciója First Strand cDNA Synthesis Kit-tel történt. A valós idejű PCR reakciókat SYBR Green I Master (Roche, Mannheim, Németország) mixszel végeztük LightCycler 480 (Roche) készülékben duplikátumokban. A FXIII-A génexpressziót a foszfoglicerát-kináz 1 (PGK-1) expressziós szintjére normalizáltuk. A PCR reakciók 10 µL Master Mix-et (2x-es koncentráció), a referencia génhez (*PGK-1*) 300 nM primert, a *F13A1* génhez 600 nM

primert tartalmaztak. Az F:5'-tcacgagcgttcacgtgttc-3', R:5'-ctgcacatagaaagactgcc- 3' primereket és F:5'-cctggatggtcctggagtaa-3', R:5'-agggagtcactgctcatgct-3' primereket használtuk rendre a *F13A1* gén 3-as és 14-15-ös exonjának amplifikálásához. Az amplifikáláshoz használt program 10 perc 95°C-os fűtésből, majd az alábbi lépésekből álló 40 ciklusból állt: 10 sec denaturálás 95°C-on, 30 sec hibridizáció 60°C-on és 1 sec extenzió 72°C-on. A relatív genomi expresszió számításához a $2^{-\Delta\Delta C_q}$ módszert használtuk [379].

- SNP genotipizálás és mikroszatellita markerek detektálása az ACVRL1 c.625+1 G>C eltérés alapító hatásának vizsgálatához

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. Ezek elhelyezkedése az 12-es kromoszómán a **9. ábrán** látható.



9. ábra. Az *ACVRL1* c.625+1 G>C eltérés alapító hatásának igazolására vizsgált 8 polimorf genetikai marker elhelyezkedése a 12-es kromoszómán.

zsbereczky_271_24

A HHT háttérben álló *ACVRL1* c.625+1 G>C mutáció és az rs2071219 polimorfizmus kimutatása valós idejű PCR-t követő olvadáspont görbe analízissel valósult meg LightCycler®480 (Roche) készüléken.

I. táblázat. Az ACVRL1 c.625+1 G>C mutáció, az rs2071219 polimorfizmus és a mikroszatellita markerek detektálása során használt oligonukleotidok.

Genetikai marker	Primer típusa	Bázissorrend (5' - 3')	Jelölés típusa	T _{an}	Fragment mérete (bp)
				(°C)	
rs2071219	F	GGCAGGACTCTGGGATCTAAC		58	267
	S	GGAGCTGACCTAGTGAAGCTGA G	FL		
	A	CTCAGTGTCCCCCTCCCTCAG	LCRed610 - PH		
	R	AGACTGGACTCTCCCAGCTC			
c.625+1 G>C	F	CTCTCCGTACCCCCAGGAC		58	250
	S	GAGTGTGTGGGTGAGCAGTGG	FL		
	A	TGAGCCCGGTGGATGAGG	LCRed670 - PH		
	R	CTCCCTGCCCAGCAGAAT			
D12S85	F	GGCACCTCTCACTCCATTACA	PET®	60	100-135
	R	TAAATGAAAGTCAAGGGGAACA G			
D12S2196	F	GGGCAATGAGGCAAAATC	VIC®		140-170
	R	CCAAGGATCTGGAATTTTGT			
D12S1677	F	CATCTGGTCATTCTGGGATTT	NED™		175-220
	R	CAGTTGAGCCGAGGAGTTT			
D12S1712	F	GCAGGGTCTCTGTAAGCACA	PET®		240-270
	R	AGGGGGCATAGGGATGAT			
D12S270	F	TCTTGAAATCCCAGTCTCCAA	6FAM™		280-315
	R	CCACCCCTCAGTGTAGGAAG			

F: Forward primer; R: Reverz primer; S: Sensor próba; A: Anchor próba; a vastag betűvel szedett aláhúzott betűk a vizsgált SNP-re komplementer nukleotidokat jelölik

Az *ACVRL1* gén 9-es exonját követő introni régióban található rs706815 és rs706816 polimorfizmusok vizsgálata fluoreszcens direkt szekvenálással valósult meg, az *ACVRL1* 9-es exon amplifikációjához használatos oligonukleotidokkal. A 12-es kromoszóma 5 mikroszatellita markerének vizsgálata fragmentanalízissel, fluoreszcensen jelzett oligonukleotidokkal, multiplex PCR reakcióban történt (**I. táblázat**). A felsokszorozott PCR termékekhez GeneScan™-500 LIZ™ méret standard és Hi-Di Formamide™ hozzáadása után kapilláris elektroforézist végeztünk ABI3130

genetikai analizátoron (Life Technologies) a DNS fragmentumok elválasztására. Az STR fragmentumok analízise a GeneMapper v4.1 szoftver (Life Technologies) segítségével valósult meg.

- Új generációs panel szekvenálás haemorrhagias diathesisekben

A reakciók során 10 ng DNS mennyiségből indultunk ki. A könyvtárkészítés QIAseq targeted DNA custom panel (CDHS-15414Z-675, Qiagen) felhasználásával történt gyártói utasítás szerint. A panelt magunk állítottuk össze, ami a következő géneket tartalmazta: *ACVRL1*, *ENG*, *SMAD4*, *GDF2*, *RASA1*, *F5*, *F8*, *FGA*, *FGB*, *FGG*, *KLKB1*, *ADAMTS13*, *GPIBA* és *VWF* (ROI size: 48,149 bp). Közülük a *ACVRL1*, *ENG*, *SMAD4*, *GDF2* és a *RASA1* géneket a HHT fenotípussal rendelkező betegek differenciáldiagnózisához használtuk. Az *FGA*, *FGB* és *FGG* géneket a fibrinogén rendellenességek vizsgálatához használtuk. Végül, a *F8*, *ADAMTS13*, *GPIBA* és *VWF* géneket a vWD differenciáldiagnosztikai problémákat jelentő eseteiben elemeztük. A *F5* gén vizsgálatát azért illesztettük a panelbe, mert így vizsgálhattuk a *F5* gén polimorfizmusainak (elsősorban a FV Leiden, rs6025) hatását a vérzékeny fenotípusra. A *KLKB1* gén (a prekallikreint kódolja) az APTI megnyúlások differenciáldiagnosztikája okán került a panelbe. A MiSeq rendszert (MiSeq Reagent kit v2 300 cycles, Illumina, San Diego, CA, USA) használtuk szekvenáláshoz. A szekvenáló reakciók során mindig 12 beteg indexekkel ellátott, összekevert mintáját tartalmazó pool-t futtattunk együtt. A könyvtárakat (4nM végkoncentráció) 0.2nM NaOH hozzáadásával denaturáltuk, majd 20pM-ra hígítottuk hibridizációs pufferrel (Illumina). A könyvtárak végső, futtató koncentrációja 8 pM volt. A szekvenálást a MiSeq gyártói protokoll szerint hajtottuk végre. Az adatok elemzését NextGene software (SoftGenetics, State College, PA, USA) használatával végeztük. A lefedettség legalább 40-szeres volt minden esetben és minden exon esetében tartalmazott egy-egy 20bp nagyságú introni szakaszt is minden egyes exon elején és végén. Elemzés során először a FASTQ formátumokat FASTA formátummá konvertáltuk. Az elemzés a humán genom 37-es verziójának felhasználásával történt (GRCh37). Az azonosított variánsokat a HGMD adatbázisban (<https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) található mutációkkal vetettük össze, illetve az 1000 Genomes (<https://www.internationalgenome.org/>) és a dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) adatbázisokban ellenőriztük, hogy nem ismert polimorfizmusokról van-e szó (MAF >0,01). A lehetséges patogén mutációkat Sanger

szekvenálással validáltuk. Ehhez a primereket a Primer3Plus szoftverrel (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) terveztük, a szekvenálást ABI3130 Genetic Analyzer-en végeztük, adatelemzésre a Sequencing Analysis 5.4 szoftvert használtuk (Thermo Fisher Scientific).

- A mutációk nevezéktana

A mutációk leírása a Human Genome Variation Society (<http://www.HGVS.org>) ajánlása alapján történt. Egyes esetekben, ahol a HGVS ajánlás megjelenésénél korábban történt egy-egy mutációval kapcsolatos publikációnk megjelenése, nem egyezik meg a publikációban található megnevezés a jelen értekezésben lévő megnevezéssel. Ezekben az esetekben az eredmények tárgyalásánál ezt jelzem. A vWD esetében az ISTH-SSC VWF Online Database (<http://www.ragtimedesign.com/vwf/mutation/>), a von Willebrand factor Variant Database (<http://www.vwf.group.shef.ac.uk/>), a HHT esetében az ARUP Mutation Databases (<http://arup.utah.edu/database/HHT/>), a fibrinogén rendellenességek esetében pedig a Human Fibrinogen Database (<http://site.geht.org>) adatait is figyelembe vettük a variánsok klinikai jelentőségének megítéléséhez.

- Predikciós analízis

Az új mutációk patogenitásának vizsgálata Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), PolyPhen2, (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>), MutPred2 és SIFT predikciós algoritmusokkal történt. A mutációk klasszifikációja az American College of Medical Genetics and Genomics útmutatása alapján történt [380].

4.1.2.4 *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, Ancaster, Canada). Első lépésben 100 µL elfogó antitesttel (10 µg/mL) fedtük az ELISA lemezt (Thermo Labsystems, Waltham, MA), melyet egy éjszakán át inkubáltunk 4°C-on. A fedő puffer egy 50 mM-os karbonát-puffer volt, pH 9,6. Második lépésben, a fedő puffer leöntését követően, a lemezen fennmaradó kötőhelyek blokkolása történt blokkoló pufferrel, mely PBS-t (phosphate-buffered saline: 1,15 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄, 0,2 g KCl, 8,0 g NaCl 1 L-ben, pH 7,4) és 1 % BSA-t (bovine serum albumin) tartalmazott. 90 perces 20°C-on történő inkubációt követően háromszor mostuk a plate-et mosópufferrel, mely

PBS-ből és 0,1 % Tween-20-ból állt. Harmadik lépésben hozzáadtuk a plazma mintákat, melyeket előzőleg 1/200 arányban hígítottunk HBS mintahígító pufferrel (100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1% BSA, 0,1% Tween-20, pH 7,2). Ismét inkubáció és mosás után negyedik lépésben történt a második, peroxidázzal konjugált, 100 µL jelölő antitest (4 µg/mL) hozzáadása. Az ismételt inkubáció és mosás után, ötödik lépésként hozzáadtuk a rendszerhez az o-feniléndiamin szubsztátot. 15 perc elteltével a reakciót 50 µL 2 M-os kénsavval állítottuk le és 490 nm-en ELISA lemez olvasón (Thermo Labsystems iEMS plate reader) detektáltuk az abszorbanciákat. A teszt kalibrációja Siemens Standard Human Plasma-val történt, normál és patológiás kontrollként Siemens gyári plazmákat használtunk. Az eredmények értékelése és a referencia görbe felvétele a standard humán plazmából végzett hígítások abszorbancia értékeit felhasználva történt négyparaméteres logisztikus illesztést alkalmazva.

A FV és FXIII esetében thrombocytá lizátumból is megtörténtek az adott alvadási faktor aktivitás, illetve antigén koncentráció meghatározások. A mosott thrombocytá szuszpenziót a FV deficiens beteg esetében saját laboratóriumunkban, a FXIII deficiens betegek esetében útmutatásaink alapján a külföldi kórházak laboratóriumaiban végezték és utóbbi esetben szárazjégben szállították hozzánk [381]. PRP-t 0,18 µM prosztaglandin E1-et (PGE1) tartalmazó acid-citrát-dextrózzal antikoagulált vérből nyertünk 15 perces 120 g-vel történő centrifugálással. A PRP-ben lévő thrombocyták plazmától történő szeparálása 15 perces 1300 g centrifugálással történt. Ezt követően a vérlemezkéket reszuszpendáltuk az „A” oldatban (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,1 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, 0,5 mM NaH₂PO₄, 1 mg/ml glükóz, 10 mM HEPES, pH 7,4), mely tartalmazott 3,6 mg/ml BSA-t, 1 U/ml apirázt és 0,3 µM PGE1-t. 1100 g- vel történő, 15 perces centrifugálással ismét izoláltuk a thrombocytákat és reszuszpendáltuk az előzőekben leírt összetételű „A” oldatban. A vérlemezkéket ismét lecentrifugáltuk 1100 g- vel 15 percig, majd felvettük őket az „A” oldatban, mely most csak 1 U/ml apirázt tartalmazott. A thrombocytá számot a végleges szuszpenzióban 1000 G/L-re állítottuk be valamennyi mintában, a vérlemezkék lizálása Triton X-100 hozzáadásával (1%-os végkoncentráció) történt. A vérlemezkékből történő FV antigén szint meghatározás hasonlóan zajlott, mint plazma minták esetén. A kapott eredmények értékelése és a referencia görbe felvétele egészséges egyénektől nyert thrombocyták lizátumával történt. A hígításokkal mért abszorbancia értékek illesztését itt is négyparaméteres logisztikus módszerrel végeztük. A FXIII

meghatározásra külföldről kapott fagyasztott thrombocytaikat 1% Triton X-100-zal tártuk fel. A thrombocyta lizátumok fehérje koncentrációjának meghatározása a klasszikus BCA Protein Assay Reagents-sel (Pierce, oud-Beijerland, Hollandia) történt.

4.1.2.5 *Biokémiai vizsgálatok mutáns fehérjéken*

A vad típusú FX cDNS-t tartalmazó expressziós vektorból (FX-pCMV4) helyspecifikus mutagenézissel (QuickChange site-directed mutagenesis kit, Stratagene, La Jolla, CA) 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, Hilden, Németország) követően a vad típusú és mutáns plazmidok tranziens transzfektálása történt humán embrionális vese (HEK) 293 sejtekbe (Effectene transfection reagent, Qiagen). A DMEM (Dulbecco modified eagle's medium, Sigma) tápoldat 10% FCS-t (fetal calf serum, Invitrogen), 6 µg/ml K-vitamint és gentamycint tartalmazott. Hetvenkét óra inkubációt követően a tápfolyadékokat összegyűjtöttük, a sejtek egy részét fixáltuk konfokális lézer szkennig mikroszkópia (CLSM) kísérletekhez (ld. később), a sejtek másik részét lizáltuk detergenset és proteínáz gátlókat tartalmazó pufferben (50 mM Tris-HCl, pH7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0,5% Na-deoxikolát és Roche proteáz inhibitor koktél, összetétele: 2 µg/ml aprotinin, 5 mM EDTA, 4 mM Pefabloc, 1 µM pepstatin és 10 µg/ml leupeptin). E minták szolgálták kiindulásként az in vitro biokémiai vizsgálatainkhoz:

- A vad típusú és a mutáns FX-et tartalmazó tápfolyadékok és sejtizátumok FX koncentrációjának meghatározása ELISA-val (Diagnostic Stago).
- A vad típusú és a mutáns FX-et tartalmazó tápfolyadékok és sejtizátumok immunprecipitációja házilag biotinált kecske anti-humán FX antitesttel (Haematologic Technologies Inc, Vermont, VT) és streptavidin-agarózzal, az immunprecipitált mintákon Western-blot nyúl anti-humán FX antitesttel (Dako, Glostrup, Dánia) és Vectastain Elite ABC kit-tel (Vector Laboratories, Burlingame, CA) kemilumineszcens detektálással (ECL Plus; Amersham, Little Chalfont, UK). A Western-blot nem redukáló körülmények között zajlott.
- A vad típusú és mutáns FX fehérjék sorsának követése pulse-chase analízissel, melynek során a transzfektált HEK293 sejteket metionin-mentes tápfolyadékkal előinkubáltuk, majd 0,5 mCi/ml [³⁵S]metionint (Amersham) tartalmazó tápfolyadékkal kezeltük 30 percig. Normál tápfolyadékra váltva

további 30 perc inkubációt követően a tápfolyadékokat összegyűjtöttük, a sejteket arattuk és lizáltuk 30, 120 és 360 perc múlva. Az összegyűjtött mintákban immunprecipitációt követően SDS-PAGE (7,5%-os gélen) és fluorográfiás analízis történt a gél Amplify (Amersham) oldatba merítve, majd vákum-száritva, végül Hyperfilm-MP (Amersham)-re helyezve és -70°C -on inkubálva.

- A mutáns FX intracelluláris elhelyezkedésének vizsgálatára kettős immunofluoreszcens jelölés és CLSM alkalmazása: a transzfektált sejteket fixáltuk etanol-ecetsav elegyével (96%-1%), blokkoltuk 5% normál humán szérumot tartalmazó PBS-ben (pH7.4) 15 percig, a nem specifikus IgG kötődések megakadályozására. A FX-et jelöltük kecske anti-humán faktor X antitesttel (Haematologic Technologies, 1:40 hígításban, 1 óra inkubációval), biotinált anti-kecske IgG (Vector) és 1:250 hígításban, 30 perc inkubációval), Texas Red Streptavidin (Vector, 1:40 hígításban, 45 perc inkubációval) segítségével. Az endoplazmatikus retikulum jelölése egér monoklonális anti-kalnexin antitesttel (Abcam Ltd, Cambridge, UK, 1:10 hígításban 1 óra inkubációval) és fluoreszceinnel jelölt ló anti-egér IgG-vel (Vector, 1:40 hígításban, 45 perc inkubációval) történt. A cisz-Golgi festése nyúl anti-mannozidáz II antitesttel (Abcam, 1:10 hígításban, 1 óra inkubációval) és fluoreszcein-jelölt kecske anti-nyúl IgG-vel (Vector, 1:40 hígításban, 45 perc inkubációval) történt. A transz-Golgi, késői endoszóma jelölése egér monoklonális anti-mannóz 6-foszfát receptor antitesttel (Abcam, 1:10 hígításban, 1 óra inkubációval) és fluoreszcein-jelölt ló anti-egér IgG-vel (Vector, 1:40 hígításban, 45 perc inkubációval) történt. A reakciókat szobahőn végeztük, az antitesteket PBS-ben hígítottuk, illetve azt alkalmaztuk a tárgylemezek mosásához. Negatív kontrollként nem-immun antiszérumok identikus hígításait alkalmaztuk, és a primer antitesteket egér immunglobulin preparátumokkal helyettesítettük. Az indikátor reagensek specificitását előzetesen teszteltük az esetleges keresztreakciók kizárására. A festett sejt-preparátumokat DAPI-val fedtük (Vectashield DAPI mounting medium, Vector). Az analízist CLSM-mel (LSM 410, Zeiss, Oberkochen, Németország) végeztük. A fluoreszcens festékeket 488 nm Ar és 545 nm HeNe lézerekkel gerjesztettük, az emittált fényt 510-525 nm bandpass és 570 nm longpass

filterekkel detektáltuk. A FX intracelluláris relatív mennyiségét meghatároztuk integrált fluoreszcencia intenzitás méréssel 150-200 sejtben tárgylemezenként.

4.1.2.6 *In silico* analízisek

A FV esetében a mutáció (egy H α hidrogén helyettesítése egy nagy kiterjedésű poláris oldallánccal) szterikus következményeinek feltárására állandó részecskeszám, nyomás és hőmérséklet mellett, az Orban által közölt szerkezetből kiindulva, rövid (20 ns) molekuladinamikai szimuláció történt [382]. A szimuláció OPLS-AA („optimized potentials for liquid simulations- all atoms”) erőter, TIP3P explicit vízmodell és periodikus határfeltétel alkalmazásával történt. A nagy hatótávolságú elektrosztatikus kölcsönhatás számolása PME (Particle Mesh Ewald) közelítéssel történt [383]. A FX esetében a szimulációkat a (des1-45) egyláncú FX szerkezetben végeztük el [113,384]. 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 (van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, et al. Groningen Machine for Chemical Simulations (GroMaCS) version 3.3, <http://www.gromacs.org>) végeztük, az eredmények vizualizálására a VMD (Visual Molecular Dynamics) programcsomagot használtuk [385]. Az *in silico* analíziseket a FV és FX mutációk esetében néhai Komáromi István kollégám végezte.

4.1.3 Etikai engedélyek

A haemorrhagias diathesisekkel kapcsolatos munka a Helsinki deklarációval és a hatályos etikai irányelvekkel összhangban történt. A betegek tájékozott beleegyezésüket adták a mintavételekhez. Etikai engedélyek: DEOEC RKEB/IKEB 2212-2004, 2354-2005 és 2494-2008 (FV, FX és FXIII deficienciák), 28676-7/2017/EÜIG (vWD, HHT és fibrinogén rendellenességek).

4.2 Vizsgálatok ritka thrombophiliákban

4.2.1 Betegek

4.2.1.1 *Antitrombin deficiencia*

Az AT deficienciákkal kapcsolatos kutatásaink 17 éves múltra nyúlnak vissza, amikor 2007-ben az első beteg bevonása történt. Az azóta eltelt idő alatt AT deficiencia adatbázisunk hatalmasra duzzadt és jelenleg több mint 500 beteg klinikai, laboratóriumi adatait tartalmazza, ami e ritka betegségben nemzetközi vonatkozásban is kiemelkedően magas elemszámot jelent. Az értekezésben azonban csak azokat a betegeket és betegszámokat említem, melyek a megalapozó közleményekben szerepelnek.

- Alapító hatás igazolása AT deficienciában és az AT deficiencia klinikai-laboratóriumi-genetikai jellemzése.

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. A thromboticus események diagnózisának csak azt fogadtuk el, ha az a Nemzetközi Thrombosis és Hemosztázis társaság ajánlása alapján történt [386]. Ezen elvek alapján 2007-2016 között 156 egymással nem rokon AT deficiens egyén és családtagjaik (összesen 246 személy) kerültek bevonásra.

Az AT deficiencia adatbázisba, melyet 2007-ben hoztunk létre, a klinikai, laboratóriumi és a molekuláris genetikai adatokat folyamatosan rögzítettük. A demográfiai adatokon túl, a thrombosis típusa (vénás, artériás események, szülészeti komplikációk), a thrombosisok veleszületett (pl. vascularis anomáliák, öröklött thrombophiliák), szerzett kockázati tényezői, illetve provokáló tényezői kerültek bevitelre. Provokáló tényezőnek tekintettük, ha egy hónappal a thrombosis megelőzően fordult elő trauma, műtét, akut betegség, centrális véna katéterezés, immobilizáció, terhesség, orális fogamzásgátló szedése, hormonális kezelés, hosszabb utazás, vagy L-aszparagináz kezelés. Szerzett rizikófaktornak tekintettük a krónikus állapotokat, így a daganatos megbetegedést, a paroxysmalis nocturnalis haemoglobinuriát, az autoimmun betegségeket, az antiphospholipid szindrómát, az elhízást (BMI >30), a visszeres vénákat, a nephrosis szindrómát, a szívelégtelenséget, a tartós immobilizációt. Amennyiben a thrombosis megelőzően provokáló tényező,

vagy krónikusan fennálló szerzett tényező nem volt kimutatható, nem provokált thrombosisnak minősítettük az eseményt. Regisztráltuk a thrombosisok számát, a beteg életkorát az első thrombosis idején, a tüdőembólia kialakulását, az artériás esemény típusát – ha volt myocardialis infarctus (MI) vagy stroke –, 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 tartalmazzák. 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 népességre reprezentatív, ún. populációs kontroll személyek DNS mintái a Háziorvosi Morbiditási Adatgyűjtési Program (HMAP)-ból származtak [376].

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 még csak a trombin-alapú heparin kofaktor amidolitikus tesztet hasonlítottuk össze a FXa-alapú teszttel. Ezt követően, a munkacsoportunk által fejlesztett FXa-alapú, heparin kofaktor és progresszív AT aktivitás meghatározására egyaránt alkalmas funkcionális amidolitikus esszét (részleteiben ld. a módszertani fejezetben) n=78 AT deficiens személy plazma mintáin teszteltük. A vizsgálatba olyan személyek mintái kerültek, ahol a genotípus, azaz az AT deficiencia pontos típusa is ismert volt. A módszer referencia tartományának meghatározásához n=188 egészséges személy plazma mintáit használtuk; e személyeket munkacsoportunk toborozta. E referencia csoportot n=104 nő, n=84 férfi alkotta, medián életkoruk 34 év (IQR 26-41) volt. Kizárási kritériumnak tekintettük az artériás és vénás thromboticus eseményeket az anamnesisben, az orális fogamzásgátló szedését és a terhességet a mintavétel idején, illetve 3 hónapon belül. Végül, 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.

- Az alapító ATBp3 mutáció (p.Leu131Phe) korának és eredetének meghatározása: genetikai epidemiológiai vizsgálatok

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 nagy, n=1000 főből álló, a magyarországi általános populációt reprezentáló csoport (medián életkor 55 év, tartomány 29-102 év; férfi/nő arány 46,6%/53,4%) DNS mintái a Háziorvosi Morbiditási Adatgyűjtési Program (HMAP)-ból származtak [376]. Egy másik, n=1185 főből álló és a magyarországi általános roma populációt reprezentáló személyek (medián életkor 40 év, tartomány 18-87 év; férfi/nő arány 41%/59%) DNS mintái a Népegészségügyi Iskola kutatóinak jóvoltából szintén rendelkezésünkre álltak [387]. E két mintát tekintettük populáció szintű referencia mintáknak.

Megerősítő epidemiológiai vizsgálatunkhoz n=450 (medián életkor 34 év, tartomány 18-68 év, férfi/nő arány 38,6%/61,4%) cardiovascularis betegségekben nem szenvedő, magát egészségesnek valló személy toborzásával ún. egészséges magyarországi referencia csoportot képeztünk. Esetükben egyedül enyhe/közepes hypertonia (RR 145/90-165/95 Hgmm) volt megengedett, minden más krónikus betegség kizárási kritérium volt. Roma személyek (n=402, medián életkor 44 év, tartomány 18-77 év, férfi/nő arány 26,6%/73,4%) mintái képezték a megerősítő vizsgálat roma általános populációt reprezentáló mintáit, ahol a mintagyűjtés az eredeti, nagy roma populáció toborzásának helyszínével megegyezett (északkelet-magyarországi szegregált roma települések).

- A IIHBS AT deficiencia és a cardiovascularis 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, medián életkor 36 év, férfi/nő arány 79%/21%). Az életkor megválasztását (fiatal betegek bevonását) 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. Ezt a gondolatot egy fiatal, 15 éves betegünk esete is támogatta, akinél coronarographiával egyébként ép coronariák mellett a bal anterior leszálló coronariában okklúzív thrombus jelenlétét detektáltuk. A fiatalember 20 hónappal később ischaemias stroke-ot szenvedett folyamatos anti-thrombocytá terápia mellett. Ekkor a jobb oldali a. cerebri media bifurkációjánál találtak részleges elzáródást a CT vizsgálat során. A transesophagealis UH vizsgálat a stroke cardialis eredetét kizárta. Ezt követően a beteget kettős gátlásra (anti-thrombocytá és antikoaguláns terápia) állították, amit folyamatosan azóta is szed és tudomásunk szerint a thromboticus események a mai napig nem ismétlődtek. E betegnél a körültekintő laboratóriumi vizsgálataink során egy csupán közepes mértékben emelkedett Lp(a) mellett AT deficienciát (AT Basel variáns, p.Pro73Leu) detektáltunk, de klasszikus cardiovascularis kockázati tényező jelenlétét nem lehetett igazolni. A betegnek vénás thrombosisa soha nem volt.

Az MI csoportba kerülő betegeknél az MI diagnózisa az érvényes irányelvek szerint történt, vagyis biomarkerek detektálásán, klinikai tünetek meglétén, karakterisztikus EKG eltérések regisztrálásán, illetve coronaria thrombus jelenlétének igazolásán [388]. Korban illesztett klinikai kontroll csoportot is képeztünk (n=101, medián életkor 36 év, férfi/nő arány 59%/41%), akik szívkatéterezésen estek át, de coronaria betegség nem igazolódott és MI sem szerepelt az anamnesisben. A coronarographia indikációja esetükben a stabil angina pectoris klinikai gyanúja volt, mivel legalább egy, a myocardialis ischaemiát vizsgáló nem invazív tesztben pozitív eredményt mutattak. E vizsgálati populációt a munkacsoportunk egy korábbi közleményében már részletesen jellemeztük, ez a közlemény nem képezi az értekezés alapját [389].

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%). A thrombosis diagnózisa és jellemzése az ISTH elvek szerint történt (ld. e fejezetben fentebb).

- Az ATBp3 homozigóta hordozása és a vena cava inferior atresia együttes előfordulásának vizsgálata

Ezt a tanulmányt a spanyol, Javier Corral professzor által vezetett munkacsoporttal (Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Universitario Morales Meseguer, Centro Regional de Hemodonación, Universidad de Murcia) 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, a több évtizedes, precízen vezetett adatbázisainknak köszönhetően. 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. (Így kaptuk a n=61 ATBp3 homozigóta esetszámot.) Az abdominalis vascularis status mellett rögzítettük az egyéb veleszületett thrombophilia tényezőket (PC, PS deficienciák, FV Leiden, FII 20210A), illetve az antiphospholipid szindróma laboratóriumi paramétereinek pozitivitását (amennyiben igazolódott). A betegek klinikai kórtörténetében a thromboticus eseményeket, thrombosis kiváltó provokáló tényezőket szintén összegyűjtöttük.

- Az új, AT Debrecen mutáció karakterizálása és további, új mutációk biokémiai vizsgálata

Egy nagy, négy generációs családban diagnosztizáltunk AT deficienciát, melynek háttérében új mutációt igazoltunk (p.Leu205Pro, ld. később). A proband és elsőfokú rokonainak klinikai eseményeit (első thrombosis megjelenése, rekurrens események, artériás, vagy vénás thrombosisok, provokáló tényezők, vagy szerzett kockázati tényezők jelenléte, szülészeti komplikációk az anamnesisben, antikoaguláns kezelésre vonatkozó információk) és laboratóriumi paramétereit (egyéb veleszületett thrombophilia tényezők, antifoszfolipid szindróma laboratóriumi paramétereit) feltérképeztük és rögzítettük. 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. A betegek (összesen n=15) heterozigóták voltak ezekre az új mutációkra nézve (klinikai és laboratóriumi jellemzőiket részletesen az „eredmények” fejezetben foglaljuk össze). Két beteg (apa és fia) hordozta a c.41G>A (p.Arg14Lys) mutációt. A fiatalabb beteg 16 éves korában szenvedett el mélyvénás thrombosiszt, újabb eseménye azóta nem volt. Az apa anamnesisében nem szerepel thrombosis. A második mutációt (c.95G>A, p.Cys32Tyr) egy nőbeteg hordozza, akinek összesen három thromboticus klinikai eseménye volt, elsőt 20 évesen terhesség alatt szenvedte el. A harmadik mutáció (c.232C>G, p.Arg78Gly), ami az AT heparin kötő helyét érinti egy fiatal nőbetegnél volt kimutatható, thrombosisa nem volt. A negyedik mutáció (c.362T>G, p.Met121Arg) érintettje egy fiatal nőbeteg, aki 34 évesen szenvedett el MVT-t. Az ötödik mutáció (c.734T>C, p.Leu245Pro) hordozója egy férfi beteg, aki 42 évesen kapott proximális MVT-t. A hatodik mutációt (c.807delT, p.Leu270Argfs*14) egy férfi betegnél diagnosztizáltuk, aki ötször szenvedett el MVT-t, az elsőt 16 évesen. A hetedik mutáció (c.1349A>T, p.Asn450Ile) hordozója egy négytagú család, akik közül ketten szenvedtek el MVT-t 23 és 40 éves életkorban. A nyolcadik mutációt (c.1367-1368del, c.1367-1371ins, p.Gly456delins_Ala-Thr) egy nőbetegben azonosítottuk, aki 27 évesen terhessége alatt szenvedett el MVT-t, amit egy második (kiváltó ok nélküli) követett 5 év múlva. Végül, a kilencedik mutációt (c.1384C>A, p.Pro461Thr) három, nem rokon betegnél is kimutattuk. Az egyikük nem provokált thrombosiszt szenvedett el 62 évesen, a másik két beteg sokkal fiatalabb volt az MVT idején, az események provokált thrombosisok voltak.

4.2.1.2 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, akinél hydrocephalust detektáltak a terhesség 33. hetében végzett ultrahanggal. Az aquaductus Sylvii elzáródását MR vizsgálattal megerősítették a születés után és subgalealis shunt-öt ültettek be. Az újszülött súlyos cyanosisát és mindkét láb duzzanatát észlelték. Infekció lehetőségét a laboratóriumi vizsgálatokkal kizárták, a hemosztázis vizsgálatok során azonban súlyos consumptios coagulopathia

derült ki. A második életnapon purpura fulminans jelent meg a lábakon és még ezen a napon a súlyos PC deficiencia diagnózisát felállítottuk a detektálhatatlanul alacsony PC aktivitás alapján. Azonnal friss fagyasztott plazma, majd LMWH-warfarin indult (PC koncentrációjuk ekkor nem volt elérhető). Átmeneti javulást követően több ízben necrectomiát igénylő dermalis vascularis thrombosis alakult ki, majd az egyik lábujj resectiojára is sor került ischaemias necrosis miatt. Szemészeti vizsgálattal mindkét oldali retinaleválást találtak. Három hónapos korban súlyos veseelégtelenség alakult ki a bal vese atrophijával és mindkét oldali vese csökkent vascularisációjával. Ezt követően ARDS alakult ki, ami uralhatatlan volt és végül a beteg halálához vezetett. 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, de ismert, hogy a beteg édesanyjának 38 éves korában volt bal lábszár mély vénás thrombosisa, fiútestvérének pedig 35 éves korában bal oldali femoropoplitealis thrombosisa, 44 éves korban pedig jobb oldali v. femoralis thrombosisa volt, melyhez tüdőembolia is társult), felmerült veleszületett thrombophilia lehetősége. A betegnél 42 éves korában FV Leiden heterozigóta állapotot (APC rezisztencia), alacsony PC aktivitást és antigén koncentrációt találtunk, enyhén emelkedett Lp(a) és tranziensen emelkedett antikardiolipin és anti-beta 2 glikoprotein I antitestekkel. Negyvennégy éves korában colitis ulcerosát állapítottak meg. A beteg a vizsgálataink idején K-vitamin antagonistá terápiaiban részesült. A beteg két lánytestvére (30 és 33 évesek) tünetmentesek voltak.

4.2.2 A ritka thrombophiliák laboratóriumi vizsgálata

4.2.2.1 *Rutin laboratóriumi és hemosztazeológiai módszerek*

A betegektől vénás vérvétel történt – a haemorrhagias diathesisekkel kapcsolatos fejezetben leírtak szerint – 0,109 M citrátos vakutainer csövekbe, valamint natív vérvételi csövekbe. A vérvételek időpontját úgy választottuk meg, hogy az akut fázis reakció lecsengése után, azaz egy adott akut esemény (thrombosis, MI, stroke stb.) után legalább 3 hó elteltével történtek. A szeparált thrombocytá szegény plazmát -80°C-on tároltuk a mérések elvégzéséig. 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 Staclo PC (Diagnostica Stago) reagenssel tettük. A PC antigén szint meghatározása ELISA módszerrel (Diagnostica Stago, Asserachrom Protein C) történt. A szabad Protein S antigén koncentrációt Siemens Innovance free PS reagenssel mértük. Az antiphospholipid szindróma laboratóriumi kritériumainak regisztrálásához a lupus anticoagulans kimutatása a rutin laboratóriumi protokollunknak megfelelően Russel vipera méreg-idő alapú és szilika aktivátort tartalmazó APTI alapú tesztekkel rutin protokoll szerint történt (Werfen és Diagnostica Stago reagensek), az antifoszfolipid antitestek kimutatása Werfen Accustar készüléken Quanta Flash reagensekkel történt. A FVLeiden (rs6025) és protrombin 20210A (rs1799963) polimorfizmusok detektálása LightCycler 480 (Roche, Mannheim, Németország) készülékben, valós idejű PCR-t követő olvadáspont görbe analízis módszerével történt. A szérumból végzett laboratóriumi meghatározások Roche reagensekkel és automatákon történtek rutin klinikai kémiai módszerekkel.

4.2.2.2 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 módszert azóta a rutin laboratóriumi diagnosztika számára is elérhetővé tettük és Labexpert Antithrombin H+P kit néven

kereskedelmi forgalomban kapható (Labexpert Kft, Debrecen, Magyarország). A tesztben a vizsgálandó plazmát 1:50 arányban előhígítjuk 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4) pufferben, majd 1000 U/L heparin jelenlétében hozzáadjuk a bovin eredetű tisztított FXa-t és 60 sec inkubációs idő után detektáljuk a maradék FXa aktivitást BIOPHEN CS-11 (Suc-Ile-Gly-(γ Pip)Gly-Arg-pNA, HCl) kromogén szubsztrát hozzáadásával 405 nm-en. E teszt és a nagyobb világcégek kereskedelmi forgalomban kapható hc-anti-FXa reagensének összehasonlítását mutatja az alábbi táblázat, melyben kiemelendő, hogy a tesztek elsősorban heparin tartalmukban, a minta előhígításának mértékében, az inkubációs idő hosszában és a reakció pH körülményeiben különböznek [390]. (II. Táblázat)

II. Táblázat. A kereskedelmi forgalomban elérhető hc-anti-FXa reagensek összehasonlítása.

teszt	enzim eredete	Inkubációs idő	Heparin koncentráció	Kromogén szubsztrát	Minta előhígítás	Hígító puffer	Minta végső hígulása
Siemens Innovance AT	Humán FXa	180-190 sec	1500 U/L	Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBA-metilamid-acetát	1:4	Tris/HCl, pH8,0	1:20
HemosIL Liquid AT	Bovin FXa	100-140 sec	3000 U/L	S-2765§	1:40	0,15M NaCl	1:120
Chromogenic Coamatic AT	Bovin FXa	100-140 sec	5000 U/L	S2765§	1:121	0,15M NaCl	1:484
Hyphen Biophen AT	Bovin FXa	60 sec	NA	BIOPHEN CS-11§§	1:20	0,15M NaCl	1:170
Labexpert AT H+P	Bovin FXa	60 sec	1000 U/L	BIOPHEN CS-11§§	1:50	Tris/HCl, pH8,4	1:150

§S-2765: *N*-alfa-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNa.2HCl; §§BIOPHEN CS-11: Suc-Ile-Gly(γ Pip)Gly-Arg-pNA.HCl (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. közleményünk alapján.)

A fenti táblázat utolsó sorában szerepel a munkacsoportunk által kidolgozott reagens. Az AT deficiencia laboratóriumi diagnosztikájában alkalmazható tesztek evaluációja során mi az általunk kidolgozott teszt mellett a fenti táblázatban szereplő Siemens Innovance AT és HemosIL Liquid AT reagenset használtuk.

Az általunk kidolgozott 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 (10 mg/L), a vizsgálandó minta előhígítása 50-szeres helyett csupán 5-szörös, valamint a FXa-val történő inkubációs idő a hc-anti-FXa tesztben alkalmazott ötszöröse. A mérési protokoll p-anti-FXa teszt esetén röviden a következő: 10 μ L citráttal alvadásgátolt thrombocytaszegény plazma mintát ötszörös előhígítást (40 μ L 50 mmol/L pH 8.4 Tris-HCl pufferben, ami 175 mmol/L NaCl-t, 7,5 mol/L EDTA-t és 10 mg/L polibrént tartalmaz) követően 50 μ L 12 nkat/mL FXa-val inkubáljuk 300 másodpercig 37 °C-on. Ezt követően 50 μ L 1,25 mg/mL BIOPHEN CS-11 kromogén szubsztrátot adunk a rendszerhez és a felszabadult pNA által kiváltott abszorbancia változást detektáljuk 405 nm-en 60 másodpercig. A $\Delta A/\text{min}$ értékeket kalibrációs görbe alapján AT aktivitás értékké konvertáljuk. A kalibrációs görbét ismert AT aktivitású és kereskedelmi forgalomban kapható liofilizált plazmára készítjük el, amit a tanulmány kedvéért a referencia populációnk hc-anti-FXa és p-anti-FXa értékeinek átlagait 100%-nak tekintve, újrakalibráltunk. A hc-anti-FXa teszt esetében a gyári kalibrációs plazma célértéke mindössze +2% eltérést jelentett a házilag kalibrált értékhez képest. Mivel a p-anti-FXa teszt esetében nem létezik gyári kalibrációs plazma célértékkel ellátva, ott a házilag kalibrált értékkel vettük figyelembe a kalibrációs plazma AT aktivitás értékeit a kalibrációs görbe elkészítése során.

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. A kontroll plazmákat naponta duplikátumban mértük 20 napon át. A hemolízis, icterus és lipémiából adódó interferencia meghatározására a plazma mintákat kiegészítettük vörösvérsejt lizátummal, koncentrált bilirubin oldattal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), illetve Intralipid oldattal (Baxter, Deerfield Park, IL, USA) a CLSI C56-A iránymutatása szerint. Annak meghatározására, hogy a p-anti-FXa aktivitás mekkora hányada származhat aspecifikus enzimaktivitásból (azaz nem AT aktivitásból, hanem a FXa-t gátló egyéb, plazmában jelenlévő proteinektől) az AT aktivitást, vagyis a p-anti-FXa meghatározást elvégeztük AT deficiens plazmában (Enzyme Research Laboratories, Swansea, UK), 2,0 mg/mL tisztított α 1-antitripszin és α 2-makroglobulin (Sigma-Aldrich) jelenlétében is.

A tesztjeink referencia tartományát a CLSI EP28-A3c iránymutatása alapján határoztuk meg n=188 egészséges személy (férfiak aránya 45%, median életkor 34 év,

IQR 26-41 év). A referencia tartomány nemek szerinti megosztásának szükségességét a z-statisztika és az SD értékek aránya alapján döntöttük el. Az AT aktivitás értékek eloszlását a Kolmogorov-Smirnov teszttel Lilliefors korrekcióval és Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltuk. A vizsgált személyek különböző alcsoportjai között az AT aktivitás értékek különbségét Student-féle t-próbával vizsgáltuk. Az eredmények vizualizálására a GraphPad Prosm 5.0 szoftvert használtuk (La Jolla, CA, USA).

4.2.2.3 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 analizátoron (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA), a szekvencia elemzés a Sequencing Analysis 5.4 szoftverrel történt, ahol vizsgáltuk a kódoló régiókat, az exon-intron határokat és a promoter régiókat is. A Sanger szekvenálással negatív esetekben MLPA vizsgálatot végeztünk (MRC-Holland, Amsterdam, Hollandia) SALSA MLPA KIT P227 (MRC-Holland, Amsterdam, Hollandia) 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, így azok ismertetését itt nem ismétlem.

Az ATBp3 mutáció vizsgálatára bevezettük a valós idejű PCR-t követő olvadáspont görbe analízis módszerét is LightCycler 480 készüléken, a nagy mintaszámon történő gyorsabb mutáció detektálás érdekében (az itt alkalmazott oligonukleotid primerek és próbák szekvenciáit a **III. Táblázat** tartalmazza a későbbiekben ismertetett SNP-k szekvenciáival együtt).

zsbereczky_271_24

III. Táblázat. Az Antitrombin Budapest 3 mutáció LightCycler 480 készüléken történő kimutatására tervezett oligonukleotid primerek és próbák, valamint a mutáció alapító hatásának vizsgálatára tervezett oligonukleotid primerek és próbák szekvenciái.

Genetikai marker	Primer típusa	Bázissorrend (5' - 3')	Jelölés típusa	T _{an} (°C)	Fragment mérete (bp)
AT Bp3 (c.391C>T)	F	GGCAGATTCCAAGAATGACA		53	197
	S	CAGTTGCTGGAGGGTGTCTTA	FL		
	A	AGGCACCCAGCTTGGTCATA	LCRed610-PH		
	R	TGAGGAATCATTGGACTTGG			
rs2227596 (c.42-736 A>G) MAF 0,205	F	GTGGAAGTGTCCAGCAAATAG		57	262
	S	TGCACTCCAACCTGGGTGACA	FL		
	A	AGTGAGACTGTGTCTCAAAACAGCAA	LCRed610-PH		
	R	CTAGTAGCTTGGGACTACAGGTG			
rs941989 (c.409-719 G>A) MAF 0,332	F	GTACTTCCATATCACTCATGTCTCTG		57	251
	S	CAAAAGCTTGGTGCTGAATCTCTCT	FL		
	A	TTCTCCAGAGAGATTCAGTCTCACCC	LCRed670-PH		
	R	GCCTATTGGAGCAAAATCAG			
rs2227612 (c.1218+1187 A>C) MAF 0,133	F	CTCATGGGAGATGAACAGTACACAC		57	361
	S	TAATACTGCTGTTGGTCCATAGTTTAGTGT	FL		
	A	TACTTGAGAACCAGAAGTTCCACAGG	LCRed610-PH		
	R	TACTTGAGAACCAGAAGTTCCACAGG			
rs1799876 (c.1153+279 T>C) MAF 0,336	F	AGGGAAGTTTGTCTTGGATCT		58	178
	S	ATGGGCCCCAGCTAGCACTG	FL		
	A	TGCCCTGTGAGTCTGTATCAGGT	LCRed610-PH		
	R	CAGTGAGGCCTGTGTAATGG			
rs677 (c.1218+27 G>C) MAF 0,16	F	GGCCGAGATGACCTCTATGT		56	217
	S	CCTTTCTGTACCCTAAGAGAGTGGG	FL		
	A	AAGGTGTACTCACCTCAAGAAATGC	LCRed670-PH		
	R	GAAGGCAGAACAATCACACC			

F – forward primer; R – reverz primer; A – anchor próba; S – sensor próba; FL – Fluorescein; PH – foszfát; T_{an} – annealing hőmérséklet; a vastag betűvel szedett aláhúzott betűk a vizsgált SNP-re komplementer nukleotidokat jelölik; MAF-minor allél frekvencia érték

4.2.2.4 Speciális genetikai vizsgálatok antitrombin deficienciában

- Az ATBp3 mutáció alapító hatásának vizsgálata

Az ATBp3 mutáció alapító hatásának vizsgálatához 5 SNP-t vizsgáltunk valós idejű PCR-t követő olvadáspont görbe analízissel. Az alkalmazott primereket és fluoreszcensen jelölt próbák szekvenciáit a **III. táblázat** tartalmazza. A primereket az Integrated DNA Technologies-től (Leuven, Belgium), a hibridizációs próbákat a Kromat Kft-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A PCR protokollokat magunk állítottuk össze Genotyping Master (Roche) kitét alkalmazva. A módszert fluoreszcens direkt szekvenálással validáltuk.

A *SERPINC1* gén ötödik exonjában található két, aminosavcserével nem járó eltérést (rs5877, c.981A>G, p.Val327= és rs5878, c.1011A>G, p.Glu337=) is analizáltunk az alapító hatás vizsgálata során. Előbbi MAF értéke 0,326, utóbbié 0,332. A genotipizálás az 5. exon fluoreszcens direkt szekvenálásával történt az ATBp3 mutációhordozók, családtagjaik és a kontroll személyek esetében.

Elvégeztük továbbá a *SERPINC1* gén kezdőkodonja előtt 345 bázispárnyira elhelyezkedő, egy 32 és/vagy 108 bázispárból álló nem homológ szekvencia, ún. 5' hossz polimorfizmus (5'LP, rs3138521, MAF 0,21) vizsgálatát is PCR-t követő agaróz gél elektroforézissel (forward (5'-GTGTTTTCCTTGTCTGTGCCAG-3') és reverz primer (5'-TTGGAGGTCATTCCTTGTAGTC-3'); Integrated DNA Technologies).

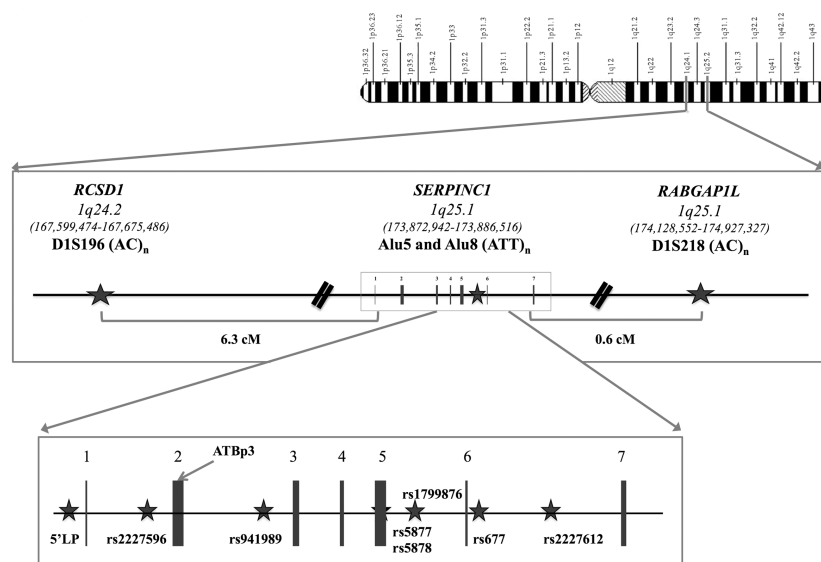
Az egy pontos nukleinsav polimorfizmusok, illetve 5' hossz polimorfizmus mellett öt rövid tandem ismétlődő szekvencia (short tandem repeats, STR) analízisét is elvégeztük. Ezek a következők voltak: *SERPINC1* Alu5 és Alu8, D1S196, D1S218 és a *F13A1* (utóbbi negatív kontrollként szerepelt). A markerek az 1q24.2-1q25.1 régióban, a *SERPINC1* génen belül, illetve attól proximálisan és disztálisan helyezkednek el. Az *F13A1* a 6p25.3 régióban található. A markerek detektálásához és azonosításához multiplex PCR reakciókat állítottunk össze, melyben fluoreszcensen jelzett oligonukleotidokat alkalmaztunk (**IV. Táblázat**). A felsokszorozott PCR termékekhez GeneScan™-500 LIZ™ méret standard és Hi-Di Formamide™ hozzáadása után kapilláris elektroforézist végeztünk ABI3130 genetikai analizátoron (Life Technologies) a DNS fragmentumok elválasztására. Az STR fragmentumok analízise a GeneMapper v4.1 szoftver (Life Technologies) segítségével valósult meg.

IV. Táblázat. Az Antitrombin Budapest 3 mutáció alapító hatásának vizsgálatokor az STR markerek analiziséhez használt oligonukleotidok és jellemzőik.

Genetikai marker	Primer típusa	Bázissorrend (5' - 3')	Jelölés típusa	T _{an} (°C)	Fragment mérete (bp)
Alu8	F	AAGCTGAAGCCTGAGAATGAAT	6FAM™	62	138-177
	R	GTTGCAGTGAGCCAAGATCA			
D1S196	F	TTGGGCCCTTATTACATACCAGA	PET™		271-287
	R	GATTTGGATTTCGTTACATGTTTCTCTT			
D1S218	F	CTGTTTATGTTATCACCAAGGCTTCT	VIC®		345-365
	R	TCGTGAAATGTAATCCTCATGAATAAC			
F13A1-STR	F	GAGGTTGCACTCCAGCCTTT	NED®	60	211-247
	R	GCCCCAAGGAAGATGAGTAAAC			
Alu5	F	GATATTAAGAGCTGGGGAAATGTG	6FAM™		172-183
	R	GGCATGAGAATCGCTTGAAC			

F: Forward primer; R: Reverz primer

Az ATBp3 mutáció alapító hatásának igazolására összesen tehát 7 SNP-t (rs677, rs1799876, rs2227596, rs941989, rs2227612, rs5877 és rs5878), az 5'LP-t és 4 STR markert (Alu5, Alu8, D1S196 és D1S218) vizsgáltunk, ezek elhelyezkedése az 1-es kromoszómán a **10. ábrán** látható.



10. ábra. Az Antitrombin Budapest 3 mutáció alapító hatásának igazolására vizsgált 12 polimorf genetikai marker elhelyezkedése a 1-es kromoszómán.

(Gindele, R., Oláh, Z., Ilonczai, P., Speker, M., Udvari, Á., Selmeczi, 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. közleményünk alapján.)

zsbereczky_271_24

Az rs677, rs1799876, rs2227596, rs941989, rs2227612, rs5877 és rs5878 és az 5'LP polimorf markerek genotipizálását követően haplotípusokat generáltunk a Haploview (<http://www.broadinstitute.org/haploview>) szoftver segítségével.

- Az ATBp3 alapító mutáció korának meghatározása

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 (Thermo Fisher Scientific) és GeneMapper v4.1 szoftverrel értékeltük ki azokat (Life Technologies). E markereket teszteltük n=200 kontroll személyen (a hazai referencia populációból kiválasztva), illetve n=94 roma személyen (a hazai roma referencia populációból kiválasztva). Az **V. Táblázat** szemlélteti az STR markerek detektálásához használt oligonukleotid primereket és tulajdonságaikat.

V. Táblázat. Az Antitrombin Budapest 3 alapító mutáció korának meghatározásához használt STR markerek analíziséhez használt oligonukleotidok és jellemzőik.

Genetikai marker	Primer típusa	Bázissorrend (5' - 3')	Jelölés típusa	T _{an} (°C)	Fragment mérete (bp)
D1S196	F	TTGGGCCCTTATTACATACCAGA	PET™	62	271-287
	R	GATTTGGATTTCGTTACATGTTTCTCTT			
D1S218	F	CTGTTTATGTTATCACCAAGGCTTCT	VIC®	62	345-365
	R	TCGTGAAATGTAATCCTCATGAATAAC			
D1S1165	F	CCTTCCATAGCTGATACTGCTG	6FAM™	64	390-470
	R	AGGCAACAGAGTGAGACTCCA			
D1S2815	F	CAGGATTTTGTAAACAGAGTGAAAA	NED®		290-370
	R	CTCCAAATCTAGTCACACTGGAAG			
D1S2790	F	AAAATGCTCATTAGTCCAGAAAGG	PET™		243-260
	R	TGTTTGGCTATGTTTTACTAGCTC			
D1S2659	F	CACAACCAAGTCCCAGATTTTAG	VIC®		190-220
	R	GGGAAGGTGTCAGAGTGAGTATT			
D1S212	F	ACAGCAAGACTCTGCCTCTACA	NED®		94-115
	R	CCAGGCTGATTTTGTGTATGTG			
D1S460	F	ATCAGGGTCAGGGTGACG	6FAM™		160-170
	R	AGCTCTGGCAAGTTGAAGGA			

F: Forward primer; R: Reverz primer

A v. cava rendszer atresia és az ATBp3 homozigóta állapot asszociációja kapcsán a spanyol munkacsoport betegeinél további hat STR marker detektálása történt (D1S431, D1S452, D1S2814, D1S2691, D1S2791 és D1S2751), ezeket a mi betegeinknél nem határoztuk meg.

4.2.2.5 *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 (p.Asp77Gly), c.C488A (p.Ala163Glu), c.C488T (p.Ala163Val) protein C-nek megfelelő vektorokat az ImaGenes cégtől szereztük be (Berlin, Németország), 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, Santa Clara, CA, USA) kit felhasználásával, helyspecifikus mutagenezissel állítottuk elő.

Az AT Debrecen (p.Leu205Pro), a kilenc új *SERPINC1*, valamint a PC mutációk biokémiai következményeinek vizsgálatához először tranziens transzfekciót végeztünk HEK293 sejtekben 6-lyukú lemezekben. A sejteket DMEM tápfolyadékban tenyésztettük 10% fetal calf serum, 2mM L-glutamin és 25 µg/mL gentamicin antibiotikum (Chinoin, Budapest) jelenlétében 37°C-on, 5% szén-dioxidot biztosító termosztátban. A PC esetében a tápfolyadék K-vitamint (Roche) is tartalmazott. A vad típusú, a p.Leu205Pro (AT Debrecen) és a kilenc új mutációt hordozó AT-nak megfelelő plazmidok transzfekcióját X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche), a vad típusú és mutáns PC plazmidok transzfektálását FuGENE HD (Roche) kit segítségével végeztük 2-2µg plazmid DNS felhasználásával, gyártó útmutatásai szerint. A lacZ gén kotranszfekcióját (pCMV Sport β-GAL plazmid, Invitrogen) szintén elvégeztük, annak érdekében, hogy a transzfekció hatásfokát 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 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0,5% Na-deoxikolsav, és proteáz inhibitor koktél (Roche) tartalmú oldatban. A mintákat -70°C-on tároltuk további felhasználásig. A transzfekció hatásfokát 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 is végeztünk HEK293 sejtekben Lipofectamine 3000 Transfection Kit-tel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Geneticin antibiotikumot (Gibco) használtunk szelekciós ágensként, optimalizálás után 400 µg/mL koncentrációban a tápfolyadékban. A sejteket 37°C-on, 5% szén-dioxid jelenlétében tenyésztettük DMEM tápfolyadékban. A vad típusú és mutáns antitrombinokat tartalmazó tápfolyadékot Amicon Ultra 30 kDa szűrőn (Merck Millipore, Burlington, VT, USA) koncentráltuk további felhasználás céljából.

4.2.2.6 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 expresszáló HEK293 sejtek lizátumában és tápfolyadékában meghatároztuk az AT koncentrációt ELISA módszerrel (AssayMax Human Antithrombin III ELISA kit, Assaypro, St. Charles, MO, USA, ill. Abcam Human-Antithrombin-III-ELISA-Kit, Abcam, Cambridge, UK). A sejtek tápfolyadékában meghatároztuk az AT amidolitikus aktivitását heparin jelenlétében és hiányában LX Antithrombin H+P reagenssel (Labexpert, Debrecen) mikrotitráló lemezben. A tesztben kisebb módosításokat hajtottunk végre, hogy alkalmazkodjunk a humán plazmától eltérő körülményekhez, elsősorban ahhoz, hogy az AT a plazmához képest nagyon kis mennyiségben állt rendelkezésre. A vizsgálandó mintát az eredeti teszt körülményekhez viszonyítva kisebb (1:6) végső hígításban alkalmaztuk, a hígítást pH 8,4 Tris-HCl pufferben végeztük, a heparin kofaktor (hc-antiFXa) meghatározás esetén 2 U/mL heparin jelenlétében. 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 (10%-os gélben) nem redukáló körülmények között történt. Az AT-t kecske anti-humán AT antitesttel detektáltuk (Affinity Biologicals, Ancaster, Canada), másodlagos antitestnek biotinált, nyúlban termeltetett anti-kecske IgG-t használtunk. Az immunreakciót Vectastain Elite ABC kit-tel erősítettük (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 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, Dublin, CA, USA). 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 antithrombin fehérjék esetében (N-Glycosidase F, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

A vad típusú, a IIHBS mutáns antitrombinok és a kilenc új AT mutáns közül azok, 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 Sepharose 4B gélhez kovalensen kötött kecske anti-humán antitrombin IgG (Affinity Biologicals, Ancaster, ON, Kanada) felhasználásával.

A plazma mintákban a keresztezett immunelektroforézis (CIE) során az első elektroforézist 150 V-on 60 percig 1%-os agaróz gélben végeztük 16,3 U/mL nem frakcionált Na-heparin jelenlétében. A második dimenzióban történő elektroforézist 100 V-on 180 percig végeztük 1%-os agarózban 1% nyúl anti-humán antitrombin antiszérum (Sigma, Saint Louis, MO, USA) 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, Uppsala, Svédország). Ehhez heparinnal fedett szenzor chip-et használtunk (Heparin Approx. 50 nm hydrogel chip, XanTec bioanalytics GmbH, Düsseldorf, Németország). Mivel a chip négy cellát tartalmazott, így a vad típusú és a három rekombináns IIHBS mutáns (ATBp3, AT Basel, AT Padua) AT-t egyszerre, ugyanazon a chip-en, ugyanolyan körülmények között tudtuk vizsgálni. A reakció során 90 µL, futtató pufferben (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005% (v/v) surfactant, pH

8,4) hígított AT-t injektáltunk a cellákba, hat különböző koncentrációban (50, 100, 150, 300, 500 és 750 nM). Az átfolyási sebesség 10 $\mu\text{L}/\text{perc}$ volt. A chip-et két mérés között 30 μL regeneráló pufferrel (10 mM glicin-HCl, pH 2,5, GE Healthcare) kezeltük. Az SPR görbék illesztése Langmuir 1:1 kötődési modellel történt, 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 GmbH, München, Németország). Röviden, a módszer a fehérjék triptofánjának fluoreszcencia intenzitását méri, aminek maximuma a fehérjék letekeredése (unfolding) során eltolódik 330 nm-ről 350 nm-re. Egy adott fehérje hőstabilitása megadható annak T_m értékével, mely hőmérséklet mellett a fehérje populáció fele letekeredett állapotban van. A hőstabilitás a T_{onset} értékkel is jellemezhető, ami azt a hőmérsékletet mutatja, melyen a denaturáció kezdődik. A vizsgálat során a mintákat 10 μL térfogatban (8 μM) üveg kapillárisba töltöttük, majd 20 °C-ról 95 °C-ra melegítettük azokat, 1°C/perc sebességgel. A T_m és T_{onset} értékeket PR ThermControl v2.1.2 szoftverrel (NanoTemper Technologies) határoztuk meg, a 350/330 nm fluoreszcencia arány vs. hőmérséklet első deriváltjából származó olvadási görbék alapján.

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 nátrium dodecil szulfát poliakrilamid gél elektroforézist (SDS-PAGE, 5-20% grádiens) végeztünk nem redukáló körülmények között és a géleket polivinilidén difluorid (PVDF) membránra elektroblottoltuk, majd 3% zselatinnal blokkoltuk 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,5 körülmények között. A PC-t birka anti-humán PC antitesttel (Haematologic Technologies, Essex Junction, VT) detektáltuk, az antitestet 2000-szeres hígításban használtuk. Az immunreakciót anti-birka immunglobulint 1000-szeres hígításban tartalmazó Vectastain Elite ABC kit-tel (Vector Laboratories, Burlingame, CA)

viteleztük ki és 3,3'-diaminobenzidin (DAB) (Invitrogen) segítségével tettük láthatóvá. A Western-blottot elvégeztük a sejtízátumokban 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 (Diagnostic Stago) fogtuk ki, a poliubikvitint torna peroxidázzal konjugált anti-poliubikvitin monoklonális antitesttel (CycLex Co. Ltd., Ina, Nagano, Japán) detektáltuk. A reakciót tetrametilbenzidin (TMB) szubsztrát hozzáadásával tettük láthatóvá, az optikai denzitást 450 nm-en olvastuk le mikroplate olvasóban. A mutáns fehérjék poliubikvitináltságát az OD értékek PC antigén szintre történő normalizálása után határoztuk meg minden sejtízátumban és a mutáns:vad típusú poliubikvitinált PC arányaként adtuk meg.

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

Az intracelluláris AT és PC lokalizációjára immunfestést követő konfokális lézer szkennning mikroszkópiát (CLSM) végeztünk. A 96% etanolban és 1% ecetsavban fixált vad típusú, illetve mutáns AT (p.Leu205Pro) és mindhárom PC mutáns fehérjét tartalmazó HEK293 sejteket 5% normál humán szérummal inkubáltuk foszfát puffer oldatban 15 percig a nem specifikus IgG kötések megakadályozására, majd az AT jelölésére kecske anti-humán AT antitestet (Affinity Biologicals) használtunk 1:400 hígításban 60 percig. Második antitestként pedig FITC-konjugált anti-kecske IgG-t alkalmaztunk (Vector) 1:100 hígításban 45 percig. A PC esetében nyúl anti-humán PC antitestet (Sigma-Aldrich) 1:100 hígításban adtunk a mintákhoz és inkubáltuk 60 percig. A vizualizációhoz egy DyLight 488-al jelölt második antitestet (kecskében termeltetett anti-nyúl IgG, Vector, Burlingame, CA, 1:100 hígításban, 45 perc inkubációval) használtunk. Az AT és PC festéseket endoplazmatikus retikulum (ER), cisz-Golgi (CG), transz-Golgi (TG) vagy 26S proteaszóma markerre történő festéssel kombináltuk kettős immunfestéses reakciókban. Az ER marker calnexint egér monoklonális antitesttel (Abcam Ltd, Cambridge, UK, AT esetében 1:40, PC esetében 1:10 hígításban, 60, illetve 45 percig inkubálva) detektáltuk. A Cis-Golgi-t egér anti-Golgi 58K fehérje antitesttel (Sigma-Aldrich, 1:200 hígítás, 60 perc) jelöltük. Egér anti-mannóz-6-foszfát receptor elsődleges antitesttel (Abcam; 1:10 hígítás, 60 perc inkubáció) jelöltük a transz-Golgit. Végül, a proteaszómát 26S proteaszóma elleni egér monoklonális antitesttel (Abcam, 1:200 hígítás, 60 perc) vizualizáltuk. A monoklonális

egér antitestek detektálásához DyLight 549-el konjugált lóban termeltetett anti-egér IgG második antitestet (Vector, 1:200 hígítás, 45 perc inkubáció) használtunk. Valamennyi reakciót szobahőmérsékleten végeztük, az antitestek hígításához és a mosási lépésekhez foszfát puffer oldatot (PBS) használtunk. Negatív kontrollként nem immun antiszérum azonos hígításait és idiotípus egér immunglobulin preparátumokat használtunk a primer antitestek helyettesítésére. A mintákat Plan-Apochromat 63X/1,40 olaj objektívvel és szolid-fázisú lézerekkel felszerelt konfokális lézer szkennning mikroszkóppal vizsgáltuk (LSM 700, Zeiss Oberkochen, Németország). A fluoreszcens jelek szeparálását a VSD (változtatható szekunder dikroikus sugárnyalábosztó) fénytörő lencsékkel történő hatékony feldarabolásával párosított szelektív lézer excitációval (405 nm, 488 nm, 555 nm lézer vonalak) értük el. A fluoreszcens jelek kolokalizációját a képpárokban ZEN 2010 képpalkotó szoftverrel (Carl Zeiss Microscopy) és Protein Proximity Analyser (PPA) szoftverrel vizsgáltuk (www.anes.ucla.edu/~wuyong/). PPA során median filter technikával történő háttér redukciót követően a kolokalizációt a fehérje közelségi index-szel (protein proximity index, PPI1, PPI2) jellemeztük, mely számszerű érték megfelel a kolokalizált molekulák frakciójának valamennyi csatornában ideális, háttértől és zajtól mentes képek esetén. Beállításainknak megfelelően a PPI1 jellemezte az AT vagy PC különböző sejtorganelumokkal kolokalizált frakcióját, míg a PPI2 adta meg az AT-nal, vagy PC-vel kolokalizáló sejtorganelumok arányát. Előbbi mellett a Pearson's korrelációs koefficiens is használtuk a kolokalizáció leírására. Manuális küszöbcsökkentést követően a kolokalizációt Manders szerint is jellemeztük az M1 és M2 kolokalizációs koefficiensek megadásával a ZEN 2010 szoftverrel [391,392].

4.2.2.8 *In silico* vizsgálatok antitrombin és protein C deficienciában

Az informatikai lehetőségek folyamatos fejlődése miatt az *in silico* vizsgálatok módszertanának ismertetése azok elvégzésének időrendjében célszerű.

- In silico vizsgálatok protein C deficienciában

Mivel a vizsgálatok idején nem volt elérhető megfelelő, az aktivációs peptidet is tartalmazó kísérletes templát szerkezet a teljes PC-re, a teljes aktivált PC (APC) szerkezetet építettük fel helyette. Feltételezhető volt, hogy ennek csupán jelentéktelen szerkezeti hatása van az általunk vizsgált, a mutációkat tartalmazó pozíciókra (a 163-as és főként a 77-es, valamint a hozzájuk közel eső aminosavakra). A teoretikus teljes hosszúságú APC modell végül a teljes hosszúságú aktivált IX-es faktor (IXa), a des-

Gla APC (PDB ID: 3F6U) és az elérhető PC Gla domén fragment (PDB ID: 1LQV) minta alapján készült. Az utóbbit a FVII röntgenszerkezetéből (1DAN) ismert teljes Gla domén geometria alapján egészítettük ki. A Gla és az EGF1 domén közé eső, újonnan épített hurok szerkezetet a Schrödinger programcsomag Prime moduljával finomítottuk [393]. A röntgen-diffrakciós szerkezetből hiányzó aminosav egységeket a Yasara programcsomaggal pótoltuk (www.yasara.org). A modell minőségét a Procheck programmal ellenőriztük. A p.Ala163Val és a p.Ala163Glu mutációk szerkezetstabilitásra gyakorolt hatását molekuladinamikai szimulációkkal tanulmányoztuk Gromacs szoftvercsomaggal [394]. A virtuális mutációkat a Yasara programcsomaggal hoztuk létre. Mivel ezek a mutációk a katalitikus (szerin proteáz) doménhez közel eső EGF2 domén felületén helyezkednek el, ezért csak ezeket a doméneket vizsgáltuk. Összehasonlításképpen, ugyanezeket a szimulációkat szintén elvégeztük a vad típusú fehérjén. A Ca^{2+} és Na^{+} ionokat, valamint a szerkezeti vízmolekulákat az eredeti röntgendiffrakciós felvétel alapján megtartottuk. A szolvatált modelleket dodekaédes „boxba” helyeztük. A doboz („box”) fala és a fehérje falhoz legközelebb eső atomjának távolságát 12 Å távolságra állítottuk be. Az így előállított rendszereket neutralizáltuk, majd Na^{+} és Cl^{-} ionok hozzáadásával az ionerősséget 0,15 mol/dm³-re állítottuk be. A 310 K-re való felfűtéséhez ún. „simulated annealing” módszert alkalmaztunk (azaz a rendszert kis lépésekben, minden lépésnél biztosítva az egyensúlyi állapot létrejöttét, fűtöttük fel) majd 200 ns szimulációt futtattunk állandó részecskeszám (N), és állandó nyomás (P=10⁵ Pa) és állandó hőmérséklet (T=310K), valamint periodikus határfeltétel mellett. OPLS-AA [394] fehérje erőteret és TIP3P explicit vízmodellt alkalmaztunk. A rövid hatótávolságú elektrosztatikus és van der Waals energiatagok 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 virtuális pozíció protokoll lehetővé tette, hogy 4 fs-os lépésközt alkalmazzunk a számítások során. A szimulációk kivitelezéséhez és a trajektóriák elemzéséhez a GROMACS szoftvercsomagot használtuk. A fehérjeszerkezet megjelenítéséhez a VMD és Chimera 1.7 programokat vettük igénybe [395].

- In silico vizsgálatok p.Leu205Pro mutáció okozta AT deficienciában

A vad típusú AT kiindulási szerkezetét a natív, pentaszacharid-mentes AT Rtg-diffrakciós szerkezete alapján készítettük, ami a protein adatbankban (PDB ID: 1E04)

megtalálható. Azon régiók geometriáját, melyek ebben a szerkezetben nem voltak megtalálhatók (úgy mint az A-helixet megelőző rövid N-terminális és kiterjedtebb loop szekvenciák, valamint a C-terminális Lys residuum) a Schrödinger programcsomag Prime moduljának segítségével építettük fel [393]. A kiegészített szerkezet minőségellenőrzését a ProCheck szoftverrel végeztük [396]. A mutáns Pro205-t tartalmazó szerkezetet ezek után építettük fel úgy, hogy töröltük a Leu205 oldalláncot és Pro205-tel helyettesítettük a Yasara szoftver segítségével. Ezt követően a PC mutációk vizsgálatához hasonlóan jártunk el, amennyiben a szolvatált (TIP3P vízmodellt használva) vad típusú és Pro205 AT-t dodekaéderez „boxba” helyeztük. A doboz („box”) fala és a fehérje falhoz legközelebb eső atomjának távolságát 15 Å távolságra állítottuk be. Az így előállított rendszereket neutralizáltuk, majd Na⁺ és Cl⁻ ionok hozzáadásával az ionerősséget 0,15 mol/dm³-re állítottuk be. A rendszert itt is 310 K-re fűtöttük az ún. „simulated annealing” módszerrel, majd 4μs szimulációt futtattunk állandó részecskeszám (N), és állandó nyomás (P=10⁵ Pa) és állandó hőmérséklet (T=310K), valamint periodikus határfeltétel mellett a GROMACS szoftverrel. A szimulációk során OPLS-AA erőteret alkalmaztunk. A rövid hatótávolságú elektrosztatikus és van der Waals energiatagok kiszámításakor itt is 10 Angströmös „cut-off” távolságot állítottunk be, míg a nagy hatótávolságú elektrosztatikus energia korrekciókat a PME módszer segítségével vettük figyelembe. A szimulációk során itt is 4fs lépésközt alkalmaztunk. A fehérjeszerkezet megjelenítéséhez a VMD programot használtuk.

- In silico vizsgálatok a IIHBS antitrombin deficienciák összehasonlítására

A IIHBS AT deficienciák összehasonlító vizsgálatait megalapozó in silico tanulmányunk során vizsgáltuk a nagy affinitású pentaszacharid és az AT kölcsönhatását. Ennek során betekintést nyertünk a pentaszacharid (a heparin hatékony antikoaguláns egysége) és az AT kölcsönhatásának folyamatába új módszertan (GAMD, ld. később) segítségével [397]. Az AT-nak pentaszachariddal való kötődésének hatására lejátszódó konformációváltozásaira az irodalomban egy háromlépcsős modellt javasoltak, a modell elsősorban röntgendiffrakciós szerkezeteken és kinetikai méréseken alapul [398-403]. Az egyes lépésekben a pentaszacharid kötődése fokozatosan egyre erősebbé válik. Az első lépésben a pentaszacharid kötődése még relatíve gyenge, azonban a heparin kötőhelye közelében bekövetkező konformációváltozások révén a kötődés erősebbé válik. A második

lépésben lejátszódó folyamatok elsősorban szintén a heparin kötőhelyet, valamint a fehérje hidrofób magját érintik. Az AT pentaszacharid-affinitása a harmadik lépésben válik maximálissá, a D-hélix meghosszabbodása, valamint az RCL A- β -redőbe beékelődött N-terminális részének („hinge” régió) kimozdulása révén. A kötődés viszonylag korai lépéseire, amikor az AT-pentaszacharid kölcsönhatás még relatíve gyenge, eddig nem állt rendelkezésre atomi szintű szerkezeti információ. A GAMD módszer javított mintavételezést tesz lehetővé előre definiált reakciókoordináták megadása nélkül és pontosabb energiaszámítást érhetünk el vele. Hatékonyan alkalmazták már különböző ligand kötődési vizsgálatokban [404]. Ezért tartottuk lehetségesnek az AT-pentaszacharid kötődés vizsgálatát ezzel a módszerrel, olyan röntgendiffrakciós úton meghatározott AT-konformációt felhasználva, ami nem tartalmazott pentaszacharidot, vagy más szerkezetű aktivátort, így számunkra az a konformáció kiindulásként szolgálhatott.

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. Először, a nem aktivált AT állapotot reprezentáló, pentaszacharidot nem tartalmazó modellhez a nem-aktivált AT 1T1F röntgendiffrakciós szerkezetet használtuk [405]. Másodszor, a pentaszachariddal kapcsolódott, aktivált AT állapotot reprezentáló modellhez az 1NQ9 Rtg-diffrakciós struktúrából indultunk ki [403]. 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 szimulációk kocka alakú dobozban történtek, periodikus határfeltételek mellett és a minimum távolság a fehérje (vagy ligand) és a doboz élei között 12 Å volt. A hozzáadott Na⁺ és Cl⁻ ionok számát úgy határozta meg a szoftver, hogy a sókoncentráció megközelítően 0,15 M legyen. Az AT fehérjére a CHARMM36m erőteret, a pentaszacharidra pedig a CHARMM szénhidrát erőteret alkalmaztuk [406]. Az AT e modellekben három helyen, a β -AT-nak megfelelően volt glikozilálva (Asn-96, az Asn155 és az Asn192 a hagyományos, az érett AT molekulának megfelelő számozás szerint). A topológia fájlok elkészítéséhez a CHARMM-GUI webes felületet használtuk [407]. A molekuladinamikai szimulációkhoz és a GAMD szimulációhoz az AMBER16 szoftvercsomag pmemd.cuda programját használtuk [408]. Valamennyi molekuladinamikai szimulációt energiaminimalizáció előzött meg, ahol az első 500

lépésben „steepest descent” algoritmust, az azt követő 1500 lépésben konjugált gradiens módszert alkalmaztunk. Ezt egy újabb 2000 lépéses energia-minimalizáció követte, a megszorítások eltávolítása után. A javított mintavételezésű szimulációk előtt minden esetben 150 ns hosszúságú egyensúlyi molekuladinamikai szimulációkat futtattunk. A GAMD szimulációk során az ún. dual-boost sémát alkalmaztuk [408]. Minden szimuláció során egy 60 ns ekvilibrium szakasszal indítottunk, majd következett az ún. produkciós szakasz. A szimulációk során az első 10 ns egyensúlyi dinamikának felelt meg, adatgyűjtés az első 4 ns-ban nem is történt. A maradék 50 ns-ban a szoftver gyorsító potenciált alkalmazott a rendszer energiájának mindkét komponensére, az utolsó 40 ns alatt rendszeresen frissítve ennek paramétereit. A GAMD szimulációk állandó 310 K hőmérsékleten és térfogaton történtek Langevin típusú hőmérsékletszabályozó alkalmazásával, az integrálási lépésköz 2 fs volt. A 12 Å-nél távolabb elhelyezkedő atomok közötti elektrosztatikus kölcsönhatásokat a PME módszer segítségével vettük figyelembe. A „produkciós” szimulációk 600 ns hosszúságúak voltak. Minden mutáns esetében két parallel szimulációt futtattunk az 1T1F modellnek és hármat az 1NQ9 modellnek megfelelően. Így az első modell esetében 1,2 μ s, a második esetében 1,8 μ s totál szimulációs idővel számolhattunk minden mutáns esetében. A szimulációk eredményének kiértékelése CPPTRAJ programmal történt [409].

4.2.2.9 Statisztikai módszerek

A változók eloszlását a Kolmogorov-Smirnov és Shapiro-Wilk tesztel vizsgáltuk. A normál eloszlást mutató változók esetében az átlagot és az SD értékeket, a nem normál eloszlást mutató változók esetében a mediánt és az ahhoz tartozó totál tartományokat tüntettük fel. A folyamatos változók közötti különbségeket normál eloszlás esetén t-tesztel, illetve ANOVA-val, nem normál eloszlás esetén Mann-Whitney U tesztel és Kruskal-Wallis tesztel vizsgáltuk. Ahol szükséges volt, a többszörös összehasonlítások esetén, Bonferroni korrekciót végeztünk. χ^2 statisztikát használtunk a kategorikus változók összehasonlítására. Az ATBp3 hordozásának a thrombosis kialakulására gyakorolt kockázatát logisztikus regressziós modellel is analizáltuk, megadtuk az esélyhányadost (odds ratio, OR) és a 95%-os konfidencia intervallumot. Kaplan-Meier túlélési görbékkel szemléltettük az első thromboticus esemény kialakulásáig eltelt időt (életkor az első thrombosis idején) a különböző AT deficiencia típusokban. 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 (δ) kalkuláltunk a módszerekben említett STR markerek alapján Bengtsson és Thomson szerint [410]. A genetikai távolságot (rekombinációs frakció, θ) az egyes STR markerek és a *SERPINCI* gén közötti fizikai távolságból számítottuk 1,17 cM/Mb konverziós faktoral [411]. Az ATBp3 korát (generációkban kifejezve, g) parametrikus és Bayes-féle módszertannal is számítottuk. A parametrikus módszerek közül az első Risch algoritmusán alapul, ahol $g = \log \delta / \log (1 - \theta)$ [412]. A második egy ún. Markov-féle tranzíciós mátrix (K) kalkulálásán alapul, ahol annak a valószínűségét adjuk meg, hogy egy generáción belül egy haplotípus egy másikba transzformálódik. A K érték szorzószáma adja végül a generációk (g) számát [413,414]. A Bayes-féle módszert a DMLE+ program 2.3-as verziójával végeztük [415], illetve elvégeztünk egy másik valószínűségi analízist is, ami megadja az azonos haplotípussal rendelkezők legközelebbi közös őstől (MRCA, most recent common ancestor) való távolságát generációkban kifejezve. Ezt a módszert az ESTIAGE szoftverrel végeztük [416]. A kalkulációkhoz számításba vettük hazánk lakosság számát (9,8 millió), illetve a mutáció alapításának idején feltételezhető lakosság számot (a parametrikus modellek alapján a XVII. század első fele, 3,5 millió), egy generációt 25 évnek vettünk.

4.2.3 Etikai engedélyek

A thrombophiliákkal kapcsolatos munka a Helsinkii deklarációval és a hatályos etikai irányelvekkel összhangban történt. A betegek tájékozott beleegyezésüket adták a mintavételekhez. Etikai engedélyek: 3166/2012/HER, 6236-2022/DE RKEB/IKEB, 54005-3/2016/EKU, 3189-2010/DEOEC RKEB/IKEB, 84-341/2008-1018EKU, NKFP/1/0003/2005, 8907-O/2011-EKU, 61327-2017/EKU, RKEB 2462-2006).

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

5.1.1.1 Rutin és speciális diagnosztika

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 (VI. Táblázat).

VI. Táblázat. A két FXIII deficiens beteg laboratóriumi eredményeinek összefoglalása.

Beteg azonosító	Plazma FXIII aktivitás (%)	Plazma FXIII-A2B2 antigén (%)	Plazma FXIII-A antigén (%)	Plazma FXIII-B antigén (%)	Thrombocyta FXIII-A antigén (%)
Proband 1 (P1)	<1	<0,045	<0,03	63	<0,01
Apa P1	63	62	67	117	48
Anya P1	86	95	75	99	46
Proband 2 (P2)	<1	<0,045	<0,03	38	<0,01
Referencia tartomány	69-143	67-133	67-133	64-136	Kontroll: 100

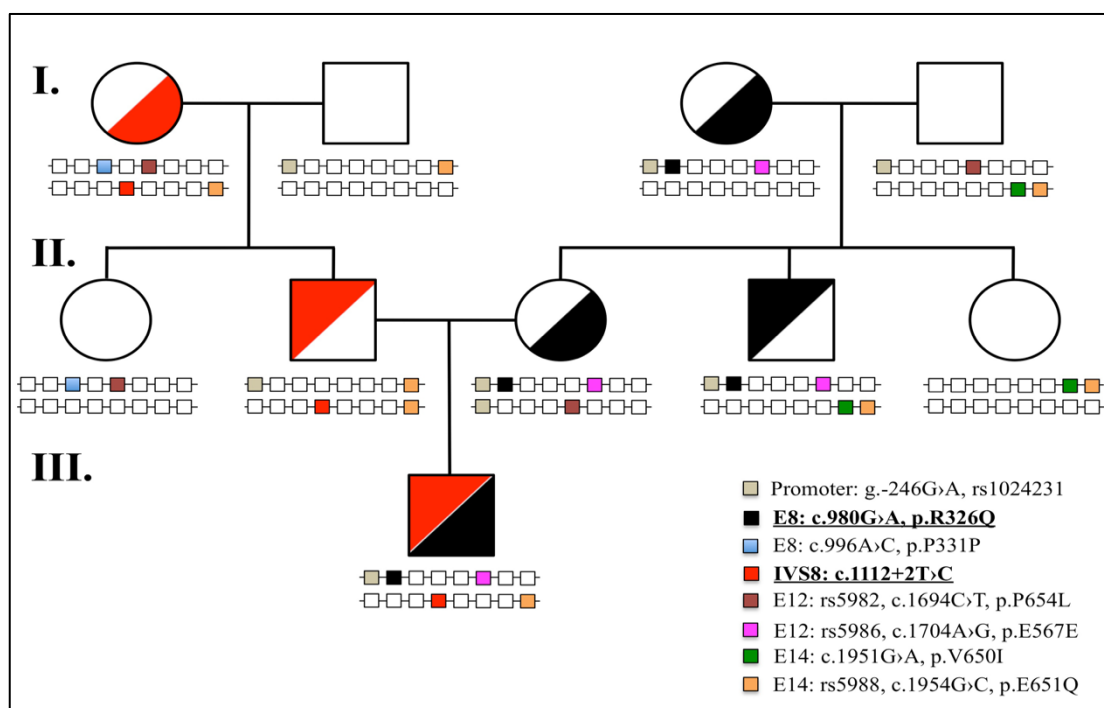
(Katona, É., Muszbek, L., Devreese, K., Kovács, K., Bereczky, Z., Jonkers, M., Shemirani, A. Mondelaers, V., Ermens, A.: Factor XIII deficiency: complete phenotypic characterization of two cases with novel causative mutations. *Haemophilia*. 20 (1), 114-120, 2014. közleményünk alapján.)

A belga laboratóriumban (Proband 2) elvégzett pozitív alvadék oldékonysági teszt (ami ma már elavult és szűrővizsgálatként sem ajánlott), a BERICHROM assay-vel 2,5%-os FXIII aktivitás és a latex immunoassay-vel <4% FXIII-A antigén szint bizonyította ugyan a FXIII deficiencia jelenlétét, de ezek a tesztek nem mérik pontosan

a FXIII szinteket az alacsony tartományban, így a vérzések várható súlyosságáról sem alkothatnak pontos képet. Az 1% és 5% közötti FXIII aktivitás ugyanis általában csupán közepesen súlyos vérzékenységet okoz, míg az 1% alatti FXIII szintek mellett súlyos, spontán vérzések alakulhatnak ki, ami szükségessé teszi a rendszeres profilaxist. A FXIII aktivitás spektrofotometriás meghatározásával kapcsolatban ismert, hogy a minta vakra történő korrigálás hiányában a BERICHROM FXIII assay túlbecsüli a FXIII aktivitást alacsony értékek esetén [417,418]. Ezzel magyarázható, hogy a BERICHROM assay-vel nyert FXIII aktivitás érték (2,5%) és az általunk használt TECHNOCHROM FXIII assay-vel mért <1% FXIII aktivitás érték között discrepancia van. A klinikummal az általunk használt esszé eredménye korrelál jobban.

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, melyről korábban *in silico* módszerekkel és *in vitro* expressziós kísérletekben is igazolták, hogy a mutáció következtében instabillá váló fehérje intracelluláris degradációt szenved [75,76]. A másik mutáció a 8-as intronban (IVS8 c.1112+2T>C) „splicing”-hely defektust feltételez. A FXIII-A mRNS tartalom a beteg vérében, a trombocytákban és a monocytákban közel normál volt a „splicing”-hely defektust megelőző 3-as exont vagy az azt követő 14-15-ös exonokat amplifikáló primerek használatával. Ez alapján a nonszensz-mediálta mRNS lebomlás nem valószínűsíthető. (A mRNS transzkript részletes karakterizálását nem végeztük el.) A proband1 a p.Arg326Gln mutációt anyjától, a IVS8 c.1112+2T>C eltérést édesapjától örökölte. Ebben a családban lehetőségünk volt egy három generációt magába foglaló családfa felvételére, ahol a két mutáció és egyéb F13A1 polimorfizmusok szegregációját is megfigyelhettük (**11. ábra**).

A Proband2 esetében egy adenin homozigóta delécióját igazoltuk a 70-74. kodonokban, egy négy adenint tartalmazó sorból a 212–215. nukleotidok között. Ennélfogva az E-N-N-K-L aminosavakat kódoló gaa-aac-aac-aag-ctg nukleotid szekvencia a 70–74. kodonokban gaa-aca-aca-agc-tga nukleotidokra változott, ami az E-T-T-S-STOP szekvenciát kódolja, vagyis 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, hogy a plazmában és a trombocytákban detektálhatatlanul alacsony volt a FXIII aktivitás és FXIII-A antigén. A beteg édesanyja heterozigóta volt az eltérésre, az apa vizsgálatára nem volt lehetőség.



11. ábra. A Proband 1 családfája.

Az ábrán az okozati mutációkat aláhúzással jelöltük.

(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. közleményünk alapján.)

5.1.1.2 Klinikai és laboratóriumi tanulságok, a XIII-as faktor deficiencia kivizsgálásának irányelvei

Az elmúlt két évtizedben több FXIII deficiens beteg esetében biztosítottuk a részletes és pontos laboratóriumi diagnózist, hozzásegítve e betegeket az adekvát terápia, illetve profilaxis mielőbbi bevezetéséhez. A veleszületett FXIII deficiencia extrém ritka volta és a laboratóriumi diagnosztika nehézségei miatt ez az a coagulopathia, ahol a betegek a legkésőbb jutnak adekvát diagnózishoz. A koaguláció szűrőtesztjei nem jeleznek, a tipikus köldökcsonk vérzés nem minden betegben fordul elő, vagy nem tulajdonítanak neki jelentőséget. Ugyanakkor az 1% alatti faktor szinttel rendelkező betegek életveszélyes spontán vérzéseknek vannak kitéve. Ma már ráadásul elérhető rekombináns FXIII készítmény, ami célzott és hatékony profilaxist és terápiát biztosít, így a minél korábban és adekvát laboratóriumi módszerek alkalmazásával megszülető diagnózis kiemelten fontos [419]. FXIII deficienciában éppen ezért – a tudományos érdeklődés mellett – az edukációnak is fontos szerepe van, nemzetközi szinten is, ezért a mai napig igény van az esettanulmányok közzlésére e témakörben. Az értekezésben

most két súlyos FXIII-A deficienciában szenvedő beteg esetét mutattam be. A laboratóriumi fenotípus komplett meghatározása mellett az okozati mutációkat is meghatároztuk. A súlyos klinikai tünetek, a plazmában és a thrombocytákban detektálhatatlan FXIII aktivitás és FXIII-A antigén szint összhangban volt a molekuláris defektussal. Tanulmányunkban a korai diagnózis fontosságára is felhívtuk a figyelmet a súlyos klinikai következmények elkerülése érdekében. Az adekvát laboratóriumi módszertant alkalmazó klinikai-laboratóriumi fenotípus összefüggéseit leíró tanulmányoknak abból a szempontból is jelentősége van, hogy a FXIII szintek és a tünetek súlyossága (vérzések, sebgyógyulási zavarok, illetve terhességi komplikációk) közötti összefüggésekről pontosabb képet kapjunk és pontosan leírassuk azt a legalacsonyabb FXIII szintet, mely felett súlyos tünetek nem valószínűsíthetőek. Ez a profilaxis szempontjából is tanulságos, hiszen a rekombináns FXIII alkalmazásakor – a haemophiliához hasonlóan – meg kell határoznunk a kívánatos völgykoncentráció értékét, melyhez a profilaxis során igazítanunk kell a dozírozást.

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. Röviden, a FXIII-A alegységének deficienciája klinikai megjelenését tekintve az életet veszélyeztetően súlyostól az enyhéig lehet. Köldökcsonk vérzés az esetek 80%-ában megfigyelhető, de e tünet hiánya nem zárja ki a FXIII deficiencia lehetőségét. A felszínes bőrvérzések, subcutan hematomák, szájüregi vérzések, illetve sajnos az intracranialis vérzések is előfordulnak, mintegy az esetek harmadában. A FXIII-B alegység deficiencia sokkal ritkább (vagy legalábbis ritkábban kerül felismerésre) és tüneteit tekintve enyhébb vérzéses fenotípussal jár. 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 és csak az extrém alacsony FXIII szintek esetén jelez. 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 (National Institute of Biological Standards, UK, az első nemzetközi plazma standard FXIII aktivitásának meghatározásában Muszbek professzor úr irányítása alatt magam is részt vettem a 2000-es évek közepén) 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 konszumpcióval járó, de nem a FXIII által katalizált reakciók által okozott fölé mérés, 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. Csökkent 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. A-alegység deficiencia esetén a FXIII-B alegység koncentrációja a plazmában 30% feletti, tehát diszproporcionálisan csökkent, míg FXIII-B alegység deficiencia esetén jelentősen csökkent, gyakran 1% alatti szintet mutat. Veleszületett FXIII-A alegység deficiencia esetén nemcsak a plazmában, de a thrombocytában is csökkent FXIII-A alegység koncentrációt mérünk, míg B-alegység deficiencia esetén a thrombocytá FXIII-A koncentráció normál. (A plazmában mért FXIII-A koncentráció alacsony B-alegység deficiencia esetén is, mert B-alegység hiányában az A-alegység élettartama a keringésben jelentősen csökken.) Szerzett FXIII-A deficiencia esetén (pl. autoantitestek) a thrombocytá FXIII-A alegység szintén normál, annak ellenére, hogy a plazmában csökkent koncentrációt találunk. Elkülöníthetjük továbbá az I-es és II-es típusú FXIII-A alegység deficienciát, előbbi esetén az antigén szint az aktivitással arányos csökkenést mutat, utóbbi esetén pedig aránytalanul magasabb az aktivitáshoz viszonyítva (**VII. Táblázat**).

VII. Táblázat. A veleszületett FXIII deficiencia laboratóriumi kivizsgálásának általunk javasolt tesztjei és ezek alapján a deficiencia klasszifikációja.

	FXIII aktivitás a plazmában	FXIIIA2B2 antigén a plazmában	FXIII-A antigén a plazmában	FXIII-B antigén a plazmában	FXIII-A antigén a thrombocytában
FXIII-A deficiencia					
I-es típus	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	>30%	↓↓↓
II-es típus	↓↓↓	↓-n	↓-n	>30%	↓-n
FXIII-B deficiencia	↓↓	↓↓↓	↓↓	↓↓↓	n

n: normál

(Karimi, M., Bereczky, Z., Cohan, N., Muszbek, L.: *Factor XIII Deficiency. Semin. Thromb. Hemost.* 35 (4), 426-438, 2009. közleményünk alapján.)

További kiegészítő tesztek lehetnek FXIII deficienciában az SDS-poliakrilamid gél elektroforézis a fibrin keresztkötések vizsgálatára, valamint inhibitor gyanúja esetén ennek speciális vizsgálata (keveréses vizsgálatok, kötődési vizsgálatok, ezek nem képezik az értekezés témáját).

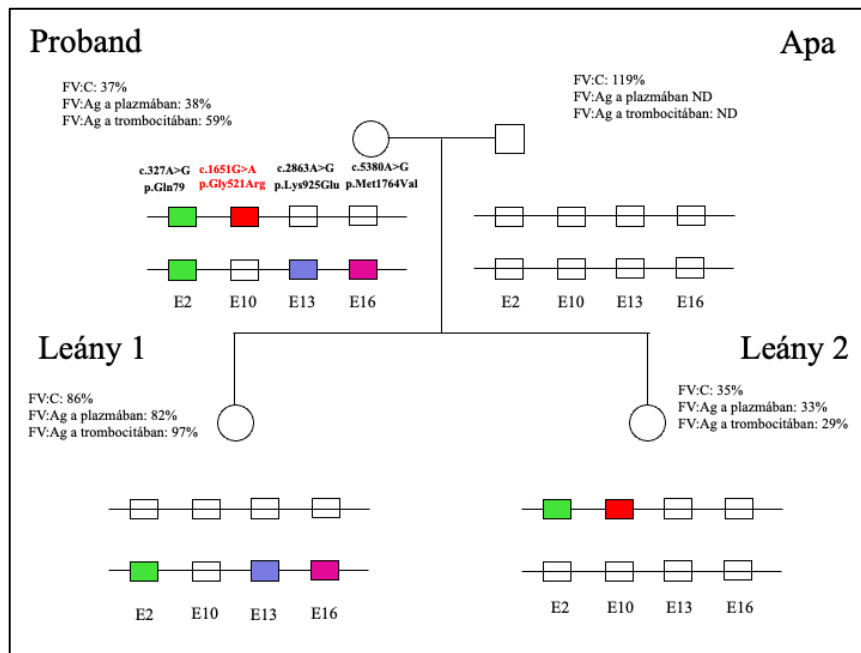
5.1.2 V-ös faktor deficiencia

5.1.2.1 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 (11,3, illetve 10,0 sec) a referencia tartományban, vagy annak felső határán volt (ref. tart.: 8,7–11,3 sec) az APTI enyhén megnyúlt, vagy a referencia tartomány felső határához közeli érték volt (45,9, illetve 39,4 sec; referencia intervallum 28,3–41,0 sec), a TI és a fibrinogén szint, thrombocyta szám normál 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%), így laboratóriumi szempontból enyhe FV deficienciát tudtunk igazolni. (Ahhoz, hogy a vérzékeny fenotípus hátterében esetleg jelen lévő egyéb tényezőket kizárjuk, vérzési idő, PFA-100 záródási idő, thrombocyta aggregáció és szekréció vizsgálat, valamint FXIII, alfa-2 plazmin inhibitor és von Willebrand betegség irányú paraméterek meghatározása is történt, ezek eredményei eltérést nem mutattak.) 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 (**12. ábra**). Mindezek I-es típusú, enyhe, veleszületett FV deficienciára utaltak. A normál máj- és vesefunkció paraméterek, valamint a normál egyéb alvadásifaktor szintek, továbbá, a csökkent thrombocyta FV koncentráció és az, hogy a beteg fiatalabbik gyermeke hasonló laboratóriumi fenotípussal rendelkezett, a szerzett deficiencia lehetőségét kizárták.

A molekuláris diagnosztika során a *F5* génben négy különböző misszensz mutációt detektáltunk a probandnál. A c.2863 A>G (p.Lys925Glu, régi nomenklátúra szerint p.Lys897Glu) és c.5380A>G (p.Met1764Val, régi nomenklátúra szerint p.Met1736Val) mutációk korábban már leírt, normál szekvencia variációk heterozigóta, míg a csendes, c.327A>G (p.Gln79, régi nomenklátúra szerint p.Gln51) mutáció homozigóta formában volt jelen [420]. Az új, c.1651G>A (p.Gly521Arg, régi nomenklátúra szerint p.Gly493Arg) mutációra a beteg heterozigótának bizonyult. Ugyanezt a mutációt hordozza a beteg azonos laboratóriumi fenotípussal rendelkező lánya. Az apa és a másik leány e mutációra nézve vad típusú (**12. ábra**). A p.Gly521Arg mutáció 100, hemosztázis szempontjából egészséges személy DNS mintáján nem volt kimutatható és transz helyzetben öröklődött a két ismert, klinikailag ártalmatlan polimorfizmussal. A mutáció patogenitásának további indirekt bizonyítéka a laboratóriumi fenotípus és a p.Gly521Arg mutáció jelenlétének összefüggése a vizsgált családon belül.



12. ábra. A FV deficiens család laboratóriumi és genetikai jellemzői.

FV:C, az V-ös faktor aktivitása a plazmában, egyfázisú alvadási tesztben; FV:Ag, az V-ös faktor antigén koncentrációja a plazmában, illetve a trombocytában ELISA-val mérve. A feltételezett patogén mutációt piros színnel jelöltük, mely a probandban és a Leány 2 jelzéssel ellátott gyermekben volt kimutatható.

Indirekt bizonyíték továbbá a p.Gly521 konzerváltsága. A 27 aminosavból álló, diszulfid híddal összekapcsolt hurokszerkezet, amiben a mutáció pozíciójának megfelelő aminosav elhelyezkedik, erősen konzervált a humán FVIII, cöruoplazmin és a SwissProt adatbázisban elérhető különböző állatfajok FV molekulái megfelelő részeiben (13. ábra).

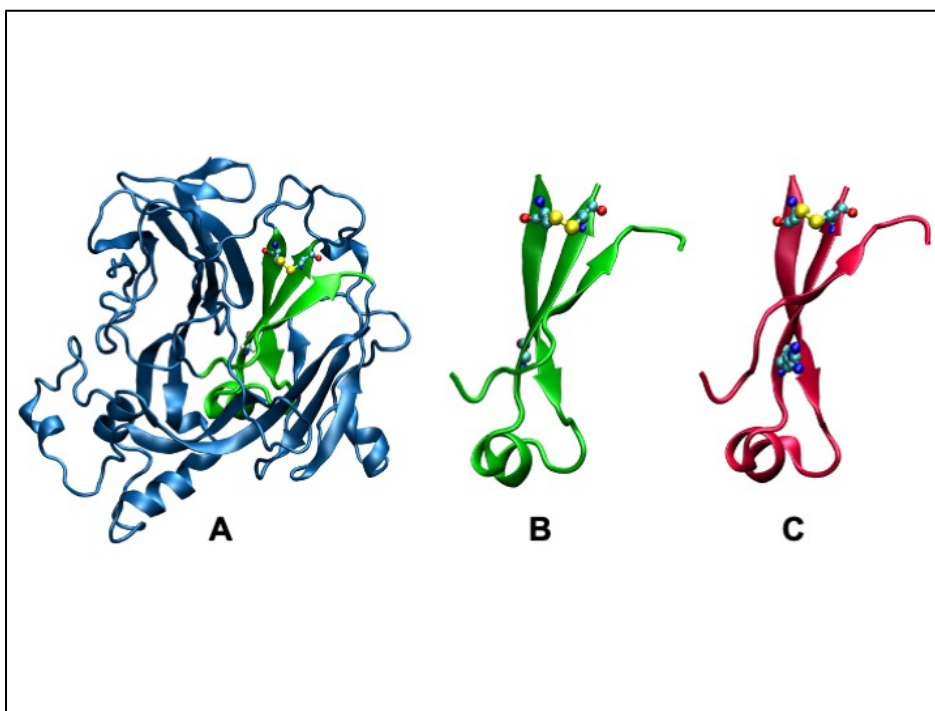
Accession No.	Protein	Aminosav szekvencia																										
P12259	Humán FV	C	L	T	R	P	Y	Y	S	D	V	D	I	M	R	D	I	A	S	G	L	I	G	L	L	L	I	C
O88783	Egér FV	C	L	T	R	P	Y	Y	S	D	V	D	V	T	R	D	I	A	S	G	L	I	G	L	L	L	I	C
XP_001514412	Kacsacsőrű emlős FV	C	V	T	R	P	Y	Y	S	A	V	D	V	S	R	D	I	A	S	G	L	I	G	L	L	L	I	C
AAG28381	Vaddisznó FV	C	L	T	R	P	Y	Y	S	N	V	D	I	T	R	D	I	A	S	G	L	I	G	L	L	L	I	C
Q28107	Szarvasmarha FV	C	L	T	R	P	Y	Y	S	N	V	D	I	T	R	D	L	A	S	G	L	I	G	L	L	L	I	C
Q90X47	Zebrahal FV	C	L	T	R	M	Y	H	S	A	V	D	A	P	R	D	I	A	S	G	L	V	G	P	L	L	I	C
AAO33375	Fugu FV	C	L	T	R	L	Y	H	S	A	V	D	T	P	R	D	I	A	S	G	L	I	G	P	L	L	I	C
AAT78356	Textilmintás barnakigó FV	C	I	T	K	L	Y	H	S	A	V	D	M	T	R	D	I	A	S	G	L	I	G	P	L	L	V	C
XP_001093072	Makákó FV	C	L	T	R	P	Y	Y	S	D	V	D	I	M	R	D	I	A	S	G	L	I	G	L	L	L	I	C
XP_001915701	Ló FV	C	L	T	R	P	Y	Y	S	N	V	D	I	T	R	D	I	A	S	G	L	I	G	L	L	L	I	C
XP_001372262	Házi kurtapócs FV	C	L	T	R	P	Y	Y	S	M	V	D	I	Q	R	D	I	A	S	G	L	I	G	L	L	L	I	C
AA047065	Tajpán FV	C	I	T	K	L	Y	H	S	A	V	D	M	T	R	D	I	A	S	G	L	I	G	P	L	L	V	C
AAO33366	Tyúk FV	C	I	T	R	L	Y	H	S	A	V	D	I	E	R	D	I	A	S	G	L	V	G	P	L	L	I	C
XP_001135410	Csímpanz FV	C	L	T	H	I	Y	Y	S	H	E	N	L	I	E	D	F	N	S	G	L	I	G	P	L	L	I	C
P00451	Humán FVIII	C	L	T	R	Y	Y	S	S	F	V	N	M	E	R	D	L	A	S	G	L	I	G	P	L	L	I	C
P00450	Humán ceruloplasmin	C	V	T	R	I	Y	H	S	H	I	D	A	P	K	D	I	A	S	G	L	I	G	P	L	I	I	C
p.G521R		C	L	T	R	P	Y	Y	S	D	V	D	I	M	R	D	I	A	S	G	L	I	R	L	L	L	I	C

13. ábra. A humán FV p.Cys500-p.Cys526 által összekapcsolt hurokszerkezet és a p.Gly521 pozíció konzerváltsága.

Az ábrán a humán FV, humán FVIII és ceruloplasmin, valamint különböző állatfajok FV fehérjéinek a humán FV p.Gly521 pozíciójának megfelelő (piros színnel) és azt magában foglaló, két cisztein (kék színnel) által összekapcsolt hurokszerkezet van feltüntetve. Az ábrán az aminosavak egy betűs kódja látható.

5.1.2.2 A p.Gly521Arg mutáció strukturális következményei – In silico analízis

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 (állandó részecskeszám, állandó nyomás és hőmérséklet mellett a „protein data bank” pdb ID:1y61-ben megadott geometria alapján) volt vizsgálható. A szimuláció eredménye azt sugallja, hogy az Arg oldallánca 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 (14. ábra).



14. ábra. A FV A2 doménje és a p.Gly521Arg mutáció elhelyezkedése.

A) A FV A2 doménjének 20 ns-os molekula dinamikai szimulációja során az utolsó 5 ns eredményei alapján átlagolt geometriai szerkezete. A ciszteinek által határolt hurkot, melyben a mutáció található, valamint a szomszédos 418ILGPIIRAQVR428 régiót zöld színnel jelöltük.

B) A vad típusú (G521) FV A2 domén érintett részének szerkezete.

C) A mutáns (R521) FV A2 domén érintett részének szerkezete. A szimulációkat Gromacs 3.3 molekuladynamikai csomaggal végeztük (*van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, et al. Groningen Machine for Chemical Simulations (GroMaCS) version 3.3, <http://www.gromacs.org>*). A számításokhoz 2 fs-os lépésközt, OPLS-AA/L erőteret, TIP3P explicit vízmodellt, valamint periodikus határfeltételt választottunk. A távoli elektrosztatikus kölcsönhatások leírásához a részecskehálós Ewald módszert alkalmaztuk. A hurok kialakításában résztvevő Cys reziduumokat és a mutációban érintett aminosavakat golyó és pálca modell formában jelenítettük meg. (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. közleményünk alapján.*)

5.1.2.3 Megbeszélés, klinikai tanulságok

A gondosan kivizsgált esetnek a gyakorlati hemosztazeológia szempontjából is vannak tanulságai. Egyrészt, a normál koaguláció szűrőteszt eredmények ellenére felmerülhet az alvadási faktor deficiencia lehetősége, így azt egyetlen laboratóriumban mért normál értékek alapján kétséget kizáróan elvetni nem lehet, amennyiben a betegnek objektív vérzéses tünetei vannak. Az enyhe (heterozigóta) alvadási faktor deficienciák 30-50%-os alvadási faktor szinttel járó eseteiben a koaguláció szűrőtesztjei – reagens összetételtől és koagulométertől függően – eltérő mértékben mutatnak megnyúlásokat, így léteznek olyan reagensek, amelyek alkalmazása mellett nem merül fel az enyhe

coagulopathia gyanúja. Az alvadási szűrőtesztek reagenseit persze szándékosan alakítják úgy, hogy 30-50%-os alvadási faktor szint felett lehetőleg ne mutassanak megnyúlást, hiszen klinikailag ezek az esetek általában némák, így a felesleges „túlvizsgálás” elkerülhető. Az alvadási faktor szint és a klinikai tünet összefüggése azonban csak a haemophilia A és B esetén ilyen egyértelmű. A ritka coagulopathiák esetében – legutóbb egy nagy európai felmérés eredményei alapján – egyes alvadási faktorok esetében egészen meglepően magas koncentrációval kell ahhoz rendelkeznie a betegnek, hogy biztosan vérszémmentes legyen [101]. A sebészeti beavatkozások kapcsán jelentkező vérzések elkerüléséhez pedig adott esetben nem elegendő a 30-50%-os alap alvadási faktor szint, amint azt heterozigóta FV deficiens betegünk esetében is láthattuk. Az irodalomban saját közlésünket megelőzően csak három olyan heterozigóta FV deficiens esetet közöltek, akiknél vérzéses komplikáció jelentkezett [421-423]. E betegek FV aktivitása 30-45% között volt és hematuria, nyálkahártya vérzések, metrorrhagia, valamint tonsillectomiát követő vérzés szerepelt a klinikai adataikban. E betegek mindhármán heterozigóta FV deficiensek voltak (c.144delG, p.Glu1636Lys és p.Tyr1730Cys mutációk). Saját esetünk és fenti riportok is arra hívják fel a figyelmet, hogy heterozigóta FV deficienciában nem zárhatóak ki a spontán, vagy sebészi beavatkozásra kialakuló klinikailag jelentős vérzések, és ezt a laboratóriumi diagnosztika során is figyelembe kell venni. A FV heterozigóta állapot (enyhe FV deficiencia) előfordulási gyakorisága nagy valószínűséggel alábecsült, mivel a tünetmentes személyek nem kerülnek részletes kivizsgálásra. Invazív beavatkozások előtt – egyéb vizsgálatok mellett – mindenképpen szükséges a hemosztázis szűrőtesztjeinek, és akár enyhe eltérés esetén is a részletes hemosztazeológiai vizsgálatoknak az elvégzése. A már ismert F5 mutációval rendelkező személyek családtagjainak genetikai vizsgálata (akár tünetmentes családtagoké is) fontos lehet a vérzéses kockázat megítélése szempontjából. Esetünkben a beteg fiatalabb gyermekénél megtaláltuk a patogén p.G521R mutációt heterozigóta formában, így - bár spontán vérzéses tünetei nem voltak – az umbilicalis hernia műtétet már ennek az információnak a birtokában lehetett tervezni.

Más esetekben alacsony FV szintek ellenére nem jelentkezik vérzéses tünet, vagy csak nagyon enyhe formában. Ennek magyarázata lehet a thrombocytákban található FV raktár, mely kisebb részben a megakaryocytákban történő szintézis, nagyobb részben a plazmában található FV endocitózisa révén kerül az α -

granulumokba. Az endocitózist követően a FV intracellulárisan módosul (a folyamat részleteiben nem ismert) és ezáltal egyedi szerkezeti és funkcionális jellemzőkhöz jut, a plazma formánál kifejezettebb prokoaguláns sajátosságokkal. Súlyos FV deficiens betegekben például a thrombocyták aktivációja és degranulációja az érsérülés helyén a lokális FV koncentrációját emelheti, így a lokális FV szint nem felel meg a plazmában általánosan mérhető FV mennyiségnek, hanem annál magasabb, ami a beteg számára segíthet elkerülni az életveszélyes vérzéseket [44].

5.1.3 X-es faktor deficiencia

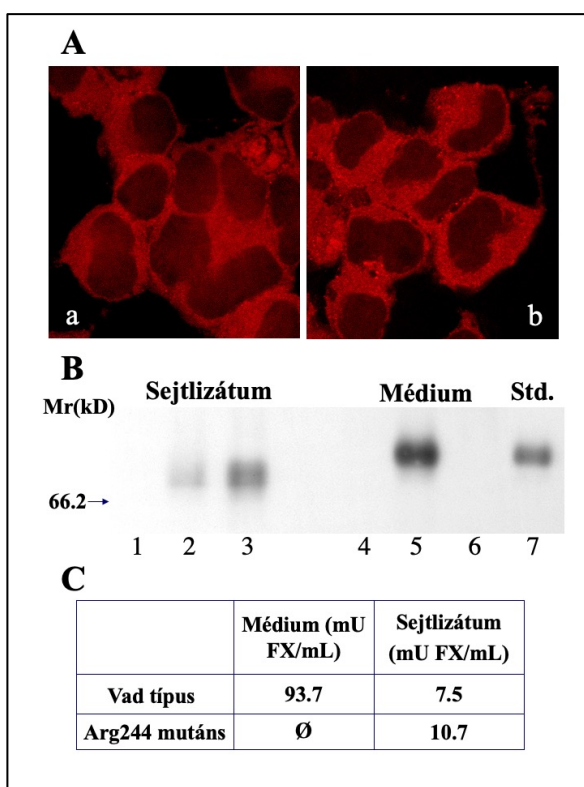
5.1.3.1 *Rutin és speciális diagnosztika*

A súlyos vérzékenységben szenvedő gyermeknél a hemosztázis laboratóriumi vizsgálatok során jelentősen megnyúlt protrombinidőt (73,1 sec) és APTI-t (103,1 sec) észleltünk normál trombinidővel. (A referencia tartományokat ld. FV deficiencia fejezetben.) A megnyúlt PI és APTI normál plazmával korrigálható volt, így inhibitor lehetőségét nagy valószínűséggel kizártuk. A koaguláció extrinszik és intrinszik faktorainak meghatározása során mérhetetlenül 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. Minden egyéb hemosztázis paraméter az életkornak megfelelő referencia tartományban volt. Molekuláris genetikai vizsgálattal egy új, misszensz mutációt találtunk homozigóta formában c.730 G>A (p.Gly244Arg, régi nomenklatura szerint p.Gly204Arg). Az édesanya heterozigóta volt erre a mutációra, az apa nem egyezett bele a vizsgálatok elvégzésébe. A mutáció 100, vérzékenységet nem mutató személy DNS-ét vizsgálva, egy esetben sem volt kimutatható.

5.1.3.2 *A p.Gly244Arg mutáció következményeinek vizsgálata in vitro expressziós kísérletekben*

Létrehozva a mutáns FX cDNS-t tartalmazó vektort (a vad típusú FX-et tartalmazó pCMV4 vektor Prof. Katherine A. High ajándéka volt, Children's Hospital of Philadelphia), azzal és a vad típusú vektorral HEK293 sejteket transzfektáltunk. A transzfektált sejtek lizátumának és a tápfolyadéknak 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

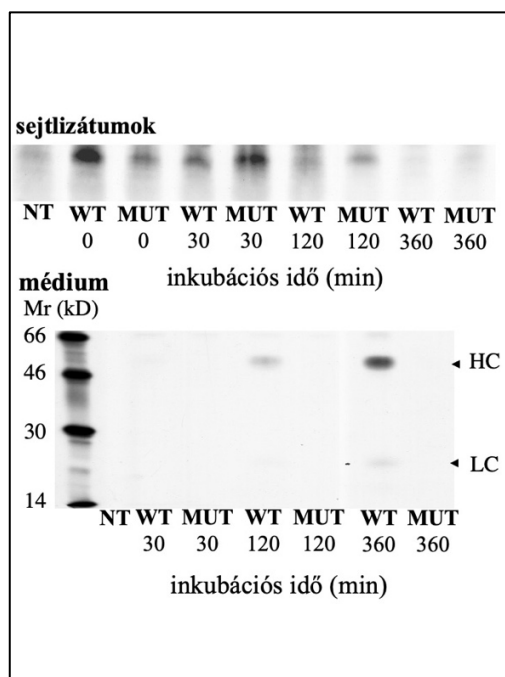
expresszáló sejtek lizátumából mért koncentrációnak. Ezt megerősítette a kvantitatív fluoreszcens kép analízis is, ahol az Arg244 FX esetében az átlagos fluoreszcencia intenzitás/sejt 2,2-szer erősebb volt a vad típusú FX-et tartalmazó sejtek esetében észlelt értékhez viszonyítva. Ezekkel összhangban az Arg244 FX-et reprezentáló sáv a Western blot-on intenzívebb volt a Gly244 FX-nek megfelelő sávhoz képest. Nem redukáló körülmények között a FX mind a vad, mind a mutáns esetben kettős sávként jelent meg a blot-on, mely feltehetően a különböző mértékben glikozilálódott frakciók jelenlétének volt köszönhető. A sejtek tápfolyadékát vizsgálva ELISA-val és Western bloton is megállapítottuk, hogy csak a vad típusú FX szekretálódott a médiumba, az Arg244 FX nem volt detektálható a sejtek tápfolyadékában egyik módszerrel sem (15. ábra).



15. ábra. A vad típusú és a mutáns FX detektálása.

A, konfokális lézer szkennelési mikroszkópos felvételek a vad típusú (a) és mutáns (b) FX-et tartalmazó HEK293 sejtekről (nagyítás 100 x 2.6.). B, a FX megjelenése a sejt lizátumban (1-3) és a médiumban (4-6) Western blot-on. Az SDS PAGE nem redukáló körülmények között volt kivitelezve. 1,4: mock transzfektált sejtek; 2,5: vad típusú FX-et expresszáló sejtek; 3,6: Arg244 mutáns FX-et expresszáló sejtek; 7: tisztított FX standard. C, a vad típusú és a mutáns FX-et expresszáló sejtek lizátumában és médiumában mért FX antigén szintek ELISA-val detektálva. Az értékek 3 független kísérletből kapott eredmények átlagai. (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. közleményünk alapján.)

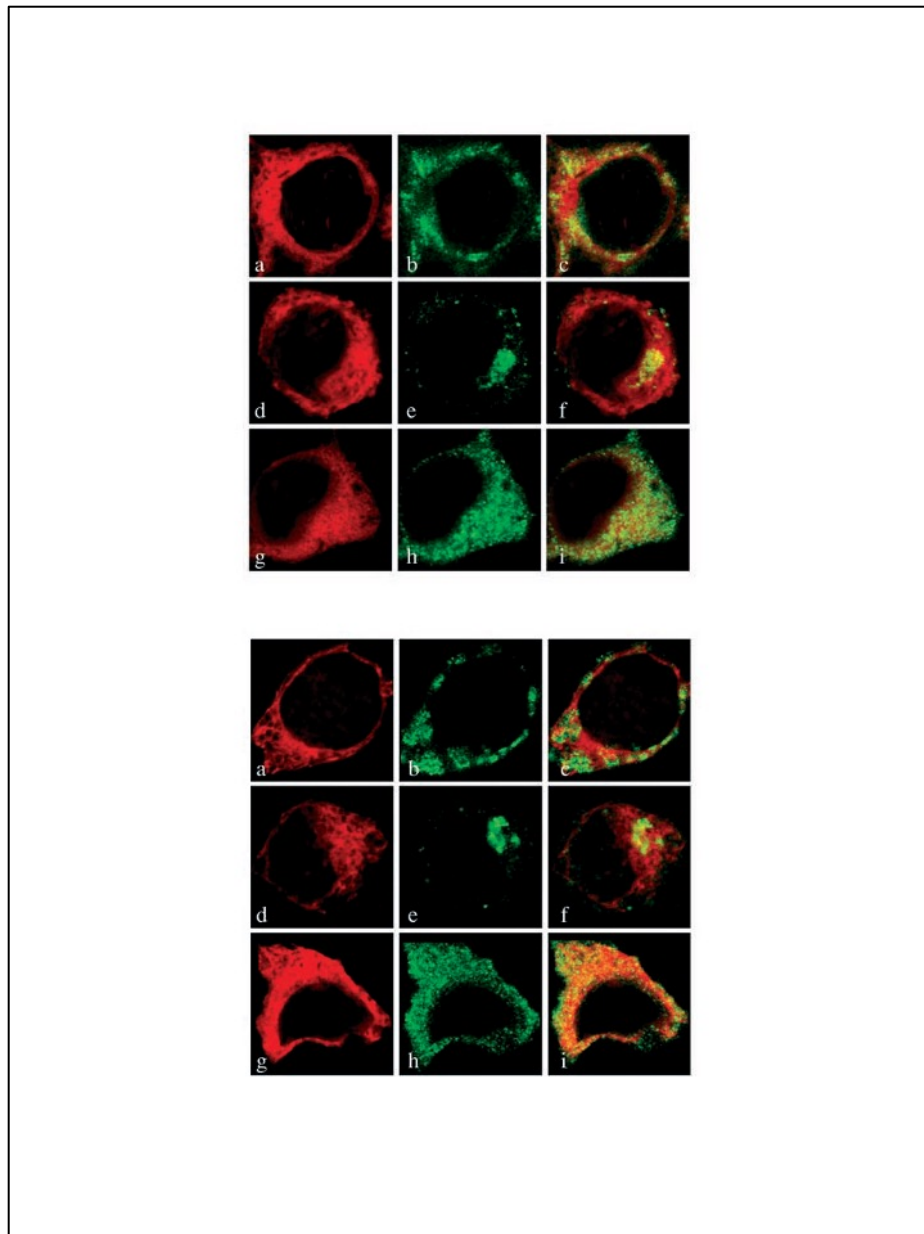
A mutáns FX intracelluláris sorsának követésére pulse-chase analízist alkalmaztunk. A [^{35}S]-metioninnal megjelölt – a radioaktív impulzust követően azonnal learatott sejtekben – immunprecipitált vad típusú FX széles és a mutánsnál erősebb sávként jelent meg (66-68 kD) a redukáló körülmények között készített fluorogramon. A követési periódus alatt, a további aratások során, a radioaktívan jelölt vad típusú FX mennyisége gyorsan csökkent a sejtizátumokban, ezzel párhuzamosan a nehéz és könnyű láncnak megfelelő sávok egyre erősebben jelentek meg a tápfolyadékból vett mintákban. Ezzel ellentétben az Arg244 FX-nek megfelelő sáv intenzitása 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, ami nem képes szekretálódni, felhalmozódik a sejtben, majd eliminálódik, feltehetően az intracelluláris proteázok által (**16. ábra**).



16. ábra. A vad típusú és mutáns FX intracelluláris sorsának követése pulse-chase analízissel.

NT, mock transzfektált sejtek; WT, vad típusú FX; M, mutáns FX; HC, nehéz lánc; LC, könnyű lánc; az inkubációs idő (min) a metabolikus jelölést követően az aratásig eltelt időt jelenti; a sejtizátumok esetében 5×10^5 sejt immunprecipitációja, a médiumok esetében $2,5 \times 10^5$ sejt felülúszójának immunprecipitációja történt; az SDS-PAGE redukáló körülmények között történt, minden helyen azonos mennyiségű fehérje felvitelével. (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. közleményünk alapján.)

A mutáns FX intracelluláris lokalizációjának meghatározására végzett kettős immunfluoreszcens jelölés és CLSM vizsgálatokban az Arg244 FX sem az endoplazmatikus retikulumot reprezentáló kalnexin-nel, sem a cisz-Golgit képviselő mannozidáz II-vel nem mutatott kolokalizációt, a transz-Golgit, késői endoszómát jelölő mannóz-6-foszfát receptorral azonban igen. A vad típusú FX esetében ilyen kolokalizációt sehol nem észleltünk. Az immunfluoreszcens vizsgálatok tanulsága szerint feltételeztük, hogy a mutáns FX, letérve a normál fehérjékre jellemző szekretoros útvonalról, a késői endoszóma felé irányítódik és a lizoszómális enzimek által degradálódik (17. ábra).



17. ábra. A vad típusú és a mutáns FX intracelluláris lokalizációjának vizsgálata kettős immunfluoreszcens jelöléssel, konfokális mikroszkópos felvételeken.

A felső blokk a vad típusú, az alsó blokk a mutáns FX intracelluláris elhelyezkedését reprezentálja. Az a-c ábrákon a FX (piros) és az endoplazmatikus retikulumot megjelenítő calnexin (zöld), a d-f ábrákon a FX (piros) és a cisz-Golgit megjelenítő mannozidáz II (zöld), a g-i ábrákon pedig a FX (piros) és a transz-Golgit megjelenítő mannóz 6-P receptor (zöld) immunfluoreszcens festéssel kapott képei láthatóak. A c, f, i ábrák a „merge” képeket mutatják mind a vad típus, mind a mutáns FX esetében. Mikroszkópos nagyítás 100x3,2. (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.közleményünk alapján.) (A kísérletek és az ezek alapján összeállított publikáció idején még nem álltak rendelkezésre azok a szoftverek, melyekkel numerikusan is megadható lett volna az egyes fluoreszcens jelölések közötti kolokalizáció mértéke. Ezt a lehetőséget a későbbi, hasonló vizsgálatainkban már ki tudtuk használni, amint azt az értekezésben később bemutatom.)

5.1.3.3 A p.Gly244Arg mutáció következményeinek vizsgálata in silico kísérletekben

A mutáció egy, a Cys241 és Cys246 között kialakult diszulfid híddal összekapcsolt kis hurokszerkezet egyik aminosavát (Gly244) érinti. A Cys241, Gly244 és a Cys246 erősen konzervált az evolúció során, sőt a FX-zel nagyfokú hasonlóságot mutató FVII-ben is megjelenik (18. ábra).

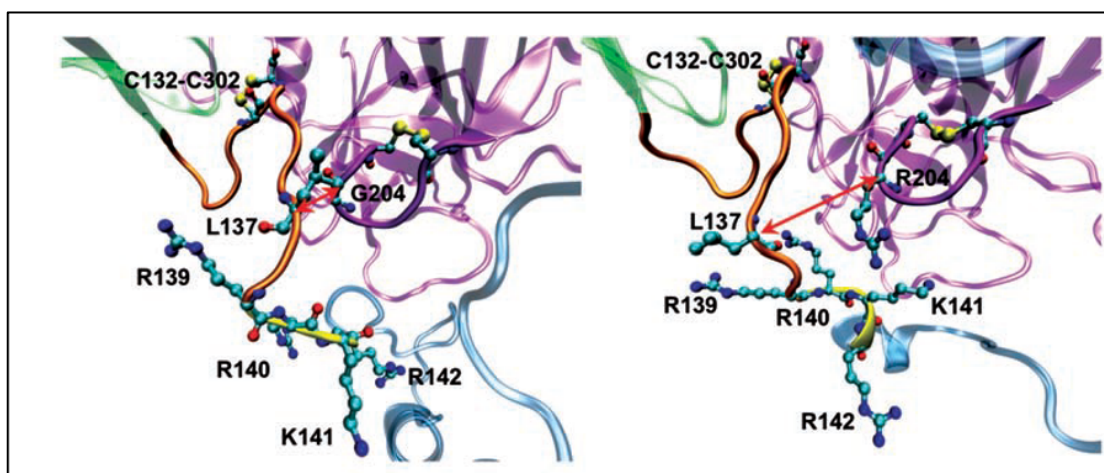
Accession No.	Protein:	Sequence:
P00742	Human FX	R I V G G Q E C K D G E C P W Q
Q88947	Mouse FX	R I V G G R E C K D G E C P W Q
Q63207	Rat FX	R I V G G Q E C K R G E C P W Q
O19045	Rabbit FX	R I V G G Q D C R D G E C P W Q
P00743	Bovine FX	R I V G G R D C A E G E C P W Q
Q9GMD9	Duckbill platybus FX	R I V G G R E C H D G E C P W Q
P81428	Troca FX	R I V N G M D C K L G E C P W Q
P83370	Hopst FX	I V N G M D S K L G E C P W Q
P25155	Chick FX	R I V G G D E C R P G E C P W Q
AAH56804	Zebrafish FX	R I V N G V E C P P G D C P W Q
AA033371	Fugu FX	R I V N G E D C P P G E C P W Q
P00740	Human FIX	R V V G G E D A K P G Q F P W Q
P08709	Human FVII	R I V G G K V C P K G E C P W Q
P00734	Prothrombin	R I V E G S D A E I G M S P W Q
Mutation		R I V G G Q E C K D R E C P W Q

18. ábra. A p.Gly244 (FX) és a környező molekularészlet konzerváltsága különböző fajokban és a FX-hez hasonló, K-vitamin függő alvadási faktorokban.

Félkövér betűvel vannak kiemelve a FX p.Cys241, p.Gly244 és a p.Cys246 pozícióinak megfelelő aminosavak.

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 a 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 (19. ábra).



19. ábra. A vad típusú (balra) és a p.Gly244Arg mutáns (jobbra) FX háromdimenziós szerkezete.

A szimulációhoz szükséges kiindulási szerkezetet a „Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Protein Data Bank” (www.rcsb.org) alapján készítettük. Az ábrán látható, a mutáció helyét, az azt körülvevő hurokszerkezetet és a könnyű lánc, valamint a nehéz lánc egyes részleteit magában foglaló molekularészletet tartalmazó geometriákat 7 ns szimulációnak vetettük alá (6 ns egyensúlyozás és 1 ns mintavételezés). Az eredményeket Visual Molecular Dynamics szoftverrel vizualizáltuk. Az EGF2 domén részletét zölddel, az aktivációs peptidet acélkékkel, a szerin proteáz domén részletet rózsaszínnel, az összekötő régiót narancssárgával ábrázoltuk. Mivel a molekulamodell az érett FX fehérjén történt, az aminosavak számozása itt a hagyományos, érett fehérjékre vonatkozó nomenklatura szerint történt. Az Arg180-Lys181-Arg182 tripeptidet (itt Arg140-Lys141-Arg142) sárgával ábrázoltuk. A számítások szempontjából lényeges aminosavakat golyó-pálca modellel ábrázoltuk (Cys172-Cys342, itt: Cys132-Cys302 és Cys241-Cys246, itt: Cys201-Cys206 diszulfid hidak). A 244 C α és a 177 C α (itt 204 C α és 137 C α) atomok közötti távolságot piros nyíl mutatja. (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. közleményünk alapján.)

Összefoglalva, a súlyos FX deficiencia hátterében detektált p.Gly244Arg mutáció patogén hatását indirekt (a mutáció hiánya hemosztázis szempontjából egészséges személyekben, a mutáció konzerváltsága, in silico analízis) és direkt (in

vitro expressziót követő biokémiai vizsgálatok) bizonyítékokkal támasztottuk alá. A mutáns FX a súlyos szerkezeti torzulások következtében letér a normális szekréciós útvonalról és intracellulárisan megreked, nem jut ki a keringésbe. Ezek alapján, összhangban a klinikai megjelenéssel és a laboratóriumi képpel, súlyos, I-es típusú, azaz kvantitatív FX deficienciát igazoltunk.

5.1.4 Hereditaer haemorrhagias teleangiectasia

5.1.4.1 *A kórkép rutin klinikai diagnosztikája*

Az északkelet-magyarországi régióból származó 34 HHT gyanús egyén (5 proband és 29 rokon személy) esetében alapos fül-orr-gégészeti vizsgálat, bőrön és nyálkahártyákon teleangiectasia (TA) meglétének vagy hiányának regisztrálása, agy kontrasztanyag MR, tüdő és máj CT az arteriovenosus malformációk (AVM) kimutatására, történt. A betegek felkutatása és klinikai kivizsgálása Dr. Major Tamás érdeme. A részletes családi anamnesis felvétel során hasonló klinikai tünetekkel rendelkező családtagok felkutatása is megtörtént. Ezek alapján a legalább 2 Curacao kritériumot teljesítő betegeknél a laboratóriumi vizsgálatok során az *ACVRL1* génben a c.625+1 G>C mutációt azonosítottuk (n=19 személy). A mutációval rendelkező betegek közül 13 esetben orrvérzéseket ($25 \pm 12,6$ évesek) és 14 esetben TA-kat ($39,5 \pm 13,7$ évesek) figyeltek meg. Az AVM jelenlétét 11 felnőtt esetében vizsgálták, 4 esetben a májban találtak AVM-kat. Szintén 4 esetben figyeltek meg nem-vérző gyomor- és nyombél TA-kat. Agyi és tüdő AVM-k nem fordultak elő ebben a betegcsoportban.

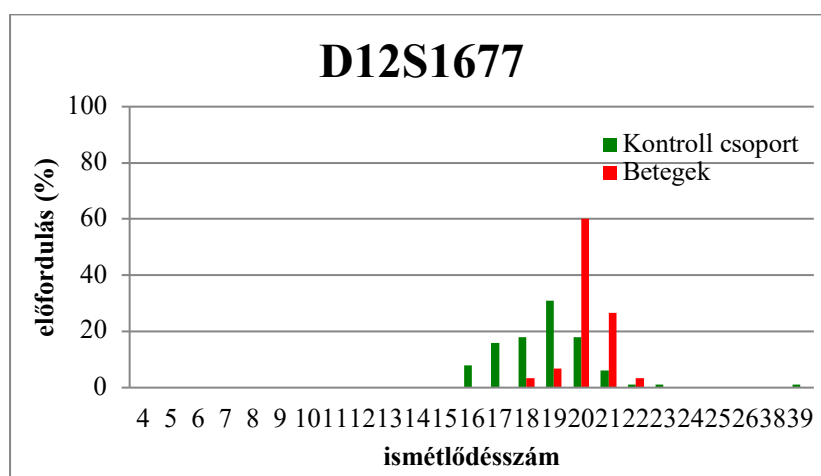
5.1.4.2 *Alapító mutáció igazolása hereditaer haemorrhagias teleangiectasiában*

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 egyén, 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 mindhárom SNP esetében az allélfrekvencia értékek a kontroll csoportban egyeztek a HapMap kaukázusi populációra vonatkoztatott adataival (rs2071219 esetén 0,56-HapMap adat, 0,54-kontroll csoport adat; rs706815 esetén 0,34-HapMap adat, 0,32-kontroll csoport adat; rs706816 esetén 0,34-HapMap

adat, 0,32-kontroll csoport adat), 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). Statisztikai analízisre nem került sor az alacsony esetszám miatt.

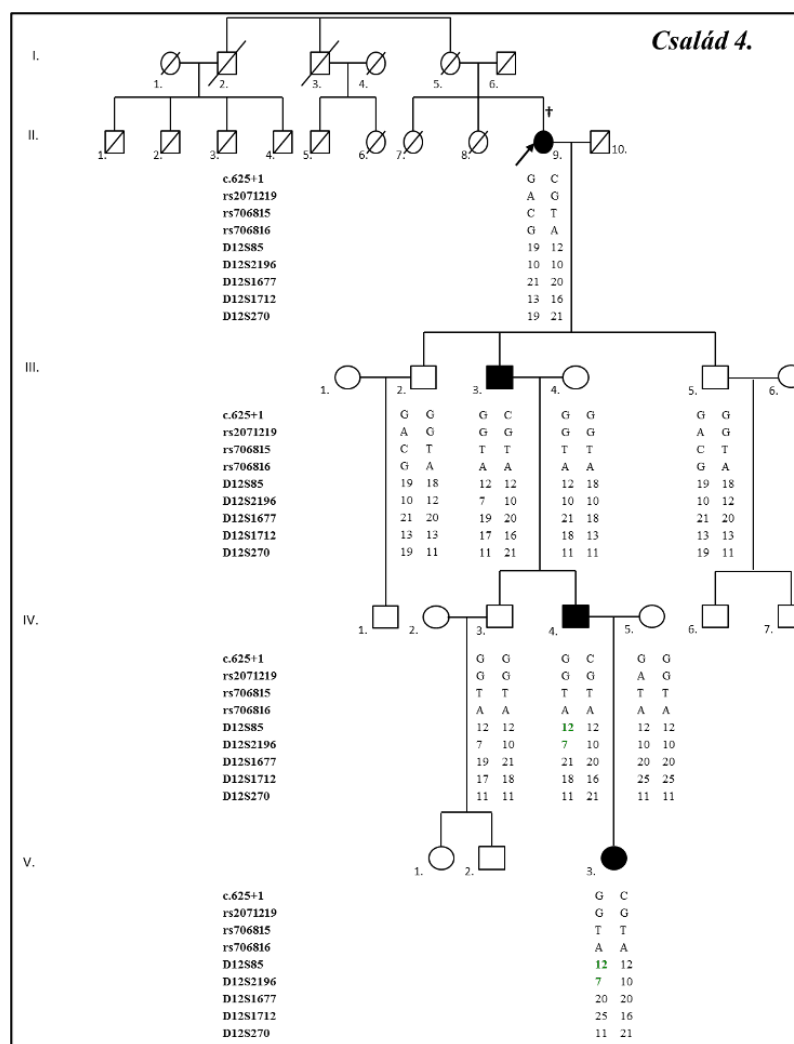
A mikroszatellita markerek detektálása során, az *ACVRL1* génhez viszonyítva egy intragénikus (D12S1677), 2 proximálisan (D12S85, D12S196) és 2 disztálisan (D12S1712, D12S270) elhelyezkedő STR vizsgálata történt. A D12S85 proximálisan és távolabb elhelyezkedő marker 12-es ismétlődésszáma fordult elő a betegek 80%-ában, míg a kontroll csoportban 11 és 38 közötti ismétlődésszámokat figyeltünk meg. A proximálisan, a génhez közelebb elhelyezkedő 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 intragénikus marker esetében a betegekben 60%-ban a 20-as, közel 25%-ban a 21-es ismétlődésszám jelent meg; míg a kontroll csoportban változatos ismétlődésszámokat regisztráltunk (**20. ábra**). A génhez közelebb elhelyezkedő, disztális D12S1712 mikroszatellita esetében a betegek több mint 60%-nál, illetve a kontroll egyének többségénél is a 16-os ismétlődésszám volt a leggyakoribb. A disztálisan és távolabb lévő D12S270 marker mind a betegek, mind a kontroll csoport vizsgálatakor változatos ismétlődésszámot mutatott.



20. ábra. Az *ACVRL1* intragénikus STR marker ismétlődésszámai az *ACVRL1* c.625+1 G>C mutációt hordozó betegek és egészséges kontroll személyek mintáiban.

zsbereczky_271_24

Az öt, *ACVRL1* c.625+1 G>C mutációt hordozó családban az elérhető családtagok klinikai és genetikai vizsgálatával szemléletes családfákat készítettünk, melyekben ábrázoltuk az SNPk és STR markerek detektálásával kapott haplotípusokat is. Megfigyeltük, hogy a mutáns, c.625+1C allélhez ugyanazon haplotípus tartozott. Példaképpen a 4. családot mutatom be (21. ábra).

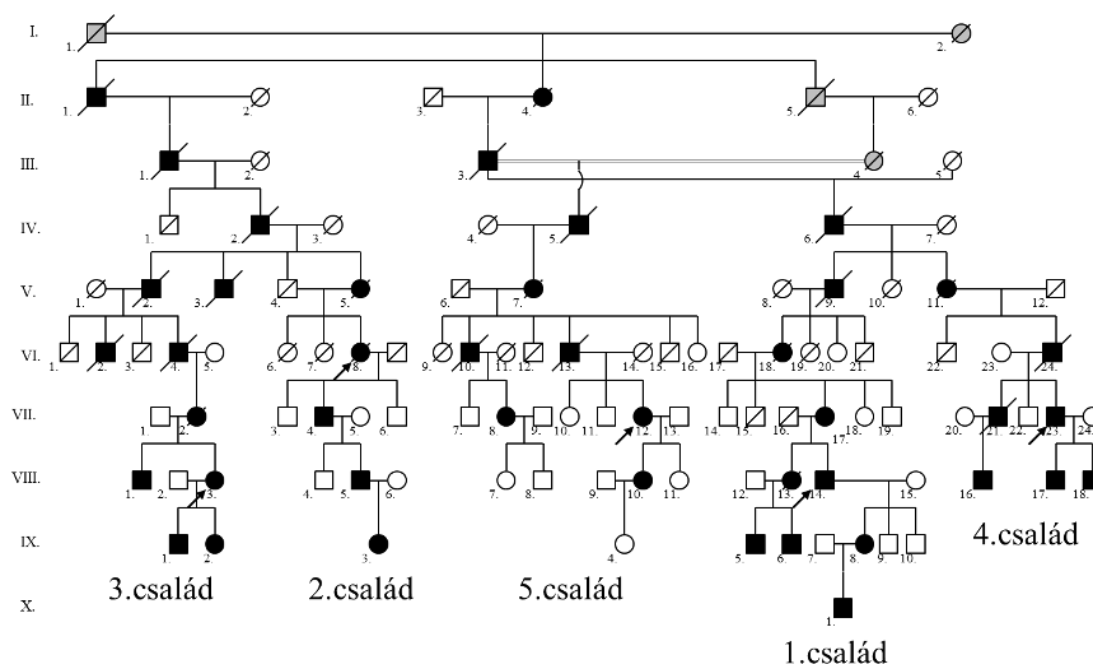


21. ábra. Az *ACVRL1* c.625+1 G>C mutációt hordozó 4. család családfa térképe a jellegzetes haplotípusokkal feltüntetve.

Az ábrán a klasszikus családfa jelöléseket használtuk. Fekete szimbólum: érintett személy. Üres szimbólum: nem érintett személy. A probandot nyíllal jelöltük. Az áthúzott szimbólumok elhunyt személyeket jelölnek. Genetikai vizsgálat csak azon személyek esetében történt, akik szimbóluma alatt a genetikai markerek eredménye fel van tüntetve. A zöld színnel jelölt ismétlődésszámok rekombinációra utalnak.

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. Ennek eredményeképpen egy olyan házaspárt találtak, akik 1779-ben kötöttek házasságot a leszármazottak mai lakóhelyétől körülbelül 30 km-re. Az alábbi ábrán a geneológiai elemzés eredménye alapján készített, és az öt családot egy közös ősré visszavezető családfa látható, ami a geneológus, Bárdossy Péter munkája volt (22. ábra).



22. ábra. Az *ACVRL1* c.625+1 G>C mutációt hordozó 5 család közös ősré visszavezethető családfája.

A családfán a klasszikus szimbólumokat alkalmazzuk, hasonlóan az előző ábrához. (Major, T., Gindele, R., Szabó, Z., Alef, T., Thiele, B., Bora, L., Kis, Z., Bárdossy, P., Rácz, 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. közleményünk alapján.)

Összefoglalva, a 12-es kromoszóma q13,11 - q13,13 régiójában 8 polimorf marker alkalmazásával bizonyítottuk az *ACVRL1* c.625+1 G>C mutáció alapító hatását. A mutáns „C” allél mellett egyazon haplotípus volt megfigyelhető. A vizsgált 8 polimorf marker ugyanazon kromoszómán, egymáshoz közel helyezkedik el és kapcsolt öröklődést mutat. A családfakutató segítségével megtalált házaspár, 1779-ben feljegyzett házasságkötéssel, nem feltétlenül jelenti azt, hogy ők voltak a mutáció alapítói, de az 5 családról egyértelműen bizonyította a rokonságot.

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 – ismerve genotípus-fenotípus összefüggéseket HHT-ben – az adott gén adott mutációjának hordozása alapján megjósolható a tünetek megjelenésének ideje, spektruma, súlyossága. Az alapító mutáció megjelenése egy régióban markánsan megváltoztathatja a betegség prevalenciáját, ami esetünkben a HHT-vel kapcsolatos vizsgálataink kezdete óta egyértelműen tapasztalható. Alapító mutációkat HHT-ben más populációkban is leírtak. Szisztematikus irodalom kutatásunk eredményeképpen napjainkig 12 *ENG* és 26 *ACVRL1* alapító mutációt találtunk, amit egy összefoglaló közleményben publikáltunk a közelmúltban [424].

5.1.4.3 *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 jár, 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. Egy relatíve nagy tanulmány szerint az első tünetek megjelenésétől számítva a HHT diagnózisáig átlagosan 29,1 év telik el, ami óriási diagnosztikai hiányosságról árulkodik nemzetközi szinten is [194]. 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 felkutattuk és bevontuk a régió HHT betegeit. Megszerveztük a komplex diagnosztikai és terápiás ellátásukat, és edukációs céllal, a hazai kollégák tájékoztatására egy saját diagnosztikai tapasztalatainkon alapuló magyar nyelvű közleményt publikáltunk [425].

A diagnosztika során – a fizikális vizsgálatot és anamnesist követően – a Curacao kritériumok közül legalább kettő megléte (orrvérzések, teleangiectasiák, első fokú rokon HHT-vel) esetén visceralis AVM szűrésen esnek át a beválogatott betegek (CT, MR, gastrointestinalis vérzés gyanúja esetén endoszkópos vizsgálat), majd megtörténik az okozati mutáció keresése Sanger szekvenálással, vagy NGS

módszertannal, ezek negativitása esetén MLPA analízissel. A talált eltérés okozati kapcsolatát a HHT fenotípussal a HGMD, ARUP adatbázisok alapján, új mutáció esetén pedig a predikciós szoftverekkel (Polyphen2, HumDiv, HumVar, MutPred2, SIFT) és koszegregáció analízissel igazoljuk. A probandok diagnózisát követően kaszkád szerű családszűrést végzünk, ahol (tájékozott beleegyezést követően) kötelező jelleggel szűrjük a proband elsőfokú rokonát, vagy olyan személyt, aki legalább 2 Curacao kritériumnak megfelel, és annak elsőfokú rokonát. A továbbiakban (a kaszkád elvnek megfelelően) fakultatív jelleggel szűrjük azokat a személyeket, akik tünetmentesek, de elsőfokú rokonuk kötelező jelleggel történő szűrés során mutációhordozónak bizonyult. 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; mindössze két családnál nem azonosítottunk eltérést a vizsgált génekben. A magas mutáció detektálási arány a Curacao kritériumok szigorú alkalmazásának volt köszönhető és az irodalomban is – a kritériumrendszer hasonlóan szigorúan alkalmazó centrumokban – ugyanezt az arányt látjuk [426]. Összegezve, az *ENG/ACVRL1* mutáció aránya a vizsgált hazai 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

5.1.5.1 *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. Ritkán előfordul azonban, hogy nyilvánvaló klinikai tünetek ellenére nem találjuk meg az okozati eltérést sem az *ENG*, sem az *ACVRL1* génben. Az Osler-kórral, vagy Osler-kór szerű fenotípussal kapcsolatba hozható további gének (*SMAD4*, *GDF2*, *RASAI*) vizsgálatát ezért beépítettük a „Hemorrhagias diathesisek_1” panelünkbe (*ACVRL1*, *ENG*, *SMAD4*, *GDF2*, *RASAI*, *F5*, *F8*, *FGA*, *FGB*, *FGG*, *KLKB1*, *ADAMTS13*, *GP1BA* és *VWF*, ld. „Módszerek” fejezet). Eddig két olyan probandot találtunk, ahol sem az *ENG*, sem az *ACVRL1* gén 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 orrvérzéseről. A 64 éves beteg 3 pozitív Curacao kritériummal rendelkezett (epistaxis, teleangiectasia, pozitív családi anamnesis). Az ő esetében a *SMAD4* c.7A>G (p.Asn3Asp) új, valószínű patogén mutációt detektáltuk heterozigóta formában. A 62 éves beteg családi anamnesise negatív volt, mucocutan teleangiectasiákat sem lehetett detektálni. Az AVM keresés nasopharingoscopiával, orr-melléküreg CT-vel és agyi CT-angiographiával szintén negatív eredményt hozott. Így az ő esetében valójában csupán egy kritérium megléte volt bizonyítható. Laboratóriumi vizsgálatainkat kiterjesztettük ezért coagulopathia és thrombocyta funkció zavar irányú vizsgálatokra is, de ezek mind negatív eredménnyel zárultak. 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 génnek 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. Az Osler-kórhoz hasonló, az életminőséget jelentősen rontó tüneteket mutató betegekben szintén fontos a betegség hátterének pontos tisztázása. 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.

5.1.5.2 Differenciáldiagnosztikai problémák megoldása és tudományos szempontból érdekes esetek von Willebrand betegségben

A kezdeti laboratóriumi vizsgálatok alapján vWD gyanújával n=63 beteget toboroztunk. Közülük n=4 beteg a részletes laboratóriumi és genetikai vizsgálat eredményeképpen haemophilia A betegnek bizonyult, n=3 esetben pedig vWD esetek tünetmentes és normál laboratóriumi eredményeket mutató családtagjairól volt szó, így végül vWD diagnózisával n=56 beteget láttunk el. A betegek laboratóriumi

paramétereit és klinikumát bemutató összefoglaló táblázat adatai alapján megállapítottuk, hogy a végső diagnózis felállításáig eltelt idő igen heterogén volt, a legfiatalabb beteg 2 éves (2M típus), a legidősebb 76 éves (2N típus) volt a definitív, genetikai vizsgálattal alátámasztott diagnózis idején (**VIII. Táblázat**). Minden altípusban női dominancia volt megfigyelhető. Az index esetek kb. 80%-ában vérzéses tünet jellemzően megfigyelhető volt, ezen belül a 2M és 3-as típusok esetében minden beteg vérzékeny volt. Ahogyan az várható volt, a 3-as típusban mutattak legalacsonyabb értéket a vWD paraméterek, míg a 2B és 2N esetekben a vWF:Ag szint általában normál volt. A vWF:Ac legalacsonyabb értékeket a 2A és 2M esetekben mutatta, míg 2B és 2N típusokban általában normál volt. A vWF:CB abnormál értéke a 2M esetek kitűnő markerének bizonyult. A FVIII aktivitása (FVIII:C) a 2N esetekben – várható módon – csökkent, de néhány egyéb funkcionális vWD altípusban is találtunk csökkent FVIII szinteket. A vWF:FVIII:B értéke minden 2N típusban kórosan alacsony volt. A vWF:Ac/vWF:Ag arány 2A típusban mutatta a legalacsonyabb értéket, de a többi altípushoz viszonyítva (feltehetően a relatíve alacsony elemszám miatt) a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns. A FVIII:C/vWF:Ag arány 2N típusban volt a legalacsonyabb. A multimerek analízise során minden 2A esetben igazolni tudtuk a nagy multimerek hiányát, míg a 2B esetek egy részében normál multimer mintázatot detektáltunk, atípusos 2B vWD jelenlétét sugallva. A multimerek mintázata minden egyéb vWD típusban normál volt.

VIII. Táblázat. A von Willebrand betegségben szenvedők klinikai és laboratóriumi jellemzői.

	vWD betegek n=54	vWD probandok n=34	Type 1 n=5	Type 2A n=6	Type 2B n=7	Type 2M n=6	Type 2N n=7	Type 3 n=3	p érték§
nő/férfi (%)	35/21 (65/35)	24/10 (71/29)	4/1 (80/20)	4/2 (67/33)	5/2 (71/29)	4/2 (67/33)	4/3 (57/43)	3/0 (100/0)	0,898
Jelen életkor medián év (tartomány)	39 (4-78)	34 (4-77)	37 (29-45)	24 (13-44)	45 (21-75)	64 (4-76)	18 (15-77)	32 (32-55)	0,045
Median életkor a genetikai dg idején év (tartomány)	35 (2-76)	33 (2-75)	35 (27-43)	19 (11-42)	41 (13-73)	62 (2-74)	17 (10-75)	30 (30-53)	0,058
vWF:Ag (%)	42 (3-219)	39 (<3-125)	38 (32-42)	38 (12-77)	58 (25-125)	14 (7-88)	48 (16-96)	<3 (<3-20)	0,013
vWF:Ac (%)	34 (4-218)	29 (<4-107)	34 (29-46)	14 (7-70)	49 (13-104)	12 (5-20)	52 (17-107)	<4 (<4 - <10)	0,005
vWF:CB (%)	51 (6-221)	30 (6-151)	33 (30-36)	20 (6-65)	58 (16-91)	12 (7-14)	61 (24-151)	ND	0,102
FVIII:C (%)	43 (1-148)	33 (<1-148)	63 (47-69)	44 (32-148)	76 (33-147)	18 (7-36)	18 (8-24)	<1 (<1-4)	<0,001
VWF:FVIII:B (%)	30 (4-123)	14 (<1-80)	ND	80	ND	ND	13 (<1-37)	ND	ND
vWF:Ac/vWF:Ag	0,85 (0,13-3,33)	0,91 (0,16-3,33)	0,91 (0,79-1,28)	0,54 (0,33-0,91)	0,84 (0,36-1,12)	1,01 (0,16-2,29)	1,05 (0,84-1,17)	1,33 (0,20-3,33)	0,146
vWF:CB/vWF:Ag	0,99 (0,16-1,71)	0,90 (0,16-1,71)	0,84 (0,79-0,90)	0,71 (0,50-0,84)	0,99 (0,34-1,21)	0,62 (0,16-1,71)	1,33 (0,98-1,57)	ND	0,239
FVIII:C/vWF:Ag	1,00 (0,2-3,7)	1,21 (0,05-3,70)	1,82 (1,12-1,97)	1,51 (0,42-3,70)	1,21 (0,74-1,81)	1,44 (0,20-2,12)	0,42 (0,20-0,57)	0,33 (0,05-1,33)	0,002
Vérzések tüneteket mutató betegek aránya* (%)	35/54 (65,0%)	26/34 (76,5%)	3/5 (60,0%)	4/6 (66,7%)	6/7 (85,7%)	6/6 (100%)	4/7 (57,0%)	3/3 (100%)	0,306

A haemophilia A (n=4) betegek és a nem érintett családtagok (n=3) nem szerepelnek a táblázatban.

Referencia tartományok vWF:Ag, vWF:Ac, vWF:CB, FVIII:C és vWF:FVIII:B esetében rendre 50-160%, 61-179%, 60-130%, 60-150% és >40%.

**epistaxis, foghúzást/traumát/sebészi beavatkozást követő vérzések, bőrvérzések, menorrhagia, post-partum vérzés, köldök vérzés, gastrointestinalis vérzés, retina vérzés, fogíny vérzés, izom közti hematoma, nem definiált vérzés*

ND, nincs adat

§a jelen életkor és a genetikai diagnózis felállítása idején regisztrált életkor szignifikánsan magasabb volt a 2M probandokban a type 1, 2B és 2N probandokhoz viszonyítva. vWF:Ag és vWF:Ac szignifikánsan alacsonyabb volt a type 3 probandokban a 2B és 2N probandokhoz viszonyítva, valamint a 2M probandokban a 2B és 2N probandokhoz viszonyítva. vWF:Ac szignifikánsan alacsonyabb volt a 2A probandokban a 2N-hez viszonyítva. FVIII:C szignifikánsan alacsonyabb volt a type 3, 2M és 2N probandokban a type 1, 2A és 2B esetekhez képest. FVIII:C/vWF:Ag arány szignifikánsan alacsonyabb volt a 2N probandokban a type 1, 2A és 2B probandokhoz viszonyítva.

(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. közleményünk alapján.)

Az eredmények további ismertetésénél az értekezésben csupán a funkcionális vWD esetekre térek ki, azon belül is csak azokra, ahol eredményeink a szakterület fejlődése szempontjából tanulsággal szolgáltak.

- Differenciáldiagnosztikai problémákat jelentő vWD 2B esetek

Fenti táblázatból látható, hogy $n=7$ egymással nem rokon beteg esetében diagnosztizáltunk végső soron 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 koaguláció szűrőtesztjei, és a thrombocyta szám és funkció sem mutattak eltérést. A plazma mintákból (melyek fagyaszthatók és szállíthatók) elvégzett vWD irányú vizsgálatok rendre normál eredményekkel zárultak beleértve a vWF:Ag, vWF:Ac, vWF:CB, FVIII:C paramétereket és a multimer analízis eredményeit is. Egyes esetekben enyhén csökkent értékeket, de 1 körüli vWF:Ac/vWF:Ag és FVIII:C/vWF:Ag rátákat találtunk, kizárva a funkcionális defektus gyanúját (IX. Táblázat).

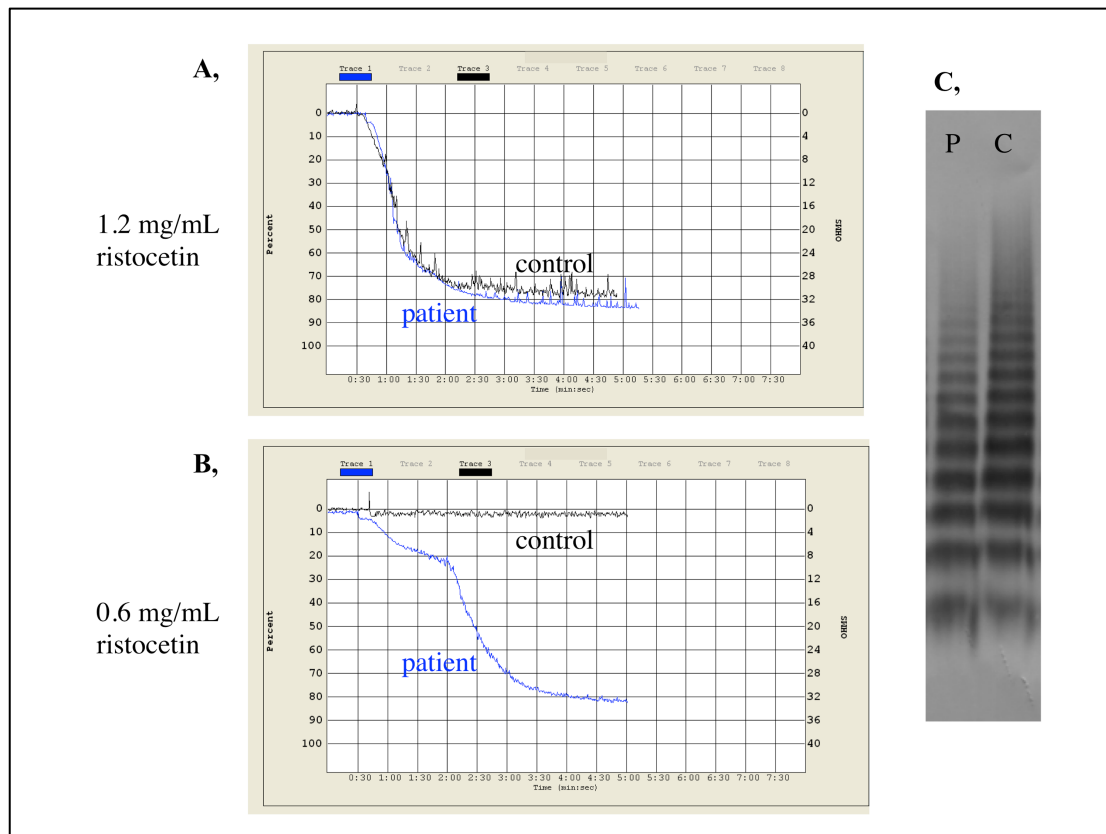
IX. Táblázat. vWD 2B típus differenciáldiagnosztikai problémát jelentő esetei.

sorszám	Nem (kor, év)	vWF:Ag (%)	vWF:Ac (%)	vWF:CB (%)	FVIII:C (%)	tünet
8/1	N (34)	42	47	51	76	fogínyvérzés, postoperatív vérzés
9/1	N (51)	58	49	ND	43	epistaxis, menorrhagia, postpartum vérzés
10/1	N (21)	125	104	ND	147	menorrhagia
10/2	F (49)	127	101	ND	102	tünetmentes
10/3	N (42)	140	136	ND	110	tünetmentes
11/1	F (46)	80	73	91	96	foghúzás utáni vérzés

Referencia tartományok: vWF:Ag 50-160%, vWF:Ac 61-179%, vWF:CB 60-130%, FVIII:C 60-150%. A multimer analízis normál multimer szerkezetet mutatott minden esetben. 10/2 személy az édesapja, 10/3 személy az édesanyja 10/1-nek. 10/3 személy (paraméterei dőlt betűvel szedve) nem mutációhordozó.

Amennyiben pusztán a plazmában vizsgálható (fenti) paraméterekre hagyatkoztunk volna, a 10 és 11 sorszámú betegekben elvetettük volna a vWD lehetőségét, a 8 és 9 sorszámú betegekben kvantitatív vWD lehetőségét vetettük volna fel. Elvégezve azonban a risztocetin indukálta thrombocyta aggregáció vizsgálatát

(RIPA) a betegek thrombocyta dús plazmaíban, személyes megjelenést igénylő, frissen történő mintavételből, rendre fokozott RIPA volt megfigyelhető az alacsony, 0,6 mg/mL koncentrációjú risztocetin jelenlétében is (23. ábra).



23. ábra. Risztocetin indukálta thrombocyta aggregáció és multimer analízis eredménye atípusos 2B vWD esetén.

Az ábra a 10/1 sorszámú beteg eredményeit mutatja.

A, Normál RIPA eredmény 1,2 mg/mL risztocetin jelenlétében (késsel a beteg, feketével a kontroll személy aggregációs görbéje látható).

B, Fokozott RIPA 0,6 mg/mL risztocetin jelenlétében (késsel a beteg, feketével a kontroll személy aggregációs görbéje látható).

C, Normál multimer szerkezet az SDS-agaróz gél elektroforézisen (P, beteg; C, kontroll).

(Gindele, R., Kerényi, A., Kállai, J., Pfliegler, G., Schlammadinger, Á., Szegedi, I., Major, T., Szabó, Z., Bagoly, Z., Kiss, C., Kappelmayer, J., Berezky, 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. közleményünk alapján.)

A vWD kivizsgálása során a RIPA az egyetlen olyan vizsgálat, ami csak frissen nyert vérmintából, a beteg thrombocyta dús plazmájából végezhető el. A vWD kivizsgálása során ezért, ha eltekintenek a RIPA elvégzésétől – ami gyakran előfordul,

ha a beteg kivizsgálása távoli laboratóriumban történik fagyasztva szállított thrombocytaszegény plazmában – előfordulhat, hogy a vWD diagnózisát nem sikerül felállítani, vagy a betegség típusának pontos megállapítása nem sikerül. A fentebb bemutatott esetekben, különösen a 10 és 11 sorszámú index személyek esetén a RIPA elmulasztása teljesen elterelte volna a gyanút a vWD lehetőségéről. A betegek genetikai vizsgálata 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 típusú történő asszociációt kell irányadónak tekinteni. Ennek a megkülönböztetésnek a betegek terápiája szempontjából ugyanis jelentősége van.

A genetikai vizsgálat segítette felállítani a 2B típusú vWD diagnózisát egy olyan betegnél, aki korábban éveken át ITP diagnózissal volt számon tartva, alacsony thrombocytaszáma miatt. A munkacsoportunkhoz kerülés időpontjában 59 éves nőt gyermekkora óta gondozták mint ITP beteget, sőt édesanyjánál is hasonlóan csökkent thrombocytaszámot jegyeztek fel, ő korán elhunyt intracranialis vérzés miatt 26 éves korában, szülés után 6 héttel. Esetét akkor ITP-nek véleményezték. A mi betegünk kisgyermek kora óta súlyos orrvérző volt, szteroidterápiát indítottak, hatástalanul. Kilenc éves korában végül lépetávoltításra került sor, ami tulajdonképpen a thrombocytaszámán nem változtatott érdemben, 20-30 G/L közötti értékei voltak továbbra is. A szteroidterápia végül leállításra került és eltrombopag (trombopoietin receptor analóg) kezelés indult, amit LDH emelkedés miatt hamarosan abba kellett hagynia. A beteg továbbra is gyakori epistaxisoktól és menorrhagiától szenvedett, kórházi felvételeket is gyakran igényelve. Negyvenöt éves korában perifériás artériás érelzáródás miatt (a. iliaca externa, a. iliaca communis, a. femoralis prof et spf.) érsebészeti műtétre lett volna szükség, amit az alacsony thrombocytaszám miatt nem vállaltak, és romiplostint (szintén trombopoietin receptor analóg) indítottak, amit LDH emelkedés miatt szintén gyorsan leállítottak. Ekkor felmerült a TTP diagnózisa, a beteg thrombocytaszáma ekkor – citráttal, EDTA-val és heparinnal antikoagulált vérmintában egyaránt – 12-17 G/L volt. A perifériás kenetben thrombocytágyagregátumok voltak megfigyelhetőek, óriás thrombocyták nem voltak detektálhatóak (MPV normál volt). Laboratóriumunkban a vWF:Ag 239%, a vWF:Ac 31%, a vWF:CB 56%, a FVIII:C 135% volt, funkcionális vWF defektust sejtetve. (A jelentősen

emelkedett vWF:Ag és FVIII:C értékekhez hozzájárulhatott a krónikus alsó végtagi gyulladás is.) A RIPA vizsgálat fokozott aggregációt jelzett alacsony dózisu risztocetin jelenlétében, ami a keverékes vizsgálatban kontroll thrombocyta és a beteg thrombocyta szegény plazmájának jelenlétében is kiváltható volt, de hiányzott a beteg thrombocytainak normál plazmával történő keverékében. Mindez arra utalt, hogy nem thrombocyta eredetű jelenségről, hanem sokkal inkább a beteg von Willebrand faktorához köthető problémáról van szó. Elvégezve a multimerek analízisét, a nagy méretű multimerek egyértelmű hiányát észleltük. Az NGS panelben lévő, erre a differenciáldiagnosztikai problémát jelentő esetre releváns gének közül a *GP1BA* és *ADAMTS13* génekben eltérést nem detektáltunk, a *vWF* génben azonban két heterozigóta eltérést is azonosítottunk. Az egyik az A1 domént érintő p.Ala1461Pro (c.4381G>C), a másik a D2 domént érintő p.Ala594Gly (c.1781C>G). Utóbbi ismert és I-es típusú vWD-t okozó mutáció, előbbi új mutáció, 2B vWD-nek megfelelő doménben található. Öt különböző mutáció predikciós analízist elvégezve (PolyPhen2 HumDiv score 0,999 valószínű patogén; PolyPhen2 HumVar score 0,990 valószínű patogén; MutPred2 score 0,504 határérték; SIFT score 0,00 patogén; Mutation Taster okozati mutáció) a talált eltérés patogénnek tekinthető. Azt, hogy a két mutáció cisz, vagy transz helyzetben található, sajnos nem tudtuk megállapítani, mivel a beteg szülei már nem élnek, gyermeke nincs, egyéb rokonai sem voltak elérhetőek. A beteget laboratóriumi fenotípusa alapján egyértelműen a 2B vWD típusba tudtuk sorolni, amit a talált új mutáció megerősített, valamint a *GP1BA* és *ADAMTS13* gének normál szekvenciája alapján ki tudtuk zárni a thrombocyta típusú vWD-t (pszeudo-vWD) és a veleszületett TTP-t is.

A vWD 2B típusának diagnózisa – amint azt fenti esetbemutatusaink is jól tükrözik – a mai napig kihívásokat jelent még a tapasztalt hematológusok és legfelszereltebb laboratóriumok számára is. Munkacsoportunk felhívta a figyelmet arra, hogy normál multimer szerkezet és normál vWD paraméterek mellett RIPA elvégzése nélkül nem vethető el a vWD diagnózisa, valamint arra, hogy a familiaris thrombocytopeniával járó esetek egy részében valójában a vWD 2B típusával időnként együtt járó thrombocyta konszumpció állhat e laboratóriumi eltérés hátterében és – elkerülendő az ITP elhamarkodott diagnózist és a felesleges lépeltávolítást, valamint a feleslegesen alkalmazott hatástalan, ugyanakkor nem veszélytelen farmakológiai terápiát – a vWD részletes kivizsgálásának meg kell előznie a további lépéseket.

Diagnózisainkat minden esetben genetikai vizsgálatokkal támasztottuk alá, felhívva a figyelmet arra is, hogy a 2B vWD molekuláris szintű kivizsgálása során célszerű a *vWF* gén mellett a differenciáldiagnosztikai szempontból problémát jelentő kórképek génjeinek (*GP1BA* és *ADAMTS13* gének) egyidejű vizsgálata is.

- Differenciáldiagnosztikai problémákat jelentő vWD 2N esetek

Kohorszunkban $n=11$ családot vizsgáltunk markánsan alacsony FVIII:C szintek miatt. Az esetek zömében a vWD 2N háttérében gyakran álló p.Arg854Gln, D' domént érintő eltérést találtuk homozigóta formában ($n=2$ család), vagy összetett heterozigóta állapot egyik mutációjaként ($n=4$ család) (a vWD 2N kivételesen autoszomalis recesszív öröklésmentet követ) (X. Táblázat). Az összetett heterozigóta esetekben a p.Arg854Gln különböző okozati mutációkkal társult, köztük kvantitatív vWD-ben leírt variánsokkal is. A p.Arg854Gln és egyéb okozati mutációk mellett a benignus p.Thr789Arg négy családban volt kimutatható. Váratlan leletként haemophilia A (HA) jelenlétét igazoltuk négy, kezdetben vWD 2N esetnek véleményezett betegben, ahol 2 nőbetegnél HA hordozó állapotot (FVIII:C 65%, ill. 55%), két férfibetegnél pedig hemizigóta, misszensz mutációkat találtunk és közepsúlyos HA-t igazoltunk (FVIII:C 3%, ill. 4%).

A vWD 2N és a HA elkülönítése nem mindig egyértelmű. Amennyiben a vWD 2N típusú mutáció kvantitatív vWD variánssal jár együtt, akkor a laboratóriumi kép még bonyolultabb. A FVIII:C szint HA-ban és vWD 2N típusban is rendkívül alacsony lehet, és a FVIII:C/vWF:Ag arány a két betegségben megegyező lehet (0,6 alatti). A vWF:FVIII:B tud különbséget tenni a két állapot között, de az egyértelmű diagnózis felállításához a genetikai vizsgálat sokat segíthet. Eseteinkben a p.Arg854Gln mutáció volt a leggyakoribb akár homozigóta, akár összetett heterozigóta formában. Érdeemes megemlíteni, hogy e mutáció gyakran kombinálódik más 2N típust okozó eltérésekkel vagy egyéb vWD típusokhoz vezető mutációkkal. Utóbbi esetekben kombinált laboratóriumi fenotípus jelenik meg, ami megnehezíti a diagnosztikát. Végül, a genetikai diagnózist követően négy esetet HA kategóriába soroltunk át.

zsbereczky_271_24

X. Táblázat. vWD 2N típus és haemophilia A kategóriába átsorolt eseteink.

azonosító	Nem (kor, év)	vWF:Ag (%)	vWF:Ac (%)	vWF:CB (%)	FVIII:C (%)/ vWF:FVIIIIB (%)	tünet	genotípus
20/1	N(33)	62	52	61	14/37	epistaxis	p.Thr789Ala p.Arg924Gln
21/1	F(16)	39	41	44	18/13	postoperatív vérzés	p.Leu757Valfs*22 p.Thr789Ala p.Arg854Gln
21/2	N(9)	119	145	151	107	tünetmentes	p.Thr789Ala p.Arg854Gln
21/3	F(13)	88	113	121	96	tünetmentes	p.Thr789Ala p.Arg854Gln
21/4	N(43)	46	45	51	78/110	menorrhagia	p.Leu757Valfs*22
21/5	F(44)	113	128	151	74	tünetmentes	p.Thr789Ala p.Arg854Gln
21/6	N(68)	39	39	42	13/14	ismeretlen vérzékenység	p.Leu757Valfs*22 p.Thr789Ala p.Arg854Gln
22/1	N(18)	16	17	24	8/14	tünetmentes	p.Arg854Gln c.3379+1G>A
22/2	F(15)	147	100	117	119/67	tünetmentes	p.Arg854Gln p.Thr789Ala
23/1	N(15)	96	107	151	19/4	tünetmentes	p.Thr789Ala p.Arg854Gln p.Tyr795Cys
23/2	F(55)	219	218	221	132/43	tünetmentes	p.Tyr795Cys
23/3	N(50)	70	69	104	51/52	tünetmentes	p.Thr789Ala p.Arg854Gln
23/4	N(18)	149	144	169	115/57	tünetmentes	p.Thr789Ala p.Tyr795Cys
24/1	N(18)	53	53	ND	22/1	tünetmentes	p.Arg854Gln HOZ
24/2	N(43)	182	151	ND	93/15	tünetmentes	p.Arg854Gln
24/3	F(44)	93	94	ND	57/24	tünetmentes	p.Arg854Gln
25/1	F(22)	48	56	64	15/14	epistaxis, traumás és postoperatív vérzés	p.Arg854Gln HOZ
26/1	F(77)	42	41	ND	24/12	epistaxis, CNS vérzés	p.Arg854Gln p.Arg1779STOP
27/1	N(18)	67	62	71	65	traumás vérzés, bőrvérzés	F8 p.Arg355Gln
28/1	F(10)	75	70	63	4	tünetmentes	F8 p.Ala723Thr HEMIZIGÓTA
29/1	N(48)	129	131	123	55/95	epistaxis, menorrhagia, postoperatív vérzés	F8 Asn1460fs*5

zsbereczky_271_24

30/1	F(25)	181	167	ND	3/127	Epistaxis, foghúzás utáni vérzés, haemarthrosis, im vérzés	F8 p.Arg1708Cys HEMIZIGÓTA
------	-------	-----	-----	----	-------	--	-------------------------------

21/1 testvérei: 21/2 és 21/3, szülei 21/4 és 21/5, anyai nagymama: 21/6. 22/1 testvére: 22/2. 23/1 szülei: 23/2 és 23/3, testvére 23/4. 24/1 szülei: 24/2 és 24/3. im vérzés: intramuscularis vérzés. ND: nincs meghatározva. Referencia tartományok: vWF:Ag 50-160%, vWF:Ac 61-179%, vWF:CB 60-130%, FVIII:C 60-150%. vWF:FVIII >40%. A multimer analízis normál multimer szerkezetet mutatott minden vizsgált esetben. A genotípus oszlopban a mutációknál a homozigóta és hemizigóta állapotokat feltüntettük, egyéb esetekben heterozigóta genotípusról van szó. A mutációk leírása részletesen:

vWF

D' domén c.2365A>G (p.Thr789Ala); D3 domén c.2771G>A (p.Arg924Gln); D2 domén c.2269_70delCT (p.Leu757Valfs*22); D' domén c.2561G>A (p.Arg854Gln); D3 domén c.3379+1G>A; D' domén c.2384A>G (p.Tyr795Cys); A3 domén c.5335C>T (p.Arg1779*)

F8

c.1064G>A (p.Arg355Gln); c.2167G>A (p.Ala723Thr); c.4379delA (p.Asn1460fs*5); c.5122C>T (p.Arg1708Cys)

Minden bemutatott mutáció ismert, okozati eltérés, kivéve a p.Thr789Ala, ami ismert, benignus variáns.

5.1.5.3 Differenciáldiagnosztikai problémák megoldása és tudományos szempontból érdekes esetek fibrinogén rendellenességekben

Veleszületett fibrinogén rendellenességek vonatkozásában (2021 végéig) n=27 beteget 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. A fibrinogén rendellenességek, különösen a dysfibrinogenaemia klinikuma és laboratóriumi felismerése sem egyszerű. Vannak vérzékenységgel, vagy thrombosissal járó esetek, de vannak klinikailag néma eltérések is, sőt olyanok is, ahol nem a hemosztazeológiai probléma dominál, hanem egyéb, súlyos szimptóma alakulhat ki. A klinikai tünetek prediktoraként adott esetekben segítség a háttérben álló mutációk ismerete, ugyanis vannak olyan eltérések, amik inkább vérzékeny, míg mások thromboticus fenotípussal járnak. A fibrinogén rendellenességek felismerése a laboratóriumban sem mindig könnyű, ugyanis a rendkívül egyszerű és olcsó trombinidő (TI) meghatározás eredménye nem minden esetben kóros, a reptilázidő (RI), ami bizonyos esetekben érzékenyebb, pedig a legtöbb laboratóriumban nem része a rutin diagnosztikai protokolloknak, de nem is minden esetben kórjelző. A fibrinogén Clauss módszerrel

történő meghatározása, ami tulajdonképpen egy trombinidő mérésre visszavezethető funkcionális teszt, legtöbbször alacsony értéket adva jelzi a deficienciát és a fibrinogén, mint antigén meghatározásának eredménye pedig differenciálni tud a mennyiségi és minőségi zavarok között, vagyis dysfibrinogenaemiában legtöbbször normál értéket ad.

Fibrinogén rendellenességekkel járó eseteink közül csak azokat mutatom be a **XI. Táblázatban**, amik kapcsán a szakterület fejlődéséhez hozzájáruló megállapításokat tettünk.

A dysfibrinogenaemia eseteink közül 5 esetben detektáltunk a *FGA* gén p.Arg35 pozícióját érintő eltéréseket. Egy beteg a p.Arg35Cys, négy családban pedig a p.Arg35His mutációt hordozták. Az index esetek perioperatív szűrés kapcsán megnyúlt alvadási időket mutattak, de klinikailag tünetmentesek voltak. Bár a TI (42-80,4 sec) megnyúlást mutatott az e pozíciót érintő mutációk esetén, a RI sokkal érzékenyebb kórjelzőnek bizonyult (minden esetben 100 sec felett). A Clauss fibrinogén/fibrinogén antigén arány volt a leghatékonyabb jelzője e rendellenességnek, ami átlagosan $0,24 \pm 0,08$ volt. Három családban a szintén gyakran előforduló *FGG* gén p.Arg301His mutációját detektáltuk. E betegek vagy vérzékenyek, vagy tünetmentesek voltak az adatok feldolgozásának idejéig. A *FGB* p.Arg196Cys mutációt hordozó index betegünk súlyosan vérzékeny, de az ő esetében vWD együttes előfordulását észleltük (ld. később). A *FGA* p.Arg38Ser mutációt hordozók tünetmentesek. A *FGA* p.Thr331Ala mutáció önmagában nem, csak a *FGA* p.Arg35His mutációval fordult elő, a legtöbb predikciós analízis benignusnak írja le.

XI. Táblázat. A fibrinogén rendellenességgel járó eseteink összefoglalása.

	azonosító	nem (kor, év)	PI sec	APTI sec	TI sec	RI sec	Fng g/L	Fng Ag g/L	vérzés	thrombosis	genotípus
Dysfibrinogenaemiával járó mutációk											
1	1/1	N (72)	14,6	29,3	80,4	>100	<0,50	3,56	Fogászati beavatkozást követő vérzés	-	<i>FGA: c. 103C>T (p. Arg35Cys) HeZ¹</i>
2	2/1	N (14) (index)	13,9	33,1	63,5	>100	0,66	2,28	-	-	<i>FGA: c. 104G>A (p. Arg35His) HeZ² AT: c.236G>A (p.Arg79His. AT Padua) WT</i>
3	2/2	F (41) (apa)	10,4	30,7	42,0	>100	1,05	4,70	-	-	<i>FGA: c. 104G>A (p. Arg35His) HeZ²; AT: c.236G>A (p.Arg79His. AT Padua) HeZ</i>
4	2/3	N (44) (anya)	8,9	27,7	17,1	19,5	3,13	2,79	-	-	<i>FGA: c. 104G>A (p. Arg35His) WT AT: c.236G>A (p.Arg79His. AT Padua) WT</i>
5	2/4	N (63) (apai nagyamama)	31,9*	50,0	16,8	19,2	4,09	4,10	-	PE	<i>FGA: c. 104G>A (p. Arg35His) WT; AT: c.236G>A (p.Arg79His. AT Padua) HeZ</i>
6	2/5	F (63) (apai nagyapa)	11,4	29,3	51,3	>100	0,80	2,96	-	-	<i>FGA: c. 104G>A (p. Arg35His) HeZ² AT: c.236G>A (p.Arg79His. AT Padua) WT</i>
7	3/1	N (64) (index)	13,1	38,9	62,3	>100	0,50	4,94	-	-	<i>FGA: c. 104G>A (p. Arg35His) HeZ²</i>
8	3/2	N (32) (leány)	11,6	29,8	49,4	>100	0,76	2,42	Foghúzást követő vérzés	-	<i>FGA: c. 104G>A (p. Arg35His) HeZ²</i>
9	3/3	N (28) (leány)	11,8	31,0	44,4	>100	0,78	2,77	Foghúzást követő vérzés	-	<i>FGA: c. 104G>A (p. Arg35His) HeZ²</i>
10	4/1	F (16)	14,2	33,2	48,4	>100	0,75	2,83	-	-	<i>FGA: c. 104G>A (p. Arg35His) HeZ²</i>
11	5/1	N (56)	10,6	32,8	57,8	75,9	1,30	2,41	bőrvérzés	MVT	<i>FGA: c. 104G>A (p. Arg35His) HeZ²; FGA: c. 991A>G (p.Thr331Ala) HeZ³; Fakor V Leiden HeZ</i>

12	6/1	N (51) (index)	10,1	27,1	34,0	65,1	0,67	3,36	-	-	<i>FGA: c.116G>C (p.Arg38Ser) HeZ⁴</i>
13	6/2	N (21) (leány)	10,6	30,8	36,8	68,9	0,65	2,88	-	-	<i>FGA: c.116G>C (p.Arg38Ser) HeZ⁴</i>
14	7/1	N (40) (index)	9,1	27,0	17,3	20,4	<0,50	2,85	Születést követő vérzés	-	<i>FGB: c.586C>T (p.Arg196Cys) HeZ⁵; vWF: c.101G>A (p.Arg34Gln) HeZ</i>
15	7/2	F (10) (fiú)	9,5	41,0	18,2	20,2	<0,50	2,18	-	-	<i>FGB: c.586C>T (p.Arg196Cys) HeZ⁵; vWF: c.101G>A (p.Arg34Gln) WT</i>
16	8/1	N (49) (index)	10,0	25,3	35,6	41,2	0,55	2,80	epistaxis, császármetszést követő vérzés	-	<i>FGG: c.902G>A (p.Arg301His) HeZ⁶</i>
17	8/2	F (19) (fiú)	10,2	29,0	37,4	40,8	1,31	2,29	-	-	<i>FGG: c.902G>A (p.Arg301His) HeZ⁶</i>
18	9/1	N (47)	11,6	29,2	44,6	60,9	1,41	1,95	epistaxis	-	<i>FGG: c.902G>A (p.Arg301His) HeZ⁶</i>
19	10/1	F (63)	10,0	33,4	36,4	41,5	1,45	3,49	-	-	<i>FGG: c.902G>A (p.Arg301His) HeZ⁶</i>
Egyéb fenotípussal járó, vagy új mutációk											
24	12/1	F (65) (index)	7,9	27,2	14,2	ND	2,60	ND	-	-	<i>FGA: c.1634A>T (p.Glu545Val) HeZ⁷</i>

25	12/2	F (67) (unokatestvér)	7,4	27,7	18,5	ND	ND	ND	-	-	<i>FGA: c.1634A>T (p.Glu545Val) HeZ⁷</i>
26	13/1	N (42)	11,7	34,6	22,9	ND	0,83	0,82	Foghúzást követő vérzés, menorrhagia, 2 abortus	Thrombo- phlebitis	<i>FGB: c.1421G>A (p.Trp474*) HeZ</i>
27	14/1	F (61)	10,9	27,2	29,8	33,2	<0,50	1,38	-	stroke	<i>FGG: c.T>A (p.Met362Lys) HeZ</i>

HeZ, heterozigóta; HoZ homozigóta; WT, vad típus a családban előforduló mutációra nézve; MVT, mély vénás thrombosis; PE, tüdőembolia. FVII:C aktivitás a beteg 20, 21, 22 and 23 esetén rendre 50%, 72%, 68% és 75% volt. Referencia tartományok PI 8,4-12,5 sec, APTI 24,2-36,6 sec, TI 15,5-23,7 sec, RI 18,6-26,2 sec, Fng (Fibrinogén Clauss) 1,5-4,0 g/L, Fng Ag (fibrinogén antigén) 1,8-3,5 g/L. FVII:C aktivitás referencia tartománya 70-120%.

¹ Galanakis et al, 1993; ² Higgins et al, 1981; ³ Carter et al, 1999; ⁷ Tiscia et al, 2018, ⁵ Lounes et al, 2001; ⁶ Borrell et al, 1995; ⁷ Uemichi et al, 1994

(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. közleményünk alapján.)

A laboratóriumi vonatkozásokat tekintve a *FGA* p.Arg38Ser mutáció megnyúlt TI-vel és RI-vel járt. A *FGG* p.Arg301His esetében csak enyhe TI megnyúlás volt észlelhető, a RI valamivel érzékenyebb volt, de ott is 100 sec alatt maradt a megnyúlás mértéke. A Clauss fibrinogén/fibrinogén antigén arány is magasabb volt, mint a *FGA* p.Arg35 mutációk esetén (itt átlag $0,48 \pm 0,23$). A *FGB* p.Arg196Cys mutáció esetében egyik szűrőteszt sem jelzett, a TI és a RI is normál volt mind mechanikus, mind optikai elven mérő koagulométerben. Egyetlen gyanús jel az optikai koagulométerben megtekinthető alvadási görbe szokatlan lefutása volt. A Clauss fibrinogén alacsony volt, és a Clauss fibrinogén/fibrinogén antigén arány is alacsonynak mutatkozott. A *FGG* p.Met362Lys mutációt korábban még nem írták le; mi egy thromboticus tüneteket mutató férfibetegnél mutattuk ki. A TI és RI mérsékelt megnyúlást mutatott, a Clauss fibrinogén diszproporcionális csökkenése dysfibrinogenaemiára utalt. A mutáció a fibrinogén gamma-láncának C-terminálisán helyezkedik el és minden predikciós analízis patogénnek jelezte.

Két rokon betegnél *FGA* p.Glu545Val mutációt detektáltunk. Mindketten renalis amyloidosisban szenvednek, ami ehhez a mutációhoz ismertén társuló jelenség.

A klinikum – a vérzéses, vagy thrombosis rizikó megjósolása és a beteg terápiaja – szempontjából különösen érdekesek azok az esetek, amikor a fibrinogén rendellenesség egyéb veleszületett hemosztázis eltéréssel társul. Ezek az esetek rendkívül ritkák, az irodalomban általában egy-egy „case-report”-tal találkozunk, azonban ezek a leírások az egyetlen kapaszkodói a klinikumnak a további, hasonló esetek megítéléséhez szempontjából. Minden újabb ritka eset ismertetése ezért jelentős hozzáadott értéket képvisel. Jelen értekezésben most két különböző, a fibrinogén rendellenességhez társuló hemosztázis eltérést ismertetünk. Az első család a dysfibrinogenaemia *FGA* p.Arg35His variánsa mellett AT deficienciával rendelkező (XI. Táblázat 2/1-2/5 esetei). A proband, egy 4 éves leány gyermek, tonsillectomia előtt történő laboratóriumi kivizsgálása során mutatott jelentős TI és RI megnyúlást, majd dysfibrinogenaemiát igazoltunk a *FGA* p.Arg35His heterozigóta hordozásával, mely az ezzel az eltéréssel rendelkező betegek többségénél (saját eseteinket is beleértve) inkább vérzéses fenotípussal jár. A gyermek eddig nem mutatott vérzéses tüneteket, és édesapja, akitől a mutációt örökölte, szintén tünetmentes volt (jelenleg 41 éves). Az apai nagymama (63 éves) azonban thrombosis és tüdőembolia anamnesissel rendelkezett, vérzései soha nem voltak. Az ő kivizsgálása során derült fény AT

deficienciára, a heparin-kötés zavarával járó AT Padua-ra (p.Arg79His), ami jól magyarázza a thromboticus fenotípust. A család elérhető tagjait e két veleszületett hemosztázis zavarra ezt követően szisztematikusan megvizsgáltuk és megállapítottuk, hogy a proband az AT deficienciát nem hordozta, édesapja viszont kettős heterozigóta a dysfibrinogenaemiát és az AT deficienciát okozó eltérésekre, így az ő esetében sokkal inkább a thrombosis fokozott kockázatára kellett felhívni a figyelmet. Az apai nagymama csak az AT deficienciával rendelkezett, az apa a *FGA* rendellenességet édesapjától (apai nagyapa) örökölte, aki 63 éves korában (a családvizsgálat időpontjában) sem vérzéses, sem thromboticus eseményekről nem számolt be. Ebben a családban tehát a dysfibrinogenaemia és az *FGA* p.Arg35His jelenlétéből fakadóan inkább (enyhén) vérzékeny fenotípust az AT deficiencia jelenléte befolyásolhatja, a kettős heterozigóta személy, aki még fiatal, követése különösen fontos a vérzés-thrombosis egyensúly kontrollja szempontjából.

Dysfibrinogenaemia és vWD együttes előfordulását diagnosztizáltuk egy fiatal nőbetegnél, aki szülés kapcsán jelentkező súlyos vérzésről számolt be (**XI. Táblázat 7/1 beteg**). Az ismert, a fibrinogén polimerizációjának zavarát okozó, *FGB* p.Arg196Cys mutáció mellett egy új, *VWF* génben lévő mutációt is hordozott heterozigóta formában (p.Arg34Gly). Az eltéréssel megegyező pozícióban leírt variáns az irodalom alapján heterozigóta formában I-es típusú vWD-el társul [427]. Az új mutáció a vWF egy konzervált részletét érinti és predikciós analíziseink szerint patogénnek tekinthető. Így e betegünkönél kombinált coagulopathia jelenlétét tudtuk igazolni és a vWD jelenléte egyértelműen a vérzéses fenotípus felé terelte a dysfibrinogenaemia mellett várhatóan néma, vagy enyhén vérzékeny fenotípust. A beteg fia, aki még csupán 10 éves, a vWD-et nem örökölte, eddig tünetmentes.

A fibrinogén rendellenességek vizsgálata kapcsán szerzett tapasztalataink alapján megállapítottuk, hogy a *FGA* p.Arg35 és *FGG* p.Arg301 pozíciókat érintő mutációk benignus fenotípussal járnak, legfeljebb enyhe vérzékenységgel társulnak. Az *FGA* p.Arg38Ser szintén benignus. A fibrinogén ezen régióit érintő variánsok a fibrin polimerizációt befolyásolják, vagy fibrinolízis rezisztenciával járnak az irodalmi adatok szerint [428,429].

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 PI és APTI meghatározások során alkalmazott reagensek

érzékenysége ugyanis rendre alacsony a fibrinogén rendellenességek vonatkozásában és általában csak a nagyon súlyos hypo- és afibrinogenaemiában mutatnak megnyúlt értékeket, holott klinikai tünetek ezekben az esetekben is előfordulnak. Kimutattuk továbbá, hogy a *FGB* p.Arg196Cys eltérés esetén még a TI és RI paraméterek sem jeleznek, egyedül csak az optikai koagulométerben végzett alvadási idő meghatározások során megfigyelt alvadási görbe szokatlan lefutása utalhat coagulopathiára. További probléma, hogy az enyhe fibrinogén szint csökkenés (1g/L feletti fibrinogén szint) általában nem nyilvánul meg alvadási idő megnyúlásban, holott ezekben az esetekben is számíthatunk klinikai tünetekre és okozati mutációk előfordulására a fibrinogén génekben. A fibrinogén rendellenességek egy része így aluldiagnosztizált marad, ha a normál szűrőteszt eredmények okán nem történnek további, speciális vizsgálatok (Clauss fibrinogén, fibrinogén antigén, RI). Még tovább gondolva, a fibrinogén rendellenességek egy része esetén akár még a fibrinogén szintek is lehetnek normálisak, okozati mutáció jelenlétében is: a *FGA* p.Glu545Val vese amiloidosisal jár, amikor e ritka autoszomalisan domináns betegség esetén a mutáns fibrinogén alfa láncok akkumulálódnak a vesékben amiloid fibrillumokat képezve, mely végső soron fatális szervkárosodáshoz vezet [430]. A betegség felismerése és korrekt diagnózisa életmentő e betegek számára, hiszen a vesetranszplantáció esetükben megoldást jelent.

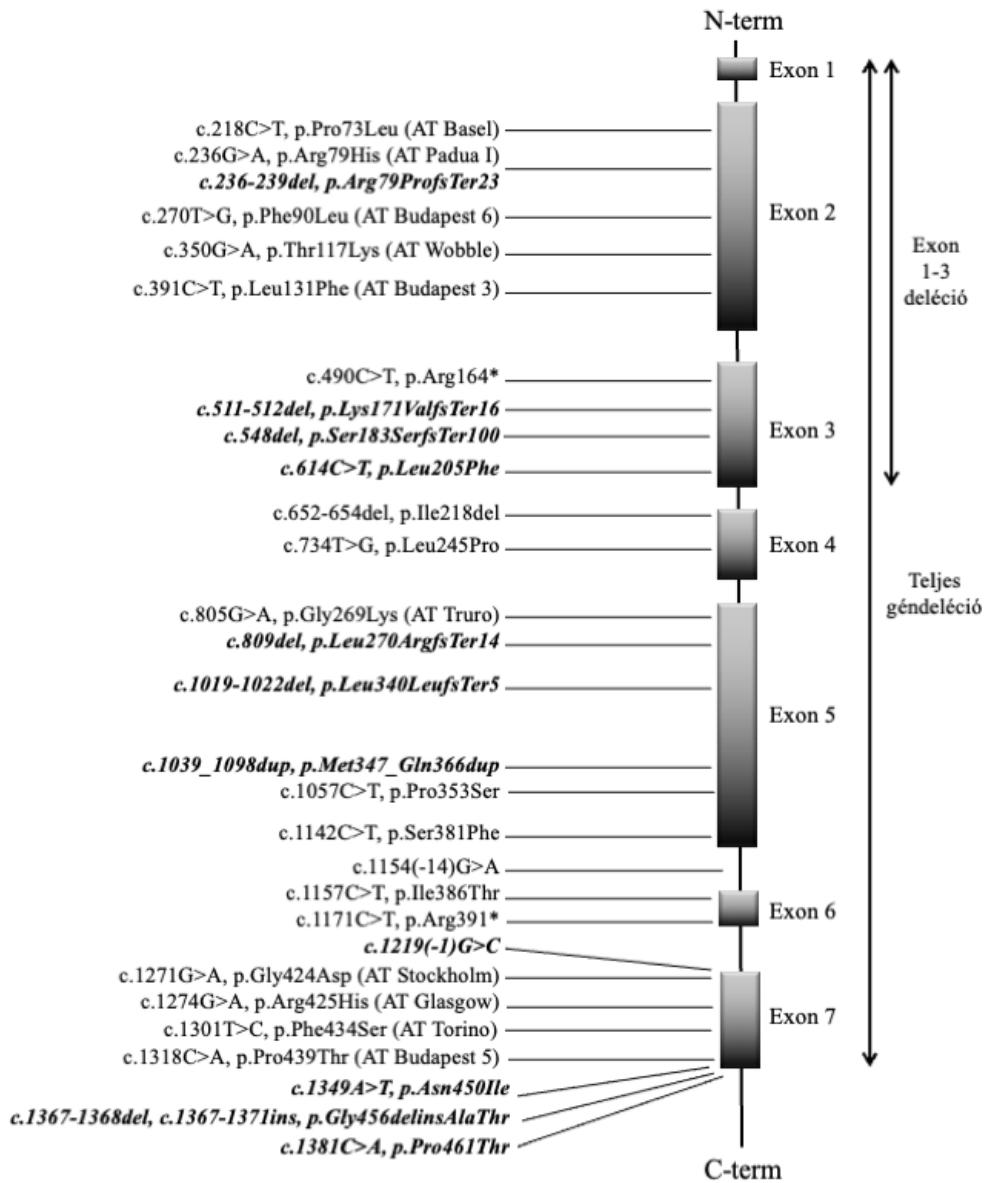
Amellett, hogy a fibrinogén rendellenességek klinikai és laboratóriumi fenotípusa meglehetősen változatos, a variabilitást fokozzák az esetlegesen társuló egyéb hemosztázis eltérések. A dysfibrinogenaemia klinikai fenotípusát thromboticus irányba módosíthatja a társuló AT deficiencia, vagy FV Leiden 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

5.2.1.1 *Az antitrombin deficiencia hazánkban előforduló típusai és klinikai jellemzői*

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 (**24. ábra**). Ezek közül I-es típusú ATD-t okoz 22 és II-es típusú ATD-t eredményez 9 féle mutáció. A mutációk 36%-a új genetikai eltérés (11 mutáció). A mi populációnkban leggyakoribbnak az ATD IIHBS altípusa bizonyult (75,6%), ezen belül is az AT Budapest 3 mutáció (ATBp3, 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 közel 300, 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 ATBp3 mutációt, ahol homozigóta egyéneket is detektáltunk. Az egyéb IIHBS altípusok közül az AT Basel 5, az AT Padua I 11 családnál fordult elő. A IIRS altípusok mutációi (AT Stockholm, AT Glasgow és p.Ile386Thr) 1-1 családban fordultak elő. A IIPE altípusba tartozó AT Torino-t egy, míg az AT Budapest 5 mutációt öt családban mutattuk ki.



24. ábra. Az általunk vizsgált AT deficiens populációban azonosított *SERPINC1* mutációk.

A nukleotidok számozása a kezdő ATG (Met) első nukleotidjától történik. A mutációk elnevezése a Human Genome Variation Society irányelvei alapján történt. Az új mutációk dőlt és félkövér jelzéssel szerepelnek az ábrán. (Gindele, R., Selmeczi, A., Oláh, Z., Ilonczai, P., Pfliegler, G., Marján, E., Nemes, L., Nagy, Á., Losonczy, H., Mitic, G., Kovac, M., Balogh, G., Komáromi, I., Schlamadinger, 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.közleményünk alapján.)

Mindössze három olyan esetben nem találtunk genetikai eltérést sem fluoreszcens direkt szekvenálással, sem MLPA analízissel, ahol mérsékelten csökkent hc-anti FXa AT aktivitást mértek (79, 75 és 76%). E betegekben az AT antigén szintek minden esetben a referencia tartományba estek (0,22, 0,21 és 0,22 g/L).

A klinikai jellemzőket tekintve az I-es típusú ATD betegek között szignifikánsan gyakrabban fordult elő VTE, mint a II-es típusú heterozigóta egyének között ($p=0,015$). Amennyiben a IIHBS altípushoz hasonlítjuk, még nagyobb volt a különbség a VTE előfordulási gyakoriságában az I-es típushoz viszonyítva (IIHBS típusban 66% vs. I-es típusban 41,8 %, $p=0,003$). 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%, $p=0,046$). Az I-es típusú deficiensek között mindössze egy, p.Arg164* mutációhordozó nő esetében fordult elő terhességi komplikáció. Ugyanígy csupán egy I-es típusú AT Wobble hordozónál jelentkezett artériás esemény MI formájában, azonban ez a beteg számos egyéb rizikófaktorral is rendelkezett (dohányzás, magasvérnyomás, hiperlipidémia). A IIRS és IIPE altípusokban nem regisztráltunk sem artériás eseményt, sem terhességi komplikációt. **(XII. Táblázat)** A különböző ATD csoportok között szignifikáns különbség nem volt megfigyelhető a FVL és a FIIG20210A mutációk hordozásának gyakoriságában; egyéb öröklött thrombophilia tényezőt nem találtunk. Antifoszfolipid szindróma sem volt fellelhető egyik alcsoportban sem. Veszületett érfejlődési rendellenességet észleltünk a betegek egy részében, ez jellemzően vena cava inferior aplasia, vagy hypoplasia volt és elsősorban az ATBp3 homozigótákban fordult elő relatíve nagyobb arányban. Ezzel a jelenséggel később részletesebben, több beteg bevonásával, nemzetközi tanulmányban foglalkoztunk, ld. később az értekezésben.

XII. Táblázat. A különböző ATD típusok klinikai jellemzői.

	I-es típus <i>n=47</i>	IIHBS altípus				IIRS altípus <i>n=3</i>	IIPE altípus <i>n=12</i>
		AT Basel <i>n=7</i>	AT Padua I <i>n=15</i>	AT Bp3 homozigóták <i>n=26</i>	AT Bp3 heterozigóták <i>n=76</i>		
Nő	25/47 (53,2%)	5/7 (71,4%)	12/15 (80,0%)	13/26 (50,0%)	34/76 (44,7%)	3/3 (100%)	4/12 (33,3%)
Férfi	23/47 (48,9%)	2/7 (28,6%)	3/15 (20,0%)	13/26 (50,0%)	42/76 (55,3%)	0/3 (0%)	8/12 (66,7%)
Tünettel rendelkezők aránya	34/47 (72,3%)	5/7 (71,4%)	8/15 (53,3%)	24/26 (92,3%) ^{c,d}	43/76 (56,6%)	3/3 (100%)	9/12 (75,0%)
Életkor első TE idején (median év, tartomány)	27 (22 nap-64)	29 (15-51)	44 (22-53)	14 (2 nap-26) ^{c,d}	33 (2-68)	25 (23-28)	38 (16-62)
Minimum egy VTE	31/47 (66,0%) ^b	1/7 (14,3%)	3/15 (20,0%)	24/26 (92,3%) ^{c,d,e}	37/76 (48,7%) ^{g,h}	3/3 (100%)	8/12 (66,7%)
Rekurrens VTE	11/31 (35,5%)	0/1 (0%)	0/3 (0%)	8/24 (33,3%) ^d	6/37 (16,2%) ^h	1/3 (33,3%)	3/8 (37,5%)
Izolált PE	1/31 (3,2%)	0/7 (0%)	1/3 (33,3%)	2/24 (8,3%)	4/37 (10,8%)	0/3 (0%)	0/8 (0%)
MVT+PE	1/31 (3,2%)	0/1 (0%)	0/3 (0%)	4/24 (15,4%)	9/37 (24,3%)	0/3 (0%)	1/8 (12,5%)
Artériás thrombosis	1/47 (2,1%)	3/7 (42,9%) ^{e,f}	1/15 (6,7%)	0/26 (0%)	8/76 (10,5%)	0/3 (0%)	0/12 (0%)
Rekurrens artériás thrombosis	0/47 (0%)	1/7 (14,3%)	0/15 (0%)	0/26 (0%)	2/76 (2,6%)	0/3 (0%)	0/12 (0%)
Terhességi komplikációk	1/47 (2,1%) ^b	1/7 (14,3%)	4/15 (26,7%)	3/26 (11,5%)	2/76 (2,6%)	0/3 (0%)	0/12 (0%)
A FVL/FII mutációk hordozóinak aránya ^a	7/47 (14,9%)	0/7 (0%)	4/11 (36,4%)	3/26 (11,5%)	17/76 (22,4%)	1/3 (33,3%)	0/12 (0%)
Provokált VTE-n átesett betegek	9/33 (27,3%)	0/5 (0%)	2/8 (25,0%)	2/24 (8,3%)	9/41 (22,0%)	1/3 (33,3%)	1/9 (11,1%)
VTE-n átesett betegek szerzett rizikófaktorának aránya	1/47 (2,1%)	0/5 (0%)	1/8 (12,5%)	0/24 (0%)	4/41 (9,8%)	0/3 (0%)	1/9 (11,1%)
Érfejlődési rendellenességek	1/47 (2,1%)	0/7 (0%)	1/15 (6,7%)	3/26 (11,5%)	1/76 (1,3%)	0/3 (0%)	0/12 (0%)

TE = thromboticus esemény, VTE = vénás thromboembolia, PE = tüdőembólia, MVT = mélyvénás thrombosis, az artériás thrombosis elnevezés magában foglalja a myocardialis infarctust és az ischaemias stroke-ot

^aegyéb thrombosis rizikófaktort nem regisztráltunk

^b $p < 0.05$ az I-es típusú AT deficienseket a II.HBS heterozigótákkal összehasonlítva

^c $p < 0.05$ az AT Bp3 homozigótákat az AT Bp 3 heterozigótákkal összehasonlítva

^d $p < 0.05$ az AT Bp3 homozigótákat az AT Padua I hordozókkal összehasonlítva

^e $p < 0.05$ az AT Bp3 homozigótákat az AT Basel hordozókkal összehasonlítva

^f $p < 0.05$ az AT Bp3 heterozigótákat az AT Basel hordozókkal összehasonlítva

^g $p < 0.05$ az AT Bp3 heterozigótákat az AT Padua I hordozókkal összehasonlítva

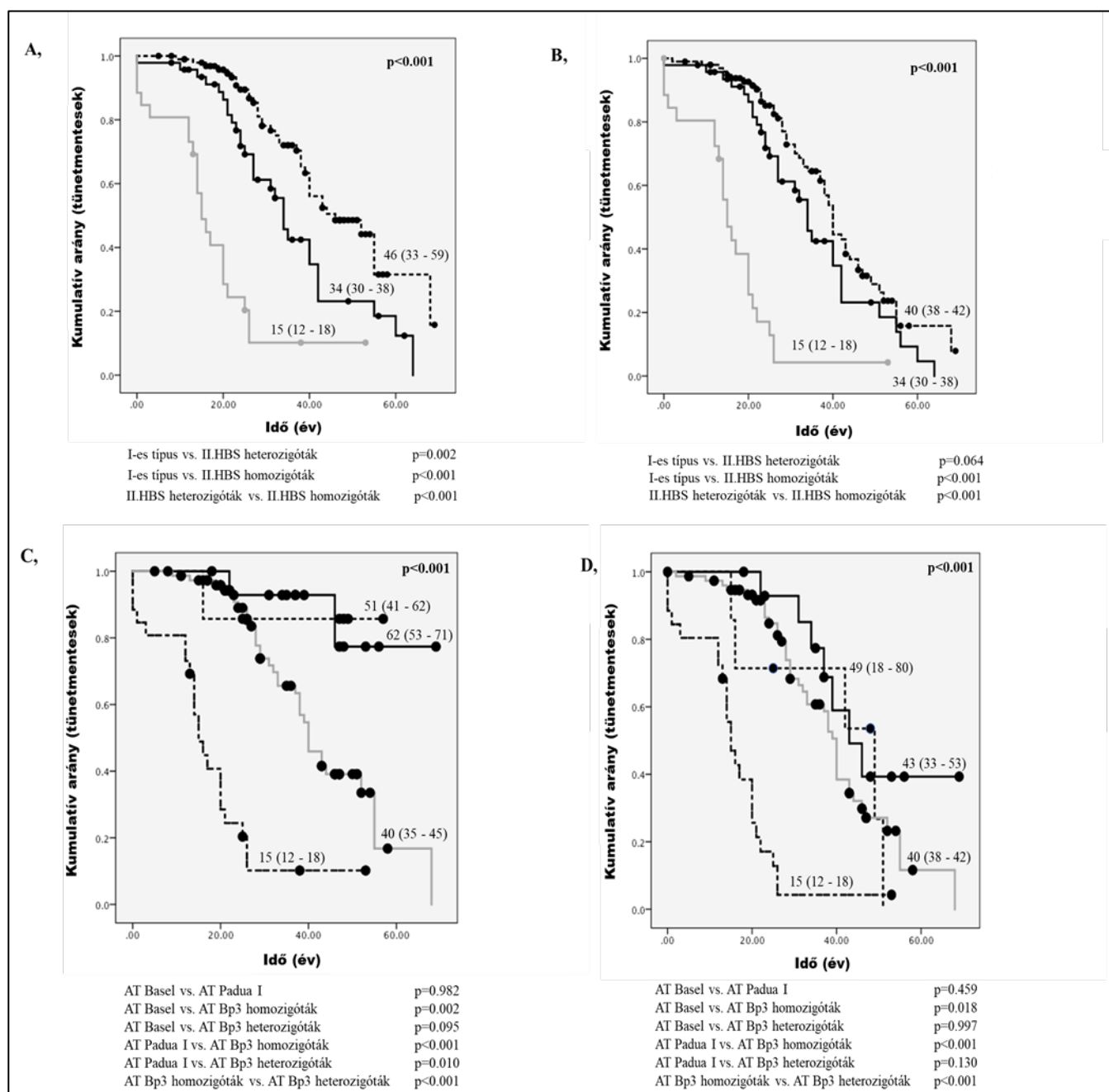
^h $p < 0.05$ az AT Bp3 heterozigótákat az AT Basel és az Padua I csoporttal összehasonlítva

(Gindele, R., Selmeczi, A., Oláh, Z., Ilonczai, P., Pfliegler, G., Marján, E., Nemes, L., Nagy, Á., Losonczy, H., Mitic, G., Kovac, M., Balogh, G., Komáromi, I., Schlamadinger, 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. közleményünk alapján.)

Összehasonlítottuk a VTE, illetve összes thromboticus esemény (véna, artériás thrombosis, terhességi komplikáció) bekövetkezésének idejét az I-es típusú, a IIHBS heterozigóták, illetve IIHBS homozigóták (ez konkrétan az ATBp3 homozigótákat jelenti) között (**25. ábra**). Ha csak a VTE-t tekintettük klinikai kimenetnek, az I-es típusú ATD esetében szignifikánsan korábban következett be az esemény, mint a IIHBS esetekben ($p=0,002$), azonban az I-es típusú ATD-ben szignifikánsan idősebb életkorban következett be a VTE, mint az ATBp3 homozigóta betegekben ($p<0,001$). Amikor klinikai kimenetnek tekintettünk bármilyen thromboticus történetet (beleértve a véna és artériás, valamint a terhességi komplikációkat is), az első manifesztációig eltelt idő nem különbözött szignifikánsan az I-es típusú és a IIHBS heterozigóta ATD esetek között ($p=0,064$). Az ATBp3 homozigóta hordozók azonban e végpontot tekintve is szignifikánsan fiatalabbak voltak az I-es típusú ATD esetekhez képest ($p<0,001$). Továbbá, a proximálisan jelentkező thrombosisok szintén az ATBp3 homozigóta hordozókban voltak gyakoribbak az I-es típusú ATD-hez képest (62,5% vs. 14,3%, $p = 0,002$), míg az I-es típusú és a IIHBS heterozigóták között ebben a tekintetben nem volt különbség.

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). Az ATBp3 homozigótáknál fordultak elő legmagasabb arányban (92,3%) a thromboticus tünetek; ez szignifikánsan magasabb arány, mint az ATBp3 heterozigótákban ($p=0,001$) és az AT Padua I hordozókban ($p=0,006$). 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 AT Basel és AT Padua I hordozókban nem volt különbség az első VTE megjelenésének idejében ($p=0,982$), úgymint az AT Basel és ATBp3 heterozigóták között sem ($p=0,095$) (**25. ábra**). Az ATBp3 heterozigótákban szignifikánsan fiatalabb korban fordult elő VTE, mint az AT Padua I hordozókban ($p=0,010$). Az ATBp3 homozigóták voltak a legfiatalabbak az első thromboticus esemény elszívődésének idején (ATBp3 homozigóták vs. AT Basel $p=0,002$; ATBp3 homozigóták vs. AT Padua I $p<0,001$ és ATBp3 homozigóták vs. ATBp3 heterozigóták $p<0,001$). Amennyiben kimenetnek tekintettünk minden thromboticus eseményt, az első esemény megjelenésének ideje nem különbözött szignifikánsan az AT Basel és AT Padua I ($p=0,459$), az ATBp3 heterozigóták és az AT Basel ($p=0,997$), valamint az ATBp3 heterozigóták és az AT Padua I hordozók között ($p=0,130$). Az első esemény megjelenése az ATBp3 homozigóták esetében volt a legkorábbi (ATBp3 homozigóták vs. ATBp3 heterozigóták $p<0,001$, ATBp3 homozigóták vs. ATPadua I $p<0,001$ és ATBp3 homozigóták vs. AT Basel $p=0,018$).



25. ábra. A különböző típusú ATD esetek összehasonlítása a klinikai tünetek megjelenésének ideje szempontjából.

Az A-C ábrák csak a vénás eseményekre, a B-D ábrák minden thromboticus eseményre vonatkoznak. Az A és B ábrákon az I-es típusú ATD folytonos fekete vonallal, a IIHBS heterozigóta pontozott vonallal, az ATBp3 homozigóta szürke vonallal jelenik meg. A C és D ábrákon az AT Basel szaggatott vonal, az AT Padua I folyamatos fekete vonal, az ATBp3 heterozigóta szürke vonal, az ATBp3 homozigóta pontozott vonal formájában jelenik meg. (Gindele, R., Selmeczi, A., Oláh, Z., Ilonczai, P., Pfliegler, G., Marján, E., Nemes, L., Nagy, Á., Losonczy, H., Mitic, G., Kovac, 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. közleményünk alapján.)

Ritka betegség mivoltához képest jelentős számú ATBp3 homozigóta hordozó (az irodalomban a legnagyobb számú beteg) detektálása lehetővé tette több szempontból is az ATBp3 heterozigótákkal való összehasonlítást. Az ATBp3 homozigóták között 13-an súlyos vagy szokatlan lokalizációjú MVT-n estek át. Hét beteg iliofemoralis, 2 beteg pedig vena cava inferior thrombosist szenvedett. Egy betegnél vena cava inferior és vesevéna thrombosis fordult elő. Mesenterialis thrombosist egy, tricuspidalis billentyű thrombosist szintén egy beteg szenvedett. Az ATBp3 homozigóták között mindössze 2 tünetmentes egyént regisztráltunk. Az ATBp3 heterozigóták között 8 esetben fordult elő artériás esemény (4 betegnél csak ATE, 4 betegnél ATE+VTE), ezzel szemben a homozigóták egyikénél sem.

Fent említett vizsgálataink lezárultát követő 5 évben (2016-2021) további ATD IIHBS betegeket toboroztunk, így n=230 betegen újra elemeztük ennek az ATD típusnak a klinikumát. Ekkorra n=9 AT Basel, n=26 AT Padua, n=44 ATBp3 homozigóta és n=151 ATBp3 heterozigóta beteg adatai álltak rendelkezésünkre. A mintaszám növelése megerősítette korábbi következtetéseinket, részletesebb bemutatásra itt nem térek ki, az adatok a vonatkozó közleményünkben megtalálhatóak (*Bereczky, Z., Gindele, R., Fiatal, S., Speker, M., Miklós, T., Balogh, L., Mezei, Z., Szabó, Z., Ádány, 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.*)

Összefoglalva, vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy e korábban egy entitásként számon tartott, ritka ATD klinikumát befolyásolja a betegség altípusa. Az I-es típusú ATD-ban dominál a súlyos, vénás thrombosis és a II-es típussal 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, homozigótáknál esetenként háromnál is több epizóddal (a legtöbb thromboticus eseményt is egy ATBp3 homozigóta beteg szenvedte el, nála hét alkalommal alakult ki MVT). 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 miatt nem jár gyakrabban artériás eseménnyel az ATBp3 heterozigótasághoz viszonyítva, valószínűleg 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, illetve megpróbálják elkerülni a szerzett (életmódi) cardiovascularis kockázati tényezőket. Az ATBp3 heterozigóták között is a vénás thrombosis dominál, de regisztráltunk olyan artériás thrombosison átesett betegeket is, akiknél vénás thrombosis nem szerepelt az anamnesisben, vagy ha igen, azt megelőzte az artériás esemény. E betegek fiatalok voltak és általában találtunk valamilyen cardiovascularis rizikófaktort, ami felhívja a figyelmet az ATD és környezeti tényezők artériás események korai kialakulásában játszott együttes szerepére. Mivel az ATD csoportban az artériás események bekövetkezése idején a betegeink fiatalok voltak, megvizsgáltuk azt, hogy az ATD milyen arányban fordul elő a fiatal korban (40 éves kor alatt) MI-t elszenvedett betegekben (n=92) és összehasonlítottuk az ATD prevalenciáját vénás thrombosison átesett, konsekutívan toborzott betegcsoporttal (n=110). **(XIII. Táblázat)**

XIII. Táblázat. A fiatal korban myocardialis infarctuson és vénás thrombosison átesett betegek összehasonlítása.

	MI (n=92)	VTE (n=110)	p érték (MI vs. VTE)
életkor (medián év; min-max); IQR	36 (14-40); 4	30.5 (17-40); 11	<0,001
férfi/nő (n)	70/22	57/53	0,001
Diabetes mellitus (%)	14,0	4,0	0,010
Aktív dohányos (%)	60,0	20,0	<0,001
Leszokott dohányos %	33,3	18,0	<0,001
ATE+VTE %	4,3	1,8	0,012
Pozitív családi anamnesis ATE vagy VTE (%)	74,0	62,0	<0,001
Hypertonia(%)	43,0	12,0	<0,001
Hyperlipidaemia (%)	86,0	0	NA
BMI kg/m² (medián; min-max); IQR	28,0 (17,0-46,0); 6,0	28,7 (18,9-52,7); 7,32	0,221
ATD IIHBS gyakorisága %	3,3	1,8	0,469
FVL HeZ/HoZ gyakorisága %	9,4/0	35,5/10,9	<0,001
FII 20210A HeZ gyakorisága %	2,3	6,3	0,304
AT aktivitás % medián; min-max); IQR	112 (57-135); 12	104 (50-136); 15	<0,001
AT, PC és PS deficiencia gyakorisága %	3,3	5,5*	0,469

Pozitív családi anamnesis alatt vénás thromboemboliát, MI, stroke, vagy non-traumás alsó végtagi amputációt értünk az első fokú rokonok között;

NA, nem értelmezhető

IQR, interkvartilis tartomány; HeZ, heterozigóta; HoZ, homozigóta

Antitrombin aktivitás referencia tartománya 80-120%.

**Két-két beteget találtunk II HBS ATD-val (ATBp3 heterozigóták) és Protein C deficienciával, egy beteget protein S deficienciával és egy beteget I-es típusú ATD-val a vénás thrombosis csoportban. Az MI csoportban a IIHBS ATD-n kívül egyéb ritka thrombophiliás beteget nem találtunk.*

(Bereczky, Z., Gindele, R., Fiatal, S., Speker, M., Miklós, T., Balogh, L., Mezei, Z., Szabó, Z., Ádány, 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. közleményünk alapján.)

A MI-n és VTE-n átesett betegekben az ATD IIHBS előfordulási aránya hasonló volt, azonban két fontos különbséget kell megemlítenünk. Az egyik az, hogy az MI csoportban szignifikánsan többen rendelkeztek klasszikus cardiovascularis rizikófaktorral (pl. hyperlipidaemia, dohányzás), míg a VTE csoportban az egyéb thrombophilia kockázati tényezők fordultak elő gyakrabban (pl. FV Leiden mutáció). Összességében elmondhatjuk, hogy az ATD IIHBS típusának előfordulása nem

elhanyagolható az artériás thrombosisal rendelkező fiatal betegekben, ezért e válogatott betegcsoportban – különösen azokban a populációkban, ahol a IIHBS ATD gyakoribb, mint máshol, így hazánkban is – a szekunder profilaxis meghatározása érdekében érdemes vizsgálni e thrombophiliának a jelenlétét.

Az ATD-val diagnosztizált betegek tünetmentes családtagjainak (kohorszunkban például $n=64$, ötven év alatti tünetmentes személy volt) esetében is lényegesnek tartjuk a minél korábban felállított pontos diagnózist, hogy primer thrombosis profilaxist ajánlhassunk számukra a magas thrombosis kockázattal járó esetekben, provokáló tényezők, vagy szerzett thrombosis kockázati tényezők jelenléte esetén.

5.2.1.2 Az antitrombin deficiencia megjelenése speciális betegcsoportokban

• Antitrombin deficiencia gyermekekben

Az ATD betegeink közül 32-en gyermekkorban (≤ 18 éves) estek át az első thromboticus eseményen (XIV. Táblázat). A gyermekek többsége ($n=25$) IIHBS altípusú mutációt és többségük ($n=18$) az ATBp3 mutációt hordozta homozigóta formában. Az ATBp3 mutációt 7 gyermek hordozta heterozigóta formában, 2 gyermek AT Basel, egy gyermek AT Truro hordozó volt. Egyikük egy IIPE (ATBp5) eltérést és 3 gyermek I-es típusú (p.Ile218del, p.Leu270ArgfsTer14 és teljes *SERPINC1* gén deléció) mutációt hordozott.

A 0-1 éves korcsoportban ($n=7$) egy gyermek kivételével mindegyikük ATBp3 homozigóta volt. Egyikük FVL heterozigóta, míg 2 gyermek érfejlődési rendellenességgel (vena cava inferior aplasia és hypoplasia mindkét oldali vena iliaca hypoplasiával és vena cava inferior, illetve vena iliaca communis hypoplasia) született. A thrombosis közvetlenül kiváltó provokáló tényezőt egyikükénél sem regisztráltunk. Az AT Truro mutációt hordozó újszülött sinus sagittalis thrombosison esett át és agyi véna hypoplasiát detektáltunk.

A 2-11 éves korcsoportban csak 4 esetet találtunk, egy 2 éves gyermek érfejlődési rendellenességgel született és egy 10 éves korban TE-n átesett gyermek FVL heterozigóta hordozó is volt.

A 12-18 éves korcsoportban ($n=20$) 15 ATBp3 mutáció hordozót detektáltunk, 4 esetben fordult elő provokáló tényező (2 terhesség, 1 szülés után, 1 műtét). Nem találtunk továbbá sem egyéb öröklött, sem szerzett thrombosis rizikó faktorokat a

zsbereczky_271_24

hátterben. Egy AT Basel mutáció hordozó fiatal MI-n és ischaemias stroke-on is átesett,
2 ATBp3 heterozigóta pedig szintén ischaemias stroke-on esett át.

XIV. Táblázat. Az ATD deficiencia megjelenése gyermekkorban.

Sorszám	Nukleotid pozíció (elnevezés a HGVS nevezéktan szerint)	Aminosav pozíció (elnevezés a HGVS nevezéktan szerint)	Beteg azonosító	Nem	Tünetek	Kor az első esemény idején (évek)	provokált thrombosis ^b (igen/nem)
1	c.218C>T	p.Pro73Leu (AT Basel)	1/1	N	MVT	16	nem
			1/2	F	1 MI, 1 stroke	15	nem
2	c.391C>T	p.Leu131Phe (AT Bp3) homozigóta	2/1	N	MVT	1	nem
			2/2	F	MVT	3	nem
			2/3	F	MVT	14	nem
			2/4	F	PE	14 nap	nem
			2/5	F	MVT	12	nem
			2/6	N	MVT	14	nem
			2/7	N	2 MVT, 1 PE	15	nem
			2/8	F	MVT, PE	7 nap	nem
			2/9	N	2 MVT	17	igen (terhesség)
			2/10	F	5 MVT	13	nem
			2/11	N	2 MVT	16	igen (terhesség)
			2/12	N	MVT	2 nap	nem
			2/13	F	4 MVT	16 nap ^a	nem
			2/14	N	MVT	14	nem
			2/15	N	MVT	15	nem
			2/16	N	MVT	12	nem
			2/17	N	MVT	13	nem
			2/18	N	MVT	14	nem
		p.Leu131Phe (AT Bp3) heterozigóta	2/17	F	stroke	14	nem
			2/18	F	MVT	13	nem
			2/19	F	stroke	2	nem
			2/20	N	MVT	9	nem
			2/21	N	6 MVT, 1 PE	17	nem
			2/22	F	MVT	1	nem
			2/23	N	stroke	18	igen (posztpartum)
3	c.652-654del	p.Ile218del	3/1	N	1 MVT	14	igen (műtét)
4	c.805G>A	p.Gly269Lys (AT Truro)	4/1	F	sinus sagittalis thrombosis	22 nap	nem
5	c.807del	p.Leu270ArgfsTer14	5/1	F	5 MVT	16	nem
6	c.1318C>A	p.Pro439Thr (AT Budapest 5)	6/1	F	2 MVT	16	nem
			6/2	F	0	NÉ	nem
7	c.1-1392del	p.Met1-Term464	7/1	N	2	10 ^a	nem
			7/2	F	0	NÉ	nem

^a Faktor V Leiden mutáció hordozó heterozigóta formában, más öröklött rizikófaktort nem detektáltunk

^b kizárólag provokáló tényezőket (vagyis a VTE diagnózisa előtt 1 hónapon belül valamilyen szerzett rizikófaktort regisztráltak) detektáltunk és ún. „szerzett kockázati tényezők” (pl. krónikus események) nem fordultak elő; NÉ: nem értelmezhető; F: férfi; N: nő; MVT: mélyvénás thrombosis; PE: tüdőembólia; MI: myocardialis infarctus

A gyermekkori ATD-val kapcsolatos megfigyeléseinket kiterjesztve, szerb munkacsoporttal együttműködve további n=19 ATD gyermek esetét dolgoztuk fel. Három gyermek I-es típusú (c.652_654del(ATC), p.Ile218del; c.1019_1022del(TGGA), p.Leu340LeufsTer5; c.1171C>T, p.Arg391*) ATD-ben szenvedett, közülük egy gyermek esetében fordul elő az elemzés idejével bezárólag thromboticus esemény, 14 éves korban alsó végtagi MVT zajlott sebészi beavatkozás kapcsán. A többi gyermek IIHBS ATD-val rendelkezett, közülük mindenki az ATBp3 mutációt hordozta. A heterozigóta gyermekek közül egy személy szenvedett MVT-t, az első 12 éves korban sebészi beavatkozást követően. A n=13 ATBp3 homozigóta gyermek közül n=11 gyermek már átesett az első thromboticus epizódon az elemzésünk idején. Medián életkoruk az első thrombosis idején 13 év volt (tartomány 0-18 év), ez megfelelt a magyar ATD gyermekek kohorszában észlelt életkornak (ld. **XIV. Táblázat**). A hazai gyermekekhez hasonlóan az ATBp3 homozigóták jellemzően spontán thrombosisokat szenvedtek el, és jellemző volt a proximalis DVT (n=6), az abdominalis thrombosis (vena cava inferior n=1, vena renalis, n=2, mindkét esetben nephrectomia vált szükségessé) és artériás thrombosit (ischaemias stroke, n=2, egyik fatális kimenetellel) is regisztráltunk. Rekurrens thrombosit csak az ATBp3 homozigóta gyermekek körében regisztráltunk (n=5), közülük 3 gyermek közvetlen az első thromboticus eseményt követően, az antikoaguláns terápia iniciációja során szenvedett újabb thrombosit. A gyermekkori thrombosisok kapcsán hazánkban és Szerbiában is az LMWH volt az elsődlegesen választott antikoaguláns, amit – a terápia klinikai és laboratóriumi hatástalansága alapján – AT koncentráttal egészítettek ki n=5 beteg esetében. A két ATD deficiens gyermek betegcsoport klinikai jellemzőinek elemzése során hasonló következtetésekre jutottunk. Legsúlyosabb thrombosit az ATBp3 homozigóta gyerekeknél tapasztalunk, a thrombosis legtöbbször nem provokált. Az abdominalis thrombosis súlyos következményekkel járhat, úgy mint máj-veze elégtelenség. Az ischaemias stroke egy másik lehetséges klinikai megjelenési formája az ATD ATBp3 homozigóta állapotnak gyermekkorban, illetve fiatal felnőtt korban, amire mindenképp gondolni kell fiatal korban elszenvedett stroke esetén és az ATD diagnózisát mielőbb fel kell állítani a hatékony antikoagulálás bevezetése érdekében. A rekurrens thrombosis veszélye ATD ATBp3 homozigóta gyermekekben magas, esetenként az antikoaguláns terápia bevezetése ellenére kialakul, ennek hátterében az LMWH csökkent hatékonysága áll e speciális ATD altípusban. A terápia szoros monitorozása ezért e gyermekekben lényeges és esetenként AT koncentrátum

adása válhat szükségessé. A thrombosit követő antikoagulálás stratégiája ATD gyermekekben egyáltalán nem kiforrott, nagy populáció vizsgálatán alapuló ajánlások nem is léteznek. Az ATBp3 homozigóta gyermekekben – saját vizsgálataink adatai alapján – az első thromboticus epizódot követően hosszú távú antikoagulálás javasolható.

- Antitrombin deficiencia terhességben

Célzottan a terhességek kimenetele szempontjából végzett retrospektív kohorsz tanulmányunkban n=28 beteg esetében végeztük el az ATD karakterizálását. E betegek gondozását a szerb kollaborációs partnerünk munkacsoportja végezte. 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 legfontosabb adatokat a **XV. Táblázat** tartalmazza.

XV. Táblázat. Az ATD betegek terhességeinek klinikai jellemzői.

	I-es típus	ATBp3 HoZ	ATBp3 HeZ	IIPE
Betegszám	11	5	10	2
Terhességek száma	12	27	17	8
Élveszületések száma (n) és aránya (%)	11 (100)	2 ^a (8)	16 (94)	4 (50)
Terhességi komplikációk, n (%)				
RFL	0	8 (30)	0	4 (50)
IUFD	0	17 (62)	0	0
Abruptio placentae	0	2 ^b (7)	1 ^b (6)	0
FGR	0	6 (22)	0	0
VTE	4 (33)	4 (15)	0	2 (25)
stroke	0	1 (4)	0	0

RFL, rekurrens magzati halál a 20. terhességi hét előtt; IUFD, intrauterin magzati elhalás a 20. terhességi hét után; FGR, magzati növekedésbeli elmaradás; VTE, vénás thromboembolia, HoZ, homozigóta; HeZ, heterozigóta.

Az élveszületések tekintetében a következő különbségeket találtuk: I-es típus vs. ATBp3 HoZ $p=0,0005$; I-es típus vs. ATBp3 HeZ $p=0.6241$; I-es típus vs. IIPE $p=0.0428$.

^a *koraszülés a 29. és 33. héten intrauterin növekedésbeli elmaradás miatt*

^b *abruptio placentae következményes magzati halállal*

(Kovac, M., Mitic, G., Mikovic, Z., Mandic, V., Miljic, P., Mitrovic, M., Tomic, B., Berezky, Z.: The influence of specific mutations in the AT gene (SERPINC1) on the type of pregnancy related complications. Thromb. Res. 173 12-19, 2019. közleményünk alapján.)

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. Az anyai VTE

legmagasabb arányban az I-es típusú ATD terhességekben volt megfigyelhető, viszont a IIHBS ATBp3 heterozigótáknál egyáltalán nem fordult elő.

A terhességek antikoaguláns profilaxis szempontjából történő elemzése során megállapítottuk, hogy míg az 1-1 I-es típusú, illetve IIPE típusú ATD beteg 1-1 terhessége antikoaguláns védelemben történő (LMWH profilaktikus, illetve terápiás dózisban a 20., illetve 14. héttől, AT szubsztitúció a szülést megelőzően, majd postpartum 3, illetve 5 napig) kiviselése sikeres volt (szülés a 38., illetve 40. héten), addig a IIHBS ATBp3 homozigóta betegek esetében a profilaxis kevésbé volt sikeres. Összesen 5 beteg 7 terhessége során történt antikoagulálás, ami igen alacsony arány, ez döntően azért volt így, mert a terhességek nagy része az ATD diagnózisának felállítása előtt zajlott. Profilaxisként itt is LMWH adása történt, nem egységes dózisokban, peripartum kiegészítve AT koncentráttal (2000 U/nap). Az LMWH profilaxis ellenére egy beteg fatális PE-t szenvedett szülés után 6 héttel, egy beteg stroke-ot kapott terhessége 12. hetében, egy beteg terhességének 7. hetében magasra terjedő v. iliaca, majd v. cava inferior thrombosiszt kapott, míg egy beteg szülést követően v. portae thrombosiszt szenvedett. A magzatokat tekintve elkeserítően alacsony volt a sikeres születek száma, mindössze 2 gyermek született meg a hét terhességből. Mindkét gyermek koraszülött volt, császármetszéssel születtek a 33., illetve 29. héten, mindketten jelentős fejlődésbeli elmaradással. A magzatok elvesztése a 8-22. hét között történt.

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. Thrombosis profilaxis nélkül minden esetben kedvezőtlen kimenetelt találtunk, és sajnos thrombosis profilaxis mellett is magas volt a kedvezőtlen terhességi kimenetek aránya. (A tanulmány közlése óta eltelt idő alatt további ATD terhes betegeket vontunk be, ahol az ATBp3 homozigóták sikeres terhességeinek száma – thrombosis profilaxis és szoros követés, terápia monitorozás mellett – növekedett.) 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

(https://cdn.ymaws.com/www.isth.org/resource/resmgr/subcommittees/bereczky_ssc_subcommittee_pr.pdf), melynek adataitól többek között azt is várjuk, hogy kellően nagy számú ATD terhéset elemezve, közelebb kerüljünk egy szakmai ajánlás megfogalmazásához.

- Antitrombin deficiencia és a vena cava rendszer atresiaja

A v. cava inferior (VCI) atresia ATD-val való társulásának szisztematikus vizsgálatát egy fiatal ATBp3 homozigóta nőbeteg esete indította, aki súlyos thrombosison esett át és klinikai kivizsgálása során VCI atresiát találtunk, illetve az a megfigyelés, hogy több ATD ATBp3 homozigóta betegünkönél jegyezték fel ún. véna fejlődési rendellenességet az anamnesisben. Spanyol kollaborációban (mivel ők rendelkeztek rajtunk kívül relatíve nagy számú ATBp3 beteggel) igyekeztünk vizsgálni e két entitás: az ATD IIHBS ATBp3 homozigóta állapot és VCI atresia együttes előfordulását. A két ország kohorszait összetéve n=61 ATBp3 homozigóta esetet találtunk, ezek közül n=46 beteget tudtunk elérni, közülük n=24 esetében történt abdominális képalkotó vizsgálat, illetve adták beleegyezésüket a hasi CT elvégzéséhez. A betegek demográfiai, klinikai és laboratóriumi adatait a **XVI. Táblázat** tartalmazza. A 24 beteg közül n=16 esetében lehetett VCI atresiát igazolni, mindegyikükönél 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. Minden ATBp3 homozigóta betegnél, akit a tanulmányba bevontunk, egy kivételével, thrombosis szerepelt az anamnesisben. Heten még gyermekkorban szenvedték el az első thromboticus eseményüket, ezek közül öt betegnél igazolódott VCI atresia, hárman közülük FV Leiden hordozók is voltak. Tizenhat beteg felnőtt korban szenvedte el első thrombosisát, közülük tíz esetben detektáltunk VCI atresiát és hárman voltak FV Leiden karrierek. A VCI atresiával járó esetekben az első thromboticus esemény idején ugyan alacsonyabb median életkort regisztráltunk (21 év vs. 30 év), de a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns. A két csoport AT aktivitás és antigén értékében sem észleltünk különbséget. A rekurrens thrombosisok aránya sem mutatott különbséget a két csoportban. A rekurrens thrombosis két eset

kivételével a folyamatos antikoagulálás ellenére következett be. Minden első thromboticus esemény alsó végtagi MVT volt, a rekurrens események között észleltünk csupán egy stroke-ot, illetve egy splanchnicus vénát érintő thrombosit. Feltehetően a VCI atresia és következményesen a v. azygos rendszeren át történő vénás visszaáramlás miatt tüdőembolia egyik betegnél sem társult a MVT-hoz.

XVI. Táblázat. Az antitrombin Budapest 3 homozigóta állapot és a v. cava inferior atresia társulása; a betegek klinikai és laboratóriumi jellemzői

Beteg	Nem	Kor (év)	AT aktivitás (%)	AT antigén (%)	Első thromboticus esemény (kor, év)	Recurrans MVT	VCI Atresia (szegmens)	Egyéb thrombophilia	Antikoaguláns terápia
1	N	29	18	70	MVT (24)	igen	igen (infrarenalis)	nem	VKA
2	N	48	24	70	MVT (30)	nem	nem	nem	VKA
3 ^a	N	44	17	69	MVT (39)	nem	nem	FV Leiden HeZ	DAB 150 mg BID
4 ^a	F	50	9	69	MVT (50)	nem	nem	FV Leiden HeZ	DAB 150 mg BID
5	F	40	15	81	MVT (16)	nem	igen (infrarenalis)	FV Leiden HeZ	VKA
6	F	35	8	75	MVT (30)	nem	nem	nem	VKA
7	F	87	28	ND	MVT (67)	igen	igen (infrarenalis)	nem	VKA
8	F	32	18	95	MVT (21)	igen (2x)	igen (infrarenalis)	nem	DAB 150 mg BID
9	N	55	12	80	MVT (15)	nem	igen (infrarenalis)	nem	VKA
10 ^a	N	27	14	84	MVT (16)	igen	igen (infrarenalis)	nem	API 5 mg BID
11	F	26	23	84	MVT (16 napos)	igen (3x)	igen ^b (infrarenalis)	FV Leiden HeZ	VKA
12	F	12	16	80	Nem volt	nem	igen (infrarenalis)	nem	Nem
13	N	32	ND	ND	MVT (29)	nem	igen (infrarenalis)	FV Leiden HeZ	RIVA 20 mg OD
14	N	27	25	70	MVT (25)	nem	igen (infrarenalis)	nem	VKA
15	N	75	15	76	MVT (20)	nem	igen (infrarenalis)	nem	RIVA 20 mg OD
16	F	34	16	84	MVT (25)	nem	igen (infrarenalis)	nem	VKA
17	F	30	14	ND	MVT (24)	igen	nem	nem	RIVA 15 mg BID
18 ^a	N	28	17	76	MVT (22)	igen	nem	nem	RIVA 20 mg OD
19	F	61	12	ND	MVT (35)	igen	nem	nem	RIVA 20 mg OD
20	N	27	16	88	MVT (10)	igen	nem	nem	API 5 mg BID
21	F	22	16	80	MVT (14)	nem	igen (infrarenalis)	nem	VKA
22 ^a	F	28	17	90	MVT (21)	igen	igen (infrarenalis)	nem	API 5 mg BID
23 ^a	N	27	17	ND	MVT (24)	nem	igen (infrarenalis)	nem	API 5 mg BID
24	F	30	22	88	MVT (13)	igen	igen (infrarenalis)	FV Leiden HeZ	VKA

A 3. beteg és a 4. betegek testvérek, a 10. és 18. betegek testvérek, a 22. és 23. betegek testvérek. bvenographiával és cavographiával igazolva. Az első nyolc beteg a spanyol, a többi a magyar kohorszból származik. N, nő; F, férfi; VKA, K-vitamin antagonist; DAB, dabigatran; RIVA, rivaroxaban; API, apixaban; BID, két dózis/nap; OD, egy dózis/nap; MVT, mély vénás thrombosis; VCI, v. cava inferior; HeZ, heterozigóta; ND, nincs adat. Referencia tartományok AT aktivitás és antigén 80-120%. (de la Morena-Barrio, M., Gindele, R., Bravo-Pérez, C., Ilonczai, P., Zuazu, I., Speker, M., Oláh, Z.,

Rodriguez-Sevilla, J., Entrena, L., Infante, M., Morena-Barrio, B., García, J., Schlamadinger, 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. közleményünk alapján.)

Mivel mind a spanyol, mind a magyar ATBp3 betegek azonos haplotípussal rendelkeztek az ATBp3 mutáció alapító hatása miatt (ld. később), így felmerülhetett az, hogy a VCI atresia esetleg nem az ATD következménye, hanem valamelyik, az AT-t kódoló gén közelében elhelyezkedő gén eltéréssel hozható összefüggésbe. Ennek kizárására 14 STR markert evaluáltunk (ld. módszerek fejezetben). Ezek vizsgálata során mind a VCI atresiával rendelkező, mind a negatív esetekben hasonló mintázatokat találtunk, továbbá azt is megállapítottuk, hogy a *SERPINC1* gén közelében nem található olyan gén, ami vascularis eltéréssel hozható összefüggésbe.

Megállapítottuk tehát, hogy az ATD IIHBS típusában, az ATBp3 homozigóta betegek között gyakori a VCI atresia. Mivel az AT a ma ismert legfontosabb antikoaguláns tulajdonságú fehérjénk, ami a legtöbb alvadási tényezőt gátolja, így nem meglepő, hogy ATD esetén nagyon súlyos thromboticus következményekkel számolhatunk. Az ATBp3 homozigótaság még az ATD-n belül is kiemelten súlyos állapot, ma úgy tartjuk, hogy a legsúlyosabb thrombophilia. Ismert, hogy az AT teljes hiánya embrionális letalitást okoz egerekben, az elhalt embriókban intravascularis koaguláció jeleit mutatva, homozigóta AT mutáns zebraalakban pedig masszív intracardialis thrombosiszt okozva [431,432]. Saját klinikai vizsgálatainkban is megfigyeltük, hogy az ATD ATBp3 homozigóta állapot általában már kisgyermek vagy csecsemőkorban thrombosiszt okoz. Mindezekből logikus az a feltételezés, hogy a ATBp3 homozigóta magzatok már az intrauterin életben, korai thrombosiszt 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. Amennyiben feltételezzük, hogy a VCI atresia (agenesia) valóban a korai thrombosis következménye, potenciálisan egyéb, súlyos thrombophiliás állapotokhoz is társulhat, ezért ennek vizsgálatát munkacsoportunk elindította. 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 thrombosisztól és

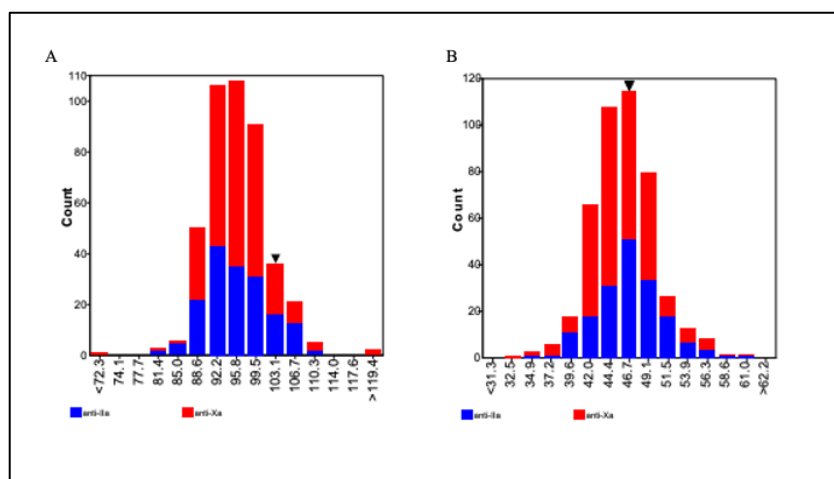
esetleg csak később, a postnatalis életben jelentkeznek tünetek. Következtetésként azt is levonhatjuk e tanulmányunkból, hogy a VCI atresiával rendelkező betegek magas thrombosis kockázattal rendelkeznek mind gyermek, mind felnőtt korban. A stasis és a kollaterális keringés, amit a VCI hiánya idéz elő, 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 képalkotó 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

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

Az ATD laboratóriumi diagnosztikája során kezdetben trombin (anti-FIIa) alapú, kereskedelmi forgalomban kapható tesztet használtunk, hasonlóan más, nemzetközi laboratóriumok gyakorlatához. Amint a szisztematikus adatgyűjtésünk és adatbázisunk kialakításának eredményeképpen egyre nagyobb számban álltak rendelkezésre klinikai, laboratóriumi és genetikai adatok, valamint azonosítottunk olyan, a klinikum és a genetikai teszt alapján nyilvánvalóan ATD beteget, akinél az anti-FIIa alapú funkcionális teszt nem jelzett, megvizsgáltuk, hogy van-e különbség az anti-FIIa alapú és a számunkra akkor rendelkezésre álló, szintén kereskedelmi forgalomban kapható anti-FXa alapú tesztek szenzitivitása között. A kérdés azért volt lényeges, mert az ATD elsővonalbeli (szűrő) tesztje a heparin jelenlétében végzett funkcionális teszt, amit mind az anti-FIIa, mind az anti-FXa alapú teszt formájában el lehet végezni és vizsgálataink kezdetének idején az ajánlások nem tettek semmiféle különbséget a kétféle módszertan között. A diagnosztikai laboratóriumok vagy egyik, vagy másik tesztet végezték, nem állt rendelkezésre egy adott laboratóriumban mindkét féle módszer. Amennyiben azonban egyik vagy másik módszer szenzitivitása nem megfelelő, úgy a hamis negatív eredmény birtokában – mivel negatív funkcionális (szűrő) teszt eredmény esetén a diagnosztikai protokollok szerint további vizsgálatok nem szükségesek, az ATD diagnózisát el lehet vetni – ATD betegek maradnának diagnózis nélkül. Az pedig nyilvánvaló, hogy az ATD aluldiagnosztizálása súlyos klinikai következményekkel jár e betegekre nézve.

A nemzetközi körkontrollok adataiból az tűnik ki, hogy normál AT aktivitás értékek esetén (egészséges személyek), vagy I-es típusú, azaz kvantitatív ATD esetén az anti-FIIa alapú és az anti-FXa alapú funkcionális (szűrő) tesztek hasonló módon viselkednek. **(26. ábra)** Az ECAT (External quality Control for Assays and Tests, nemzetközi hemosztázis laboratóriumi körkontroll szervezet) 2022. évben készített jelentése alapján (www.ecat.nl) is jól látható, hogy normál AT szint (AT aktivitás 96% a bemutatott mintában) és mennyiségi ATD esetén (AT aktivitás 46% a bemutatott mintában) az anti-FIIa-és anti-FXa alapú tesztekkel kapott eredmények között nincs különbség. A körkontrollban résztvevő laboratóriumok (melynek az általam vezetett hemosztázis laboratórium is több mint 20 éve tagja) többsége (n=260 a normál minta esetében és n=272 a patológiás mintánál) az anti-FXa alapú tesztet használta, de viszonylag jelentős számú, n=169 (normál minta), illetve n=178 (patológiás minta) laboratórium mért anti-FIIa alapú teszttel e viszonylag friss, 2022-es jelentés szerint. (Korábban, az anti-FIIa tesztet használó laboratóriumok száma még magasabb volt.) Az anti-FIIa alapú tesztek közül 2022-ben legtöbbször a Stago Stachrom ATIII (n=85, ill. n=89 laboratórium) és a Siemens Berichrom AT (n=74, ill. n=79 laboratórium) használták, a többi anti-FIIa alapú tesztet elenyésző számú laboratórium alkalmazta. Az anti-FXa alapú tesztek közül legtöbbször a Werfen HemosIL liquid Anithrombin reagenst (n=148, ill. n=151 laboratórium) és a Siemens Innovance AT reagenst (n=96, ill. n=99 laboratórium) használták. A többi, anti-FXa alapú teszt használata elenyésző volt. Az anti-FIIa alapú teszttel kapott AT aktivitások átlaga a normál plazma esetében 96%, a kvantitatív ATD plazma esetén 47%, az anti-FXa alapú teszttel kapott AT aktivitások átlaga normál plazma esetén szintén 96%, a kvantitatív ATD plazma esetén 46% volt.



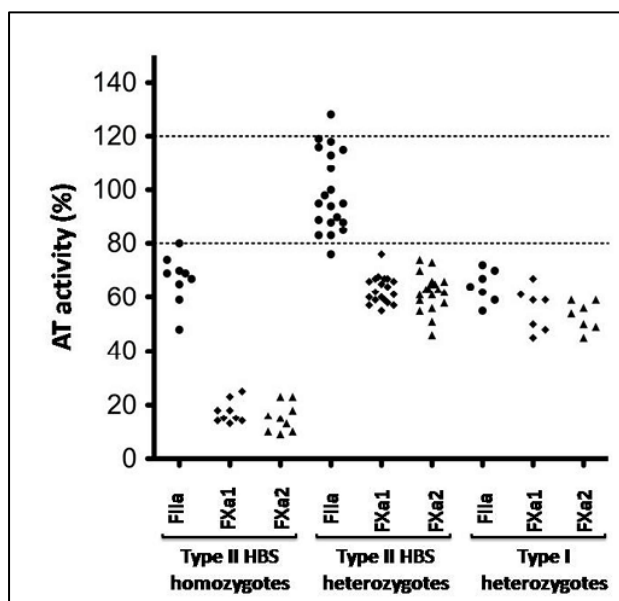
26. ábra. Antitrombin aktivitás értékek normál plazma és kvantitatív ATD plazma esetén az ECAT nemzetközi körkontroll programban résztvevő laboratóriumok eredményei alapján.

A, normál AT aktivitással rendelkező plazma B, kvantitatív ATD plazma

Kék színnel az anti-FIIa alapú, pirossal az anti-FXa alapú tesztekkel kapott eredmények láthatóak. A grafikon vízszintes tengelyén az AT aktivitás értékek láthatóak %-ban kifejezve. A függőleges tengelyen az adott értéket mérő laboratórium száma van feltüntetve. (Az ábra az ECAT 2022-es évi jelentéséből származik.)

A II-es típusú ATD laboratóriumi viselkedése azonban, különbözik a normál AT szintek és a kvantitatív ATD esetében megfigyeltektől. 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. Az I-es típusú ATD betegek AT aktivitás értékeinek átlaga rendre 64,1%, 55,57% és 53,14% volt a Berichrom AT, Innovance AT és az általunk kidolgozott esszében. A IIPE ATD beteg AT aktivitás értékei rendre 68%, 64% és 72% voltak. A IIHBS ATD betegek esetében a Berichrom AT tesztben viszont jelentős fölélméréseket tapasztaltunk (27. ábra). A heterozigóta IIHBS betegek közül n=12 az ATBp3 mutációt hordozta, n=3 az AT Basel, n=5 az AT Padua mutációt hordozta. E betegek AT aktivitás értékei egy kivétellel (ATBp3 beteg) minden esetben a referencia tartományba (80-120%) estek a Berichrom AT tesztel. Az anti-FXa alapú tesztekkel viszont minden esetben a referencia tartomány alsó határa alatti, kóros értéket kaptunk. A homozigóta ATBp3 (n=9) betegek esetében az anti-FIIa alapú Berichrom AT 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.



27. ábra. A IIHBS és I-es típusú ATD betegek AT aktivitás értékeinek összehasonlítása anti-FIIa és anti-FXa alapú tesztekben.

FXa1 teszt: Innovance AT; FXa2 teszt: az általunk kidolgozott anti-FXa teszt; FIIa teszt: Berichrom AT (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. közleményünk alapján.)

Az ábrából az is jól látszik, hogy az anti-FXa tesztek esetében a IIHBS homo- és heterozigóta betegek között diszkriminációra is alkalmas különbségek vannak. Az anti-FIIa /anti-FXa (Innovance AT) AT aktivitások hányadosa 4,02 (tartomány 2,96-5,31) volt az ATBp3 homozigóták esetében. Ugyanez a hányados 1,54 (tartomány 1,24-1,83) volt a IIHBS heterozigóták esetében és 1,16 (tartomány 0,93-1,34) az I-es típusú betegek és a IIPE beteg összevont csoportjában. Az általunk kidolgozott anti-FXa esetében ezek a hányadosok hasonlóak voltak. Rendre 4,79 (tartomány 2,56-6,9), 1,59 (tartomány 1,19-2,17) és 1,18 (tartomány 0,93-1,38).

Az anti-FIIa és anti-FXa tesztek IIHBS ATD esetében észlelt eltérő szenzitivitása hátterében feltehetően az AT trombint és FXa-t gátló hatásának különbsége áll. A trombin gátlása esetében ugyanis az AT-nak a hozzákötődő pentaszacharid allosztérikus hatása által kiváltott konformációváltozása nem elégséges, és nem is feltétlenül szükséges. A trombin maga is kötődik a heparinhoz (szemben a FXa-val, ami nem kötődik közvetlenül a heparinhoz), így a heparin 18 szacharidos

egysége által közvetített híd effektus az elsődleges az AT-trombin interakcióhoz [262,433]. Ebből kifolyólag a heparin-kötő régiót érintő mutáció feltehetően nagyobb hatással van az AT anti-FXa aktivitására az anti-FIIa aktivitáshoz viszonyítva a heparin jelenlétében elvégzett funkcionális tesztekben. Úgy gondoljuk, hogy az egyéb teszt kondícióknak kisebb a jelentősége az anti-FXa vs. anti-FIIa összehasonlításban, hiszen a vizsgálandó plazma előhígításának mértéke igen hasonló a kétféle tesztben (50-, illetve 100-szoros), az inkubációs idő megegyezik a Berichrom és az Innovance AT tesztekben (180 sec). 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.

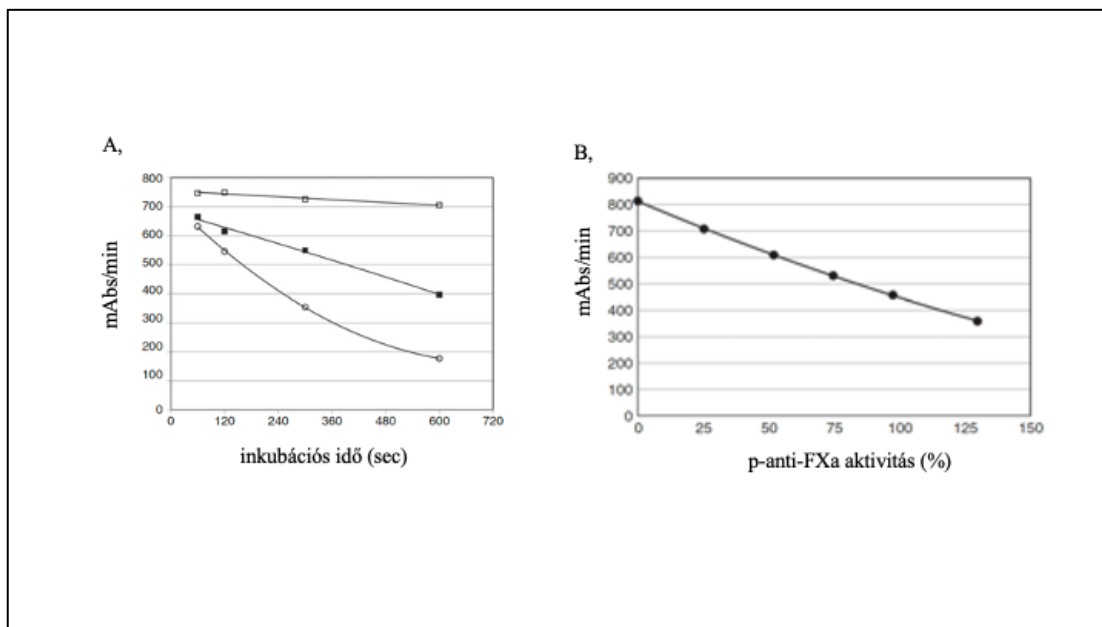
5.2.2.2 *A p-anti-FXa esszé kidolgozása és evaluációja*

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). Feltételeztük, hogy e teszt elvégzésével jól el lehet különíteni a IIHBS ATD típust a többi funkcionális variánstól, ahol a FXa gátlásának elégtelensége nem az AT-heparin kapcsolat sérülése miatt következik be. A p-anti-FXa teszt korábban kereskedelmi forgalomban nem létezett.

Az általunk kidolgozott teszt összetétele és mérési protokollja a módszerek fejezetben olvasható, itt a teszt laboratóriumi és klinikai evaluációjával kapcsolatos adatokat ismertetem.

A p-anti-FXa teszt legfőbb különbsége a hc-anti-FXa teszthez képest a hozzáadott heparin hiánya, illetve a mintában esetlegesen jelen lévő heparin (terápiásan adott heparin, vagy heparin szennyeződés) neutralizációja polibrénnel. Mivel heparin hiányában a FXa gátlása sokkal lassabban fejlődik ki, mint heparin jelenlétében, a tesztet úgy is módosítanunk kellett, hogy megnöveltük az inkubációs időt és csökkentettük a plazma előhígításának mértékét, hogy az abszorbanciaváltozás a jól mérhető tartományba essen. Az ábra mutatja a FXa gátló aktivitás inkubációs idő- és

plazma előhígítás-függését. A tesztet végül úgy alakítottuk ki, hogy a plazma mennyiséget növeltük az eredeti hc-anti-FXa teszthez képest, így az ötvenszeres előhígítás helyett ötszörös előhígítást alkalmaztunk és a vizsgálandó plazmát a FXa hozzáadását követően végül 5 percig inkubáltuk (28. ábra).



28. ábra. A p-anti-FXa teszt karakterisztikumai. A, Az anti-FXa aktivitás inkubációs idő- és plazma hígítástól való függése. B, A p-anti-FXa teszt kalibrációja.

Az A, ábrán az üres négyzet az ötvenszeresen hígított plazma, a fekete négyzet a tízszeresen hígított plazma, az üres kör pedig az ötszörösösen hígított plazma jelenlétében mért abszorbancia értéket mutatja egy perc után leolvasva különböző inkubációs idők mellett. Jól látható, hogy a legalacsonyabb mAbs értéket 5 perc inkubációs időnél és a legkisebb plazmahígítás mellett találtuk. (Mivel a tesztben az AT anti-FXa aktivitásának következtében a maradék FXa aktivitás csökken, ezért a FXa kromogén szubsztrátjának jelenlétében a reakció végén az abszorbanciaváltozás mértéke fordítottan arányos az AT anti-FXa aktivitásával.) A B, ábrán a teszt kalibrációja látható, amit a Werfen HemosIL kalibrációs plazma egy perc után, 405 nm-en történő mAbs értékeinek leolvasásával nyertünk. (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.közleményünk alapján.)

A teszt precizitását jellemzik a következők: normál kontroll plazma esetében a reprodukálhatóság, azaz az egy futáson belüli megismételhetőség variációs koefficiense (CV) 3,2% volt (AT aktivitás átlag $\pm$ SD 102,3 $\pm$ 3,3%), a laboratóriumon belüli reprodukálhatóság, azaz a különböző napokon mért AT aktivitások CV értéke 2,15% volt (AT aktivitás átlag $\pm$ SD 102,3 $\pm$ 2,2%). Patológiás kontroll plazma esetén

ezek az értékek CV 3,75% (AT aktivitás átlag $\pm$ SD 41,9 $\pm$ 1,6%) és CV 1,89% (AT aktivitás átlag $\pm$ SD 41,9 $\pm$ 0,8%) voltak. A hemoglobin 500 mg/L-ig, a bilirubin 200 μ mol/L-ig, a triglicerid 10 mmol/L-ig nem interferált a teszttel. Annak megállapítására, hogy a plazmában jelenlévő és anti-FXa aktivitással bíró egyéb fehérjék milyen mértékben járulhatnak hozzá a tesztünkkel mért anti-FXa aktivitáshoz (azaz ronthatják a teszt AT iránti specificitását), először AT deficiens plazma hc-anti-FXa és p-anti-FXa aktivitását mértük meg. A p-anti-FXa aktivitás így 20,4%-nak adódott (a referencia populációnkon mért átlagos p-anti-FXa aktivitás %-ában kifejezve). A hc-anti-FXa aktivitása az AT hiányplazmának zéró volt. Mivel a nem heparin-függő anti-FXa aktivitás hátterében elsősorban az α_1 -antitripszin és az α_2 -makroglobulin aktivitása áll, megvizsgáltuk a p-anti-FXa aktivitást e tisztított fehérjék normál plazma koncentrációjuk jelenlétében. A p-anti-FXa aktivitás 2,0 mg/mL α_1 -antitripszin jelenlétében megfelelt a normál plazma átlag 9,5%-nak, ugyanennyi α_2 -makroglobulin jelenlétében pedig 4,0%-nak. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a p-anti-FXa aktivitásért 80%-ban az AT felelős e tesztrendszerben. Ez a diagnosztika szempontjából nem zavaró, hiszen a IIHBS típusú ATD esetek kivételével az ATD csak heterozigóta formában fordul elő, ahol az AT aktivitása 50% körül van, a IIHBS esetekben pedig a p-anti-FXa aktivitás elvileg nem is csökkent. Így nem várható, hogy a maximum 20%-os, nem az AT gátló hatásából fakadó p-anti-FXa aktivitás érdemben befolyásolná az ATD diagnosztikáját.

A klinikai vizsgálatokhoz n=78 ismert ATD beteg plazma mintáját használtuk, ahol minden esetben előzetesen megállapítottuk az ATD hátterében álló mutációt, így a betegeket egyértelműen be tudtuk sorolni az ATD különböző típusaiba. Összesen n=8 beteg I-es típusú, n=1 IIPE, n=69 IIHBS ATD-ben szenvedett. Utóbbi csoportban n=18 ATBp3 homozigóta beteg volt, a többiek – ATBp3 mutáció túlsúllyal – IIHBS heterozigóták voltak. Kontrollként n=24 személy mintáját használtuk, akik az ATD betegek első fokú rokonai voltak, de a családvizsgálatok során az ATD-t genetikai vizsgálattal biztosan kizártuk. További kontroll mintákat önmagukat egészségesnek tartó személyektől (n=188) nyertünk. Ők nem estek át korábban sem vénás, sem artériás thromboticus eseményen, és nők esetében nem állt fenn terhesség vagy antikoncipiens szedése. E csoportban n=104 nő és n=84 férfi volt, medián életkoruk 34 év volt (IQR 26-41). A hc-anti-FXa és a p-anti-FXa aktivitások eloszlása normálnak bizonyult a statisztikai tesztjeinkben. (hc-anti-FXa teszt Kolmogorov-Smirnov d=0,043, p=0,2;

Shapiro-Wilk $d=0,994$, $p=0,634$; p-anti-FXa teszt Kolmogorov-Smirnov $d=0,058$, $p=0,2$; Shapiro-Wilk $d=0,989$, $p=0,154$) Kieső értéket nem találtunk. Parametrikus és nem-parametrikus módszerrel hasonló referencia tartományokat állapítottunk meg. A hc-anti-FXa aktivitás esetében parametrikus módszerrel 82-118%-nak, nem-parametrikus módszerrel 81-117%-nak adódott. A p-anti-FXa aktivitás esetében parametrikus módszerrel 82-118%-nak, nem-parametrikus módszerrel 84-117%-nak adódott.

Ezek után megvizsgáltuk az ismert ATD betegek plazmamintáit az általunk kidolgozott hc-anti-FXa és p-anti-FXa tesztekkel (XVII. Táblázat).

XVII. Táblázat. Ismert ATD betegek AT aktivitása a hc-anti-FXa és p-anti-FXa tesztekben.

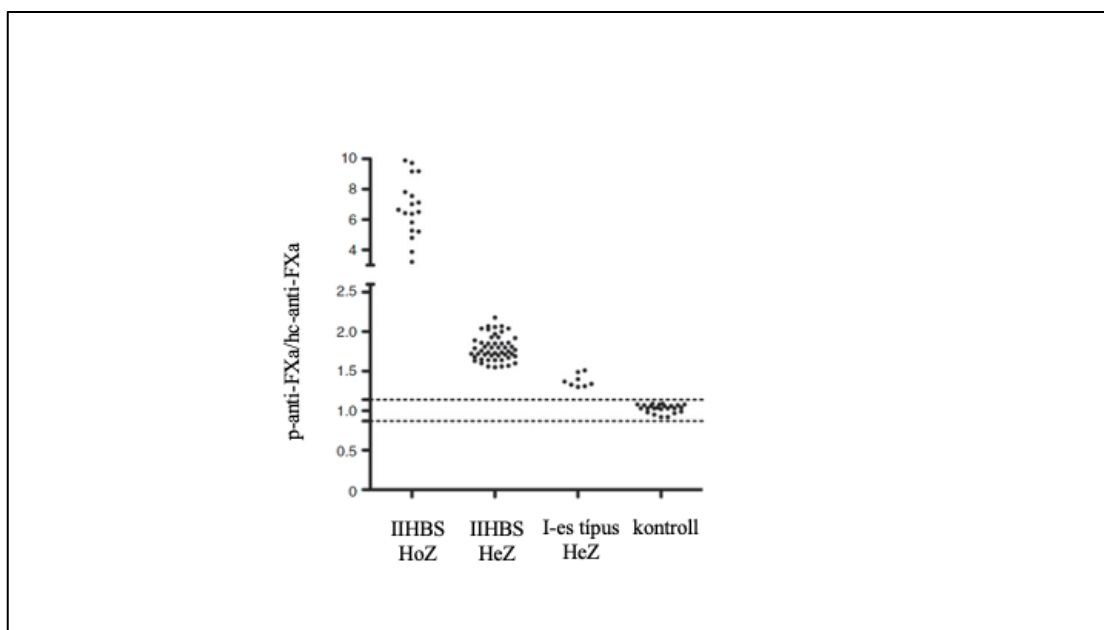
ATD típus	Minták száma, n	hc-anti-FXa aktivitás % (medián, tartomány)	p-anti-FXa aktivitás % (medián, tartomány)	AT antigén koncentráció % (medián, tartomány)
IIHBS homozigóta (p.Leu131Phe)	18	12 (8-26)	77 (64-106)	79 (51-98)
IIHBS heterozigóta (p.Leu131Phe)	43	51 (34-65)	90 (66-111)	99 (78-118)
IIHBS heterozigóta (p.Pro73Leu és Arg79His)	8	66 (48-74)	113 (86-126)	130 (108-137)
IIPE heterozigóta (p.Pro439Thr)	1	76	78	88
I-es típus heterozigóta	8	48,5 (43-56)	70 (56-76)	59,5 (52-72)

(Kovács, B., Bereczky, Z., Selmečzi, 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. közleményünk alapján.)

Az előre elvártaknak megfelelően a IIHBS homozigóták hc-anti-FXa aktivitása igen alacsonynak adódott. Ezzel szemben a p-anti-FXa aktivitásaik jelentősen magasabbak voltak és átfedtek a referencia tartománnyal. Az AT antigén koncentrációjuk megfelelt a p-anti-FXa aktivitásuknak. Már ebben a vizsgálatban is észleltük, hogy az ATBp3 homozigóták p-anti-FXa és AT antigén szintjei elmaradtak a normál értékektől, holott IIHBS deficiencia lévén, itt azt várnánk, hogy ezek az értékek referencia tartományon belül legyenek. Ez a megfigyelés sugallta, hogy az ATBp3 mutáció következményei túlmutatnak a heparin-kötés zavaránál, amit később

in vitro és in silico módszerekkel tovább tanulmányoztunk (ld. később). A IIHBS ATBp3 heterozigóta betegek hc-anti-FXa aktivitásai a vártak megfelelően csökkentek, a p-anti-FXa értékeik magasabbak voltak és nem mutattak átfedést a hc-anti-FXa értékeikkel, de egy-két beteg esetében itt is tapasztaltunk referencia tartomány alsó határa alatti aktivitást, hasonlóan az AT antigén szinthez. A másik két IIHBS mutáció esetében (p.Pro73Leu és Arg79His, azaz AT Basel és AT Padua) a hc-anti-FXa értékek kórosan alacsonyok voltak, a p-anti-FXa értékek pedig minden betegnél a referencia tartományon belül voltak, hasonlóan az AT antigénhez. Az I-es típusú betegeknél és az egyetlen IIPE betegnél mind a hc-anti-FXa, mind a p-anti-FXa aktivitások arányosan alacsonyok voltak, az AT antigén I-es típusban a vártak megfelelően szintén csökkent.

Megállapítottuk, hogy a p-anti-FXa/hc-anti-FXa aktivitás értékek hányadosa jó diszkriminációs képességgel rendelkezik a különböző típusú ATD elkülönítésére (29. ábra).



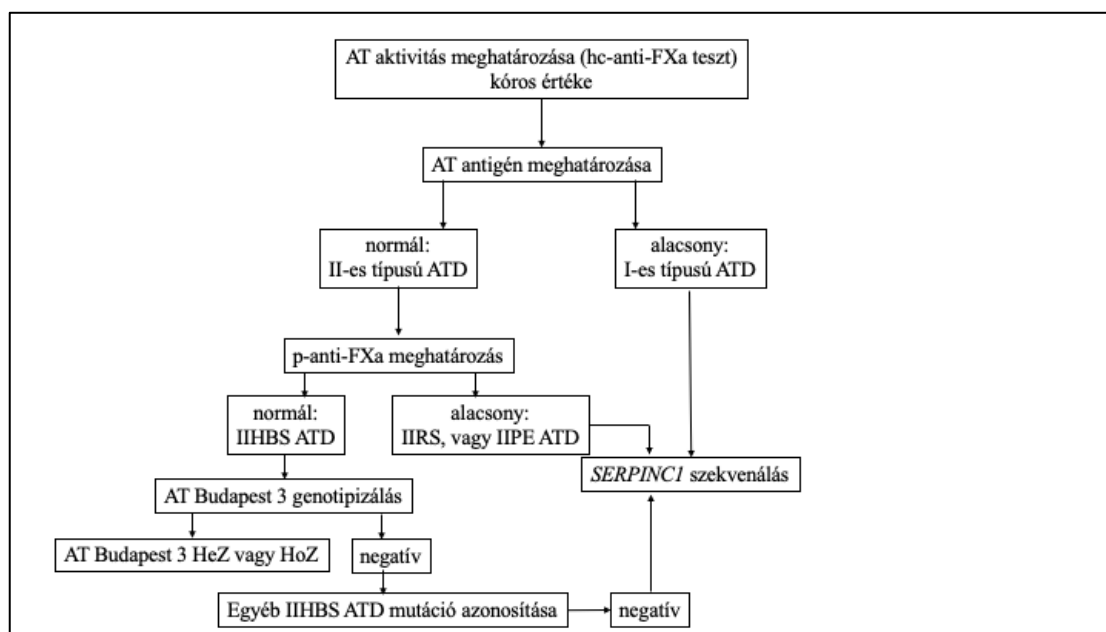
29. ábra. A p-anti-FXa és hc-anti-FXa hányados különböző típusú ATD betegeknél.

HoZ, homozigóta; HeZ, heterozigóta. A szaggatott vonalak a referencia tartomány (0,87-1,14) alsó és felső határát jelzik, amit a kontroll személyek p-anti-FXa/hc-anti-FXa hányadosaiból nem-parametrikus módszerrel határoztunk meg. (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.közleményünk alapján.)

A IIHBS ATBp3 homozigóták p-anti-FXa/hc-anti-FXa hányadosai nagyon magasak, de a IIHBS heterozigóták p-anti-FXa/hc-anti-FXa hányadosai is jelentősen meghaladják a normál kontroll személyek méréseiből megállapított referencia tartomány felső határát. Az I-es típusú ATD heterozigóta betegek p-anti-FXa/hc-anti-FXa hányadosai jól elkülöníthetők a IIHBS betegek értékeitől jó diszkriminációs lehetőséget biztosítva az ATD diagnosztikában. Az I-es típusú ATD betegek p-anti-FXa/hc-anti-FXa hányadosai kissé magasabbak a kontroll csoportnál kalkulált értékeknél, ami abból adódik, hogy a p-anti-FXa aktivitás értékek kissé magasabbak a hc-anti-FXa értékeknél, ez pedig a p-anti-FXa méréskor a nem AT által közvetített FXa gátlásból adódhat (ld. fentebb).

A p-anti-FXa teszt kidolgozását és evaluálását követően beillesztettük az ATD diagnosztikai protokollunkba, ami azért bír jelentőséggel, mert – részben saját klinikai vizsgálataink tanulságai, részben mások megfigyelései alapján – az ATD klinikai heterogenitása, elsősorban a thrombosis kockázat különböző mértéke eltérő az egyes típusokban. A IIHBS heterozigóták thrombosis kockázata alacsonyabb a többi típushoz viszonyítva, viszont a IIHBS homozigóták thrombosis kockázata extrém magas. E típusok elkülönítése tehát a betegek hosszú távú antithromboticus stratégiája szempontjából fontos. Mivel hazánkban pont ez a típus a leggyakoribb, nálunk az elkülönítő diagnózis kiemelten érdekes. A tesztek bevezetésével új diagnosztikus algoritmust dolgoztunk ki ATD-ban (**30. ábra**). Ennek lényege, hogy elsővonalbeli tesztként elvégezzük a hc-anti-FXa aktivitás meghatározását. Ennek kóros értéke esetén (80% alatt) megtörténik az AT antigén szint meghatározása, amivel elkülönítjük az I-es típusú ATD-t a minőségi zavaroktól. Normál, vagy a hc-anti-FXa aktivitáshoz viszonyítva aránytalanul magas AT antigén esetén a p-anti-FXa meghatározás következik. Ennek a hc-anti-FXa-val arányosan kóros értéke definiálja a IIRS és IIPE típusú ATD-t. A p-anti-FXa normál, vagy a hc-anti-FXa-hoz viszonyított magas értéke (ld. p-anti-FXa/hc-anti-FXa hányadosok) IIHBS ATD-t valószínűsít. Mivel az ATBp3 az elsődleges ATD típus hazánkban, ezért a végső diagnózis felállítása érdekében először az ATBp3 genotipizálását végezzük el, hiszen már így nagy valószínűséggel megtaláljuk az okozati mutációt. Negatív eredmény esetén folytatjuk az egyéb IIHBS típusok azonosításával, ami a *SERPINC1* második exonjának vizsgálatát jelenti. Igen ritka esetekben fordul elő, hogy ekkor sem azonosítunk okozati eltérést. Ekkor a *SERPINC1* teljes körű genetikai vizsgálata következik. Az algoritmushoz annyi kiegészítés tartozik még, hogy egyetlen 80% alatti hc-anti-FXa eredmény alapján nem

következik azonnal a veleszületett ATD diagnózisa, hiszen preanalitikai tényezők és szerzett állapotok akár átmenetileg is okozhatnak referencia tartomány alsó határa alatti AT szinteket. Azt javasoljuk tehát, hogy legalább két független mérésből kapott kóros hc-anti-FXa érték és a szerzett tényezők kizárása után történjen a fent említett diagnosztikai protokoll elvégzése. Azt is figyelembe kell venni, hogy extrém ritka esetekben a *SERPINC1* szekvenálása nem azonosítja az okozati mutációkat (pl. nagyobb génszakaszokat érintő eltérések). Ezek általában I-es típusú ATD-t okoznak és MLPA analízissel azonosíthatóak. Továbbá még ritkább lehetőség, hogy nem a *SERPINC1* génben van az okozati mutáció, mint például a glikoziláció zavarát okozó eltérések [279,434]. Léteznek tranziens ATD-t eredményező veleszületett rendellenességek is. A diagnóziskor ezeket is figyelembe kell venni. Egyes esetekben a hc-anti-FXa teszt nem jelzi a deficienciát (pl. AT Cambridge II), ilyenkor a trombin alapú funkcionális teszt elvégzése indokolt lehet.



30. ábra. Az antitrombin deficiencia általunk javasolt diagnosztikai algoritmus.

HoZ, homozigóta; HeZ, heterozigóta

Összefoglalva, az ATD diagnosztikájának javítása érdekében tett reagens fejlesztéseink eredményeképpen egy olyan, ma már kereskedelmi forgalomban kapható tesztet dolgoztunk ki, ami parallel képes a hc-anti-FXa és a p-anti-FXa aktivitás meghatározására. A tesztet adaptáltuk több automata koagulométerre és az azóta eltelt

közel tíz év saját tapasztalata szerint sikerrel használjuk az ATD (differenciál)diagnosztikájában.

5.2.2.3 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, amit a XVIII. Táblázat szemléltet.

XVIII. Táblázat. Különböző hc-anti-FXa tesztek összehasonlítása antitrombin deficienciában.

	ATD mutáció	Heparin kofaktor anti-FXa AT aktivitás (%)			Progresszív anti-FXa AT aktivitás (%)	AT antigén (g/L)
		Siemens Innovance AT	Werfen HemosIL AT	Labexpert Antithrombin H+P		
I-es típus		57 (39-67) n=22	45 (30-62) n=11	53 (43-66) n=21	67 (53-81) n=22	0,16 (0,13-0,19) n=22
IIHS típus		53 (52-64) n=2	58 n=1	52 (50-54) n=2	69 (61-77) n=2	0,26 (0,22-0,27) n=3
IIPE típus		56 (53-73) n=9	55 (54-56) n=3	65 (53-76) n=9	69 (58-78) n=9	0,21 (0,18-0,26) n=9
IIHBS típus	p.Pro73Leu (AT Basel)	59 (50-68) n=5	107 (105-108) n=3	64 (52-74) n=5	99 (97-117) n=6	0,28 (0,25-0,32) n=7
	p.Arg79His (AT Padua)	63 (54-73) n=14	112 (96-129) n=10	65 (48-69) n=14	118 (73-126) n=15	0,30 (0,28-0,35) n=15
	p.Leu131Phe (ATBudapest3) HoZ	17 (12-46) n=18	45 (42-53) n=10	11 (8-28) n=20	70 (56-100) n=21	0,20 (0,13-0,28) n=25
	p.Leu131Phe (ATBudapest3) HeZ	58 (42-43) n=85	82 (55-103) n=25	56 (36-71) n=85	84 (60-122) n=92	0,25 (0,19-0,35) n=102

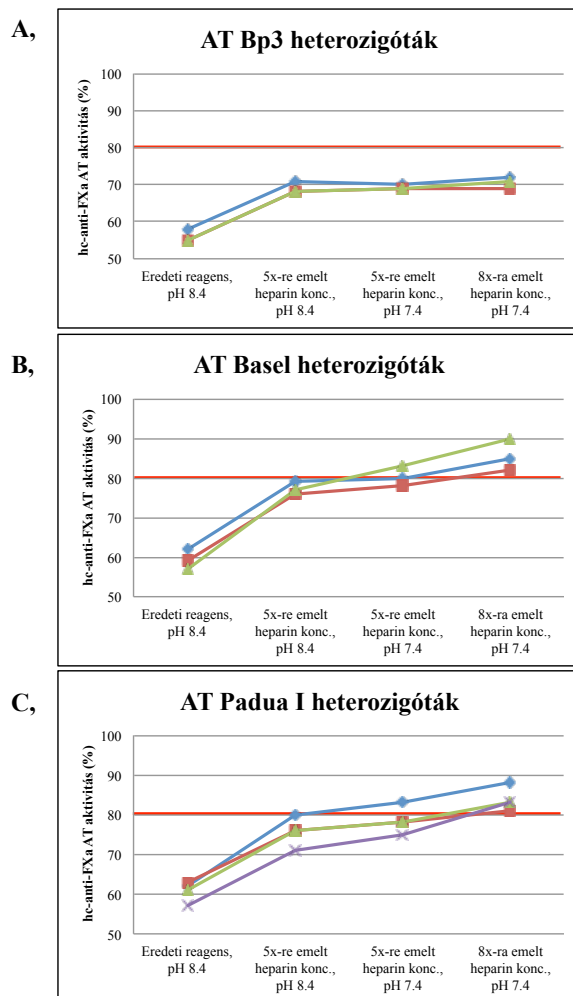
HoZ, homozigóta; HeZ, heterozigóta

Referencia tartományok: hc-anti-FXa aktivitás 80-120%, p-anti-FXa aktivitás 82-118%, AT antigén 0,19-0,31 g/L. Félkövérrrel vannak szedve azok az értékek, melyek nem felelnek meg a diagnosztikus követelményeknek (ld. a szövegben). (Gindele, R., Selmecezi, A., Oláh, Z., Ilonczai, P., Pfliegler, G., Marján, E., Nemes, L., Nagy, Á., Losonczy, H., Mitic, G., Kovac, 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. közleményünk alapján.)

A hc-anti-FXa aktivitás és a p-anti-FXa aktivitás minden I-es típusú ATD betegben arányosan alacsony volt. Az AT antigén koncentráció is a vártnak megfelelően csökkent volt. A IIRS és IIPE esetekben minden tesztben mért hc-anti-FXa aktivitás és a p-anti-FXa aktivitás szimultán csökkenést mutatott, az AT antigén normál volt. (A IIPE esetekben nem meglepő a határérték AT antigén, hiszen ez egy ismert komplex deficiencia, ahol a funkcionális defektus mellett mutációtól függő módon egy kis mértékű kvantitatív komponens is jelen lehet.) A IIHBS esetekben viszont meglepő módon az egyik hc-anti-FXa reagenssel jelentősen magasabb AT aktivitás értékeket tapasztaltunk, annyira, hogy egyes betegeknél az AT aktivitása referencia tartományon belül volt. Az általunk kidolgozott hc-anti-FXa teszt minden esetben alacsony AT aktivitás értéket mutatott a IIHBS egyénekben (100% szenzitivitású). Az AT Basel és az AT Padua I esetében a p-anti-FXa aktivitás és az AT antigén koncentráció minden esetben a referencia tartományon belül volt; a p-anti-FXa/hc-anti-FXa arány mediánja AT Basel esetében: 1,66 (tartomány 1,53-2,05) és AT Padua I esetében: 1,89 (tartomány 1,71-2,10) volt. Néhány, ATBp3 mutációt hordozó egyén esetében alacsony p-anti-FXa aktivitás és AT antigén koncentráció értékeket detektáltunk, ez leginkább a homozigóta egyéneknél fordult elő. A p-anti-FXa/hc-anti-FXa arány mediánja a heterozigótáknál: 1,51 (tartomány: 1,28-2,11) és a homozigótáknál: 5,60 (tartomány: 2,88-8,85) volt. A IIHBS AT Padua I és Basel AT plazmák a Siemens AT esszével és a mi diagnosztikus tesztünkkel alacsony hc-anti-FXa AT aktivitást mutattak minden esetben, a HemosIL teszttel azonban az AT aktivitása referencia tartományba esett. Az ATBp3 homozigóták AT aktivitás értékei mindhárom hc-anti-FXa teszttel csökkent értéket mutattak, azonban a HemosIL teszttel szignifikánsan magasabb értékeket kaptunk. Ezzel a teszttel kapott eredmények alapján úgy tűnhet, mintha ezek a betegek heterozigóta genotípusúak lennének. Végül, a HemosIL teszt érzékenysége az ATBp3 heterozigóták esetében mindössze 44% volt.

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 (**31. ábra**). 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. Amennyiben 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.



31. ábra. Az esszé körülményeinek módosításai és hatásuk az általunk kidolgozott hc-anti-FXa teszttel kapott eredményekre különböző IIHBS ATD betegek plazmáiban.

A heparin koncentráció növelésével és a pH csökkentésével a hc-anti-FXa test szenzitivitása csökken. A referencia tartomány felső határát (80%) piros vonal jelzi. (Gindele, R., Selmeczi, A., Oláh, Z., Ilonczai, P., Pfliegler, G., Marján, E., Nemes, L., Nagy, Á., Losonczy, H., Mitic, G., Kovac, 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. közleményünk alapján.)

Megállapítottuk tehát, hogy a funkcionális AT tesztek érzékenysége szempontjából nem feltétlenül kizárólag az enzim típusa (anti-FIIa vagy anti-FXa esszé) az egyetlen befolyásoló tényező. A kereskedelmi forgalomban kapható tesztek

érzékenységeinek különbségei a IIHBS ATD betegek esetében mutatkoznak meg. Az általunk kidolgozott teszt minden típusú IIHBS ATD beteg esetében kóros értéket ad, ugyanígy észleltük a Siemens Innovance AT esszé esetében is, azonban a Werfen HemosIL AT reagens a heterozigóta IIHBS deficiensek nagy részénél (minden általunk vizsgált AT Basel és AT Padua I esetben és sok ATBp3 esetben is) hamisan normál eredményt adott. Ennek veszélye abban áll, hogy a IIHBS ATD aluldiagnosztizált lehet egyes tesztek alkalmazása mellett. Ezt a megfigyelést Orlando és munkatársai is közölték [435]. A pilot kísérletünk eredményei alapján arra következtettünk, hogy a hc-anti-FXa tesztek érzékenységében a heparin koncentráció és az ionerő a fő befolyásoló tényezők. Megállapításaink nyomán kaptunk felkérést az egyik diagnosztikai világcéggel való ipari együttműködésre, melynek során részletes laboratóriumi kísérletsorozatok után olyan átalakításokat javasoltunk a hc-anti-FXa tesztjükben, ami már megfelelő szenzitivitást biztosít az ATD minden típusának kimutatására. A módosított teszt piacra kerülése a közeljövőben várható.

A laboratóriumi tesztekkel kapcsolatos eredményeink azt is mutatják, hogy a IIHBS igen heterogén 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. (Ennek további részletes vizsgálatát ld. később).

5.2.3 Az Antitrombin Budapest 3 mutáció alapító hatása

5.2.3.1 *A mutáció alapító hatásának igazolása*

A magyarországi ATD betegek döntő többsége a IIHBS ATBp3 (p.Leu131Phe) mutációt hordozta. Eddig az irodalomban található szórványos eset riportok ATBp3 hordozó betegek esetében kelet-európai származásról számoltak be. Ezek indítottak bennünket arra, hogy megvizsgáljuk e mutáció alapító hatásának lehetőségét. Az

alapító hatás igazolására 7 SNP-t, az 5'-LP-t és 4 mikroszatellita markert vizsgáltunk. Az ATBp3 mutációt hordozók minor allél frekvencia (MAF) értékei különböztek 200, random kiválasztott egészséges egyén értékeitől és a HapMap projektből származó európai populációra vonatkoztatott értékektől (XIX. Táblázat).

XIX. Táblázat. A vizsgált polimorf markerek MAF értékeinek összehasonlító táblázata az ATBp3 betegek, a populációs kontroll csoport és a HapMap adatok esetében.

Marker neve vagy rs azonosító	ATBp3 homozigóta betegek (n=26) MAF	ATBp3 deficiens probandok (n=63) MAF	ATBp3 deficiens betegek (n=102) MAF	Kontroll csoport (n=200) MAF	HapMap CEU adat (MAF)
rs5877 (A>G)	0,00	0,17	0,21	NA	0,33
rs5878 (A>G)	0,00	0,17	0,21	NA	0,33
5'-LP (R>H)	0,00	0,15*	0,19*	0,29	0,21
rs2227596 (A>G)	0,00	0,06*	0,09*	0,19	0,21
rs941989 (G>A)	0,00	0,17*	0,22*	0,37	0,33
rs2227612 (A>C)	0,00	0,06*	0,09*	0,15	0,13
rs1799876 (T>C)	0,00	0,14	0,18	NA	0,34
rs677 (G>C)	0,00	0,06	0,09	NA	0,16 [‡]

Az ATBp3 deficiens probandok csoportjába a homo- és heterozigóták is beletartoznak; az AT Bp3 deficiens betegek csoportjába pedig a probandokon kívül az érintett családtagok is beletartoznak.

MAF: Minor Allél Frekvencia; NA: nincs adat; R: rövid; H: hosszú; * $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva; az ATBp3 homozigóták között egy esetben sem fordultak elő a vizsgált minor allélok, ezért statisztikai analízist nem tudtunk végezni; [‡]mivel ezen SNP esetében HapMap adat nem állt rendelkezésre, ezért a PGA-EUROPEAN-PANEL adatait használtuk. (Gindele, R., Oláh, Z., Ilonczai, P., Speker, M., Udvari, Á., Selmeczi, 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.közleményünk alapján.)

A minor allélok egyetlen esetben sem fordultak elő az SNP-k és az 5'LP esetén az ATBp3 homozigóták között. Az rs5877, rs5878, rs1799876, rs941989, rs677 és rs2227596 SNP-k kapcsolt öröklődést mutattak.

A haplotípus analízis során kimutattuk, hogy a mutáns „T allél” egyetlen haplotípussal társult (XX. Táblázat). A normál „C allél” viszont különböző haplotípusokkal társult mind az ATBp3 mutáció hordozókban, mind a kontroll csoportban. Az ATBp3 homozigóták esetében kizárólag egyféle ismétlődésszámot találtunk az Alu 5 és Alu 8 (32. ábra) intragénikus mikroszatellita markerek analízisekor, a (ATT)₆ és (ATT)₁₅ ismétlődéseket. A kontroll csoportban az Alu 5

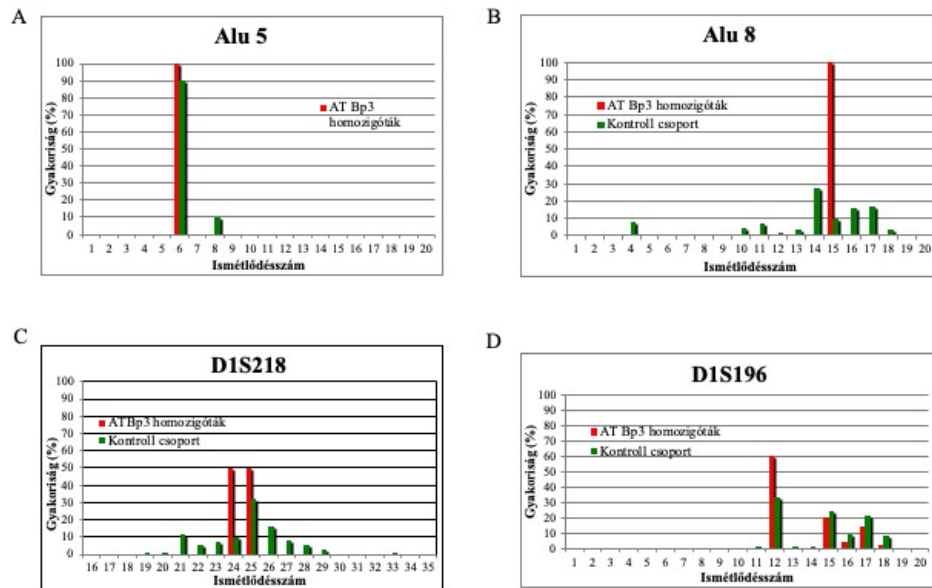
esetében a 6-os és 8-as ismétlődésszámok, míg az Alu 8 esetében 1-től 19-ig különböző ismétlődésszámok fordultak elő. A *SERPINC1* génhez közelebbi, attól disztálisan elhelyezkedő D1S218 marker (AC)₂₄ és (AC)₂₅ formában fordult elő az ATBp3 homozigótákban, míg a kontroll csoportban heterogén volt az ismétlődésszámok megjelenése, (AC)₁₉-től (AC)₃₃-ig (**32. ábra**). A *SERPINC1* géntől távolabb, attól proximálisan elhelyezkedő D1S196 marker változatos ismétlődésszámokat mutatott mind az ATBp3 homozigóta, mind a kontroll személyekben (**32. ábra**). A negatív kontrollként alkalmazott *F13A1* gén STR ismétlődésszámai hasonló eloszlást mutatnak mind a beteg, mind a kontroll csoportban (**33. ábra**).

XX. Táblázat. A haplotípus analízis eredménye az ATBp3 mutáció hordozókban és a kontroll csoportban.

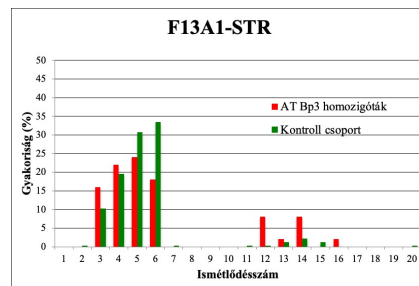
ATBp3 mutáció hordozók (n=102)										Kontroll csoport (n=200)					
	rs5877	rs5878	5' LP	rs2227612	rs941989	rs2227596	rs1799876	rs677	Gyakoriság		5' LP	rs2227612	rs941989	rs2227596	Gyakoriság
c.391 „T allél”	A	A	R	A	G	A	T	G	0.592						
c.391 „C allél”										c.391 „C allél”					
Haplotípus 1	A	A	R	A	G	A	T	G	0.183	Haplotípus 1	R	A	G	A	0.630
Haplotípus 2	G	G	H	A	A	A	C	G	0.083	Haplotípus 2	H	A	A	A	0.104
Haplotípus 3	G	G	H	C	A	G	C	C	0.058	Haplotípus 3	H	C	A	G	0.147
Haplotípus 4	G	G	H	C	A	G	T	C	0.025	Haplotípus 4	R	A	A	A	0.077
Haplotípus 5	G	G	R	A	A	A	C	G	0.025						

*R: rövid, 32 bp; H: hosszú, 108 bp

(Gindele, R., Oláh, Z., Ilonczai, P., Speker, M., Udvari, Á., Selmeczi, 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. közleményünk alapján.)



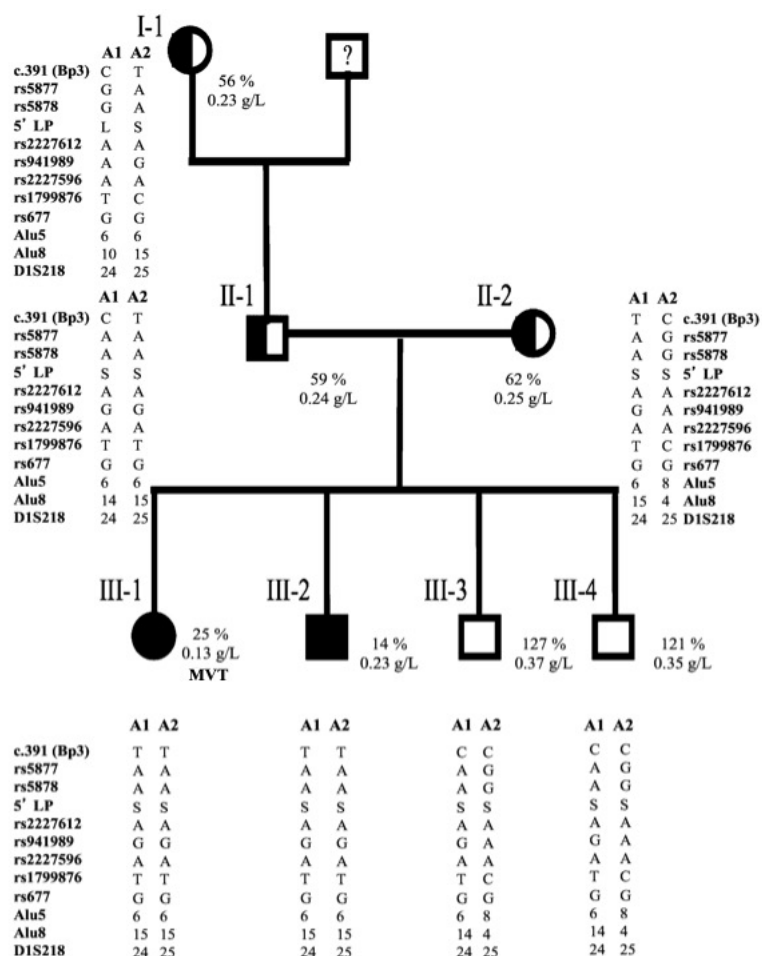
32. ábra. Az alapító hatás kapcsán vizsgált mikroszatellita markerek ismétlődésszámai az ATBp3 homoizgóta betegek és a kontroll csoport esetében.



33. ábra. A negatív kontroll *F13A1* gén STR marker ismétlődésszámai az ATBp3 homoizgótákban és a kontroll csoport tagjaiban.

(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. közleményünk alapján.)

Ahol lehetőségünk volt, informatív családfákat is generáltunk, feltüntetve a megfigyelt haplotípusokkal; erről egy példa a 34. ábrán látható.



34. ábra. Az antitrombin Budapest 3 mutációt hordozó, három generációt reprezentáló család.

Ahol alkalmunk volt rá, feltüntettük a mért hc-anti-FXa AT aktivitást és AT antigén értékeket. Az A1 és A2 minden beteg egy-egy allélját jelöli. Az üres szimbólum az ATBp3 mutációt nem hordozó, a teli szimbólum az ATBp3 mutációt homozigóta formában hordozó, a félig teli szimbólum az ATBp3 heterozigóta egyénét jelöli, A „?” az ismeretlen genotípusra utal. (Gindele, R., Oláh, Z., Ilonczai, P., Speker, M., Udvari, Á., Selmecezi, A., Pfliegler, G., Marján, E., Kovács, B., Boda, Z., Muszbek, L., Berczky, 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. közleményünk alapján.)

Korábban, Olds és mtsai. beszámoltak n=5 ATBp3 hordozó családról és ők 6 polimorf genetikai markert vizsgálva, beleértve az Alu 5 és Alu 8 STR markereket is, felvetették az alapító hatás lehetőségét [274]. A vizsgált személyek és a polimorf markerek száma azonban esetükben igen alacsony volt ahhoz, hogy egyértelmű bizonyítékot szolgáltatassanak. Számunkra megadatott annak a lehetősége, hogy kiemelkedően nagy számú mutációhordozót toborozzunk és több genetikai markert vizsgálhassunk. 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. Az alapító mutáció felderítése populációnkban több szempontból is hasznos volt. Egyrészt, az alapító mutáció következtében a hazai betegeinkre vonatkoztatható 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 kiemelendő, hogy az azonos mutáció hordozáshoz társuló hasonló klinikai fenotípus a betegek prevenció, terápiás stratégiájának megtervezését is megkönnyíti.

5.2.3.2 *Az alapító mutáció korának meghatározása*

Az alapító (gyakori) mutációk különböző populációkban történő vizsgálata során számunkra érdekes a finn populációban észlelt mutációs spektrum, az, hogy ott az AT Basel mutációról számoltak be mint gyakori mutáció, bár genetikai markerekkel annak alapító hatását nem igazolták [436]. Míg a finn populációban az AT Basel aránya a II-es típusú ATD-n belül 88%, addig a magyar népességben – saját vizsgálataink alapján – ez mindössze 4%. Ezzel szemben míg nálunk az ATBp3 aránya a II-es típuson belül 81%, addig a finn betegek között ez az eltérés egyáltalán nem fordul elő. Ezek alapján – a finnugor eredet elfogadása esetén – felvetődik, hogy az ATBp3 mutáció a két népcsoport szétválása után keletkezett vagy került be Magyarországra.

Az ATBp3 alapításának idejét $n=36$ egymással nem rokon mutációhordozó személy és családtagjaik (összesen $n=106$ személy) STR markereinek előfordulása alapján becsültük. Egy teljesen konzervált, „ösi” haplotípust találtunk 14 független kromoszómán, ez a D1S212:20, D1S2659:11, D1S218:24/25, D1S2790:20, D1S1165:13, D1S2815:18, D1S196:12, D1S460:7. (A kettőspont után álló szám az adott marker jellemző ismétlődésszámát mutatja.) A további vizsgált kromoszómákon ezekkel összefüggő haplotípusokat találtunk. Az általános populáció ($n=200$ fő) vizsgálatakor a következő ismétlődésszámok voltak a leggyakoribbak: D1S212:20, D1S2659:15, D1S218:25, D1S2790:21, D1S1165:11, D1S2815:18, D1S196:12, D1S460:7. A kétféle parametrikus statisztikai módszer a nyolc marker LD értékei alapján $11,5 \pm 5,47$ g, illetve $11,8 \pm 7,1$ g értéket adott. A nem parametrikus módszerekkel (DMLE+ és ESTIAGE) 13 g (95%CI 3-42 g) és 14 g (95%CI 5-37 g) értékeket kaptunk. Egy generációnak (g) 25 évet számítva és a mutációhordozók átlagos születési évét

zsbereczky_271_24

1990-nek tekintve azt kaptuk, hogy az ATBp3 megjelenése kb. a XVII. század közepére tehető (XXI. Táblázat).

XXI. Táblázat. Az antitrombin Budapest 3 mutáció alapító idejének meghatározása.

Marker	Távolság	Allél	LD	MRCA kor		Alapítás ideje		
	ΔcM	bp	δ	g	y	évszám	átlag $\pm$ SD	95%CI
D1S196	7,35	271	0,47	9,88	247	1743	1629 $\pm$ 163	NA
D1S1165	2,43	404	0,741	12,18	304	1686		
D1S2815	2,53	355	0,731	12,22	305	1685		
D1S2790	1	249	0,899	10,57	264	1726		
D1S218	0,73	356/358	0,945	7,74	193	1796		
D1S2659	3,27	202	0,628	13,99	350	1640		
D1S212	4,92	96	0,326	22,19	555	1435		
D1S460	5,48	164	0,223	26,62	665	1325		
Minden haplotípus		DMLE+		13	325	1665	NA	940–1915
Minden haplotípus		ESTIAGE		14	350	1640	NA	1065–1865

NA, nem értelmezhető, LD, linkage disequilibrium az ATBp3 mutáció helye és az adott marker között, MRCA, legközelebbi közös ős, g, generáció, y, év, DMLE+, a Markov chain Monte Carlo algoritmust alkalmazó szoftver; ESTIAGE, likelihood-based módszert alkalmazó szoftver, távolság (cM, centiMorgan) a genetikai távolság az adott marker és a SERPINC1 lókuszt között az 1-es kromoszómán. Az évszám az alapítás dátumát jelzi, ha egy generációt 25 évnél vesszük figyelembe és a vizsgált egyének átlagos születési idejét 1990-nek vesszük. (Bereczky, Z., Gindele, R., Fiatal, S., Speker, M., Miklós, T., Balogh, L., Mezei, Z., Szabó, Z., Ádány, 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. közleményünk alapján.)

Ez a történelmi időszak igen változatos volt a magyarság számára, háborúk és járványok által megtizedelt lakossággal és élénk betelepülési rátával. A cigányság történelmét figyelembe véve, ebben az időszakban számos roma törzs telepedett le hazánkban. Ez felvetette a mutáció roma eredetét, így megvizsgáltuk az ATBp3 előfordulását n=1185 nem rokon, az északkelet-magyarországi általános roma populációt reprezentáló személyek mintáin. A mutáció hordozó frekvencia 2,8%-nak bizonyult e csoportban, ami figyelemre méltóan magas, különös tekintettel arra, hogy az n=1000 főt számláló, magyar általános populációt reprezentáló személyekben a

mutáció egyáltalán nem fordult elő. Ezt a megfigyelést megerősítendő egy második, az előzőtől független mintavételből származó $n=402$ roma, illetve $n=450$ magyar személy esetében is megvizsgáltuk a mutáció előfordulását és megállapítottuk, hogy a roma csoportban 2,74%, a magyar csoportban 0% volt az ATBp3 hordozó frekvencia. Az ATBp3 mutáció alapító hatását a roma populációban ($n=44$ hordozó és $n=50$ nem hordozó személy bevonásával) is megerősítettük az előző fejezetben ismertetett STR markerek vizsgálatával. A leggyakoribb STR marker ismétlődésszámok megegyeztek a korábban találtakkal, kivéve a D1S1165 (ahol leggyakoribb ismétlődésszám 13) és D1S212 (ahol leggyakoribb ismétlődésszám 12 és 20) esetében. (A roma minták ATBp3 karrierjeinek leggyakoribb STR ismétlődésszámai: D1S196:12, D1S2815:18, D1S1165:12, D1S2790:20, D1S218:25, D1S2659:11, D1S212:20, és D1S460:6 és 7., a roma általános populációt reprezentáló személyeké pedig D1S196:12, D1S2815:18, D1S1165:12, D1S2790:22, D1S218:25, D1S2659:15, D1S212:16, és D1S460:10.)

Az ATBp3 mutáció korát és eredetét tekintve megállapítottuk, hogy az kb. 350-400 évvel ezelőtt keletkezhetett, vagy került be Magyarországra. A különböző statisztikai módszerek jó egyezést mutattak e tekintetben, megjegyezve azért azt, hogy a becslések konfidencia intervallumai meglehetősen szélesek voltak. Ez magyarázható az alacsony mintaszámmal, ami egy ilyen ritka betegség esetében sajnos nem is növelhető jelentősen. A viharos történelmi időszak, egyes régiók elnéptelenedése, illetve különböző népcsoportok, főleg romák betelepülése, majd a jelentős népességnövekedés magyarázhatja az ATBp3 gyors elterjedését és fennmaradását a populációban. A mutáció alapításának idején zajló történelmi események, az ATBp3 általános roma populációban való előfordulása és itt az alapító hatás igazolása megerősítette a korábban csak szórványos közlésekből és a klinikai megfigyelésekből származó adatokat a mutáció roma eredetére vonatkozóan. Mivel az ATBp3 heterozigóta állapot kevésbé súlyos thromboticus következményekkel jár, az érintettek általában kedvező egészségi állapotban érik el a fertilis kort, a mutáns allélt tovább örökíthetik utódaikra. A roma közösségekben, főként a kis szegregált településeken történő házasságok növelik a súlyos, ATBp3 homozigóta állapot megjelenését. A kb. 3%-os ATBp3 hordozó frekvenciával számolva Magyarországon kb. 24 ezer roma ATBp3 hordozó személy él. Feltételezzük, hogy a roma populáció cardiovascularis betegségek iránti vulnerabilitásának hátterében e mutációnak is jelentősége van. Ismert, hogy a FV Leiden mutáció gyakori a romáknál, ezért a kombinált öröklött thrombophilia (ATD és FV Leiden) potenciálisan előfordulhat e populációban. (A

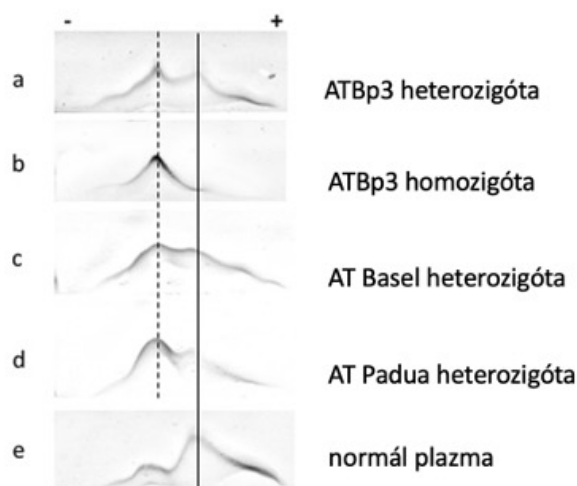
jelenlegi kutatásaink részben e témára irányulnak és nem elhanyagolható számú ATBp3 és FV Leiden kombinált thrombophiliás beteget identifikáltunk már.) Eredményeink alapján javaslatot tettünk az ATD IIHBS ATBp3 mutáció vizsgálatára, a cardiovascularis kockázat felmérése során, a roma betegek körében, az egyéni thrombosis rizikó megítélése érdekében.

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.

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

A különböző IIHBS ATD típussal rendelkező betegek plazma mintáin elvégzett keresztezett immunoelektroforézis során az alacsony heparin affinitású frakció jól elkülönült (**35. ábra**).



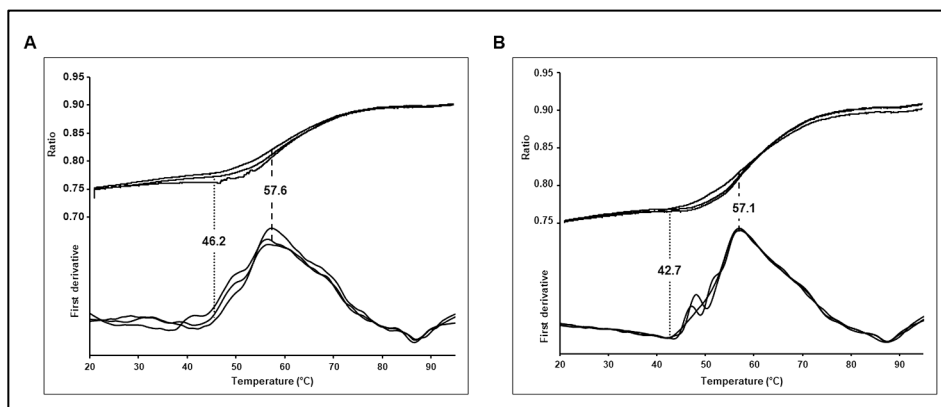
35. ábra. Normál plazma és különböző IIHBS ATD plazmák keresztezett immunoelektroforézise.

AT Budapest 3 heterozigóta (a), AT Budapest 3 homozigóta (b), AT Basel (c), AT Padua (d), normál plazma (e). Az első dimenzió, heparinnal, balról jobbra fut. Az alacsony heparin affinitású frakciót szaggatott vonal, a magas heparin affinitású frakciót folytonos vonal jelzi. (Gindele, R., Péntes-Daku, K., Balogh, G., Kállai, J., Kissné Bogáti, R., Bécsi, B., Erdődi, 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. közleményünk alapján.)

Normál, gyűjtött plazmában szépen elkülönült egy markáns, magas heparin affinitású frakció és egy jóval kisebb, alacsony heparin affinitású AT. Az ATBp3 homozigóta beteg plazmájában csak alacsony heparin affinitású AT-t detektáltunk, míg az ATBp3 heterozigóta plazmában szinte ekvivalens mértékben jelent meg az alacsony és a magas heparin affinitású frakció. Ugyanezt láttuk az AT Basel esetében is, míg az AT Padua esetében az alacsony heparin affinitású frakció erőteljesebb volt. Ez utóbbi megfigyelés összhangban van Girolami és mtsai. korábban közölt eredményeivel [437].

A nano DSF kísérletekben az ATBp3 homozigóta beteg plazmáját hasonlítottuk össze normál humán plazmával, azaz vad típusnak megfelelő AT-nal. A hőmérséklet emelkedésével a triptofán fluoreszcencia 350nm/330nm arányának változását detektáltuk, ebből következtettünk a kétféle AT termotabilitására. Az olvadásgörbéken két paramétert, a „ T_{onset} ”-et és a „ T_m ”-et adtuk meg. Előbbi az a hőmérséklet, ahol a denaturáció kezdődik, utóbbi az olvadáspont. A vad típusú AT esetében a „ T_{onset} ” és a „ T_m ” $46,2 \pm 1,3^\circ\text{C}$ és $57,6 \pm 0,1^\circ\text{C}$, míg az ATBp3 homozigóta

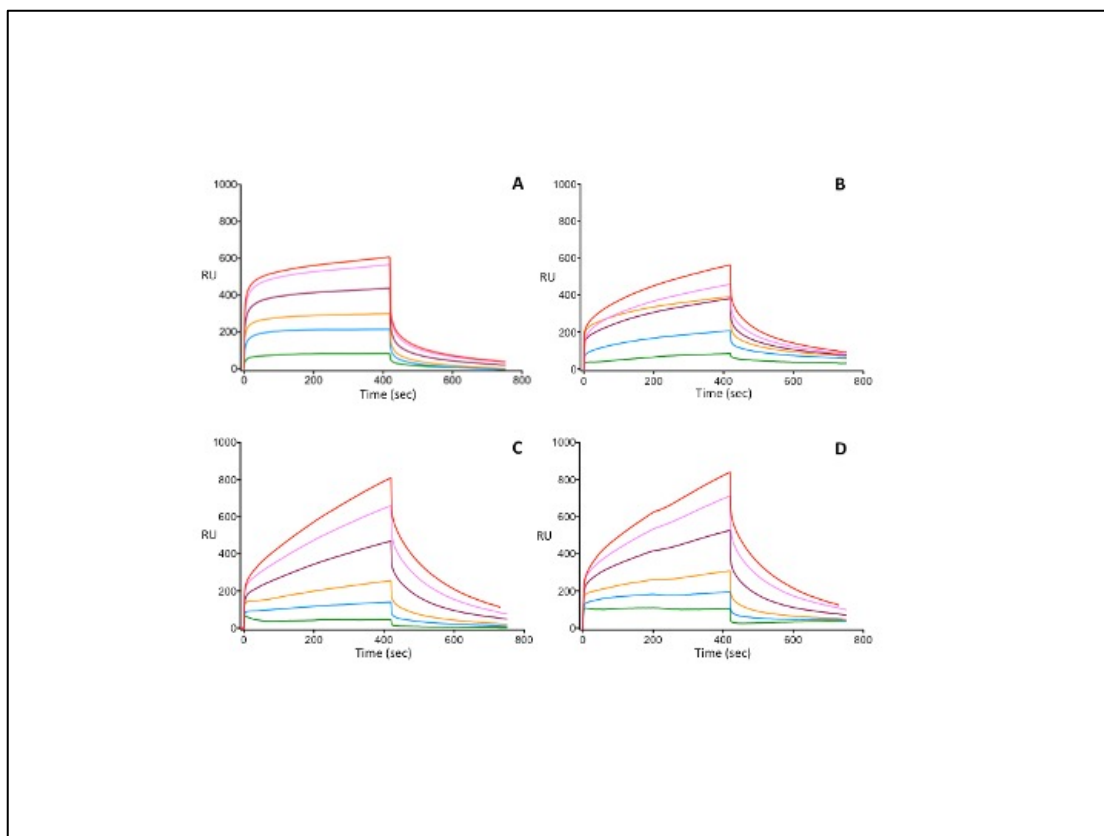
esetében a „ T_{onset} ” és a „ T_m ” $42,7 \pm 1,47^\circ\text{C}$ és $57,1 \pm 0,03^\circ\text{C}$ volt ($n=3$ független kísérletből származó adatok, $p=0,0031$, illetve $p=0,0371$). Ezek az eredmények az ATBp3 csökkent termostabilitására utalnak (**36. ábra**).



36. ábra. A vad típusú (A) és az ATBp3 homozigóta mutáns (B) antitrombin olvadási görbéje.

A termostabilitás paramétereit Prometheus 48, nano DSF módszerrel vizsgáltuk, $8 \mu\text{M}$ koncentráció mellett, triplikátumban és három független kísérletben (összesen $n=9$ mérés). Az ábrán az egyik kísérlet eredménye látható, ahol a „ T_{onset} ”-et pontozott vonal, a „ T_m ”-et szaggatott vonal jelzi. (Gindele, R., Péntes-Daku, K., Balogh, G., Kállai, J., Kissné Bogáti, R., Bécsi, B., Erdődi, 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. közleményünk alapján.)

Mivel az AT Basel és AT Padua homozigóta formában nem fordul elő, így e betegek plazmáiból származó AT normál variánst is tartalmaz, a heparin affinitás vizsgálatát rekombináns fehérjéken, tisztított rendszerben kellett elvégeznünk. A felszíni plazmon rezonancia (SPR) kísérletekben, ahogyan azt vártuk, a legerősebb heparin kapcsolódást a vad típusú AT mutatta (**37. ábra**). A $K_D=6,4 \times 10^{-10}\text{M}$, és a $K_A=2,2 \times 10^9 \text{ l/M}$ volt. Az asszociációs ráta konstans (k_a) a legmagasabb volt minden vizsgált AT közül ($k_a=1,37 \times 10^7 \text{ l/Ms}$), ami arra utal, hogy a vad típusú AT esetében történik meg leggyorsabban az AT-heparin komplex kialakulása. A disszociációs ráta konstans értéke $k_d=6,75 \times 10^{-3} \text{ 1/s}$ volt. Ez nagyságrendben nem különbözött a mutáns AT-októl.



37. ábra. Az antitrombin-heparin interakció jellemzése felszíni plazmon rezonancia módszerrel; szenzorgramok.

A kísérleteket rekombináns, HEK293 sejtekben expresszált vad típusú és mutáns, affinitás kromatográfiával tisztított antitrombinokon (AT) végeztük el. Az AT-t hat különböző koncentrációban (az ábrán alulról felfelé 1,3,5,7,9 és 11 nM) injektáltuk a chip-re, ahol a négy cellában a négy különböző AT variáns (vad típus, A; AT Budapest 3, B; AT Basel, C; AT Padua, D) foglalt helyet. RU, „response unit”. (Gindele, R., Péntes-Daku, K., Balogh, G., Kállai, J., Kissné Bogáti, R., Bécsi, B., Erdődi, 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. közleményünk alapján.)

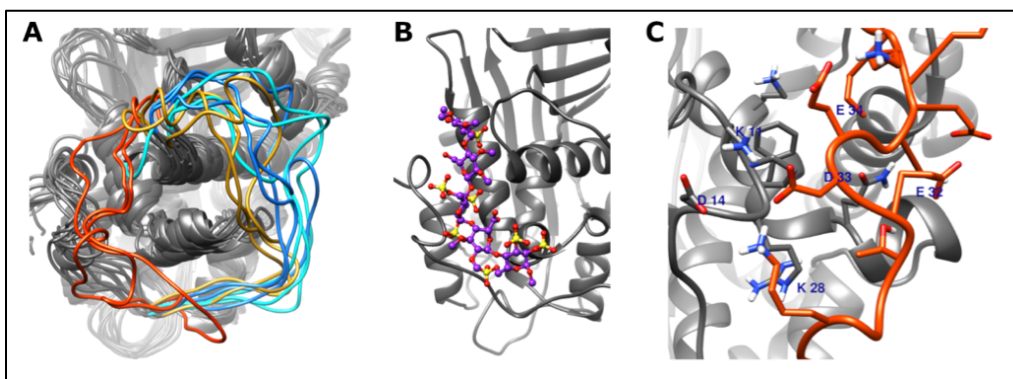
A vad típusú AT-hoz viszonyítva az ATBp3 fehérje heparinnal való interakciója az adatok alapján gyengébb volt, de a mutáns AT fehérjék közül az ATBp3 képezte a legstabilabb komplexet heparinnal ($K_D=2,15 \times 10^{-8} \text{ M}$, és $K_A=1,62 \times 10^8 \text{ 1/M}$), az AT-heparin komplex kialakulása a leggyorsabb volt ($k_a=3,25 \times 10^5 \text{ 1/Ms}$). A $k_d=2,47 \times 10^{-3} \text{ 1/s}$ volt. Az AT Basel esetében a következő eredmények születtek: $K_D=7,64 \times 10^{-7} \text{ M}$, és $K_A=2,40 \times 10^6 \text{ 1/M}$, $k_a=1,03 \times 10^4 \text{ 1/Ms}$ és $k_d=4,45 \times 10^{-3} \text{ 1/s}$. Ezek alapján megállapítható, hogy az AT Basel a WT és ATBp3-hoz képest lassabban alakít ki komplexet a heparinnal, és az asszociációs konstans kb. egy nagyságrenddel alacsonyabb, mint az ATBp3 esetében. Az AT Padua mutatta a leggyengébb interakciót heparinnal és a leglassabb komplex képződést ($K_D=1,08 \times 10^{-6} \text{ M}$, és $K_A=2,37 \times 10^6 \text{ 1/M}$, $k_a=1,01 \times 10^4$

1/Ms). A disszociációs ráta konstans a többi mutánssal gyakorlatilag megegyezett ($k_d=4,51 \times 10^{-3}$ 1/s).

5.2.4.2 A különböző IIHBS ATD típusok vizsgálata *in silico* módszerekkel

Arra tekintettel, hogy a molekulamodellezést és energetikai számításokat az érett AT fehérjén végeztük el, az aminosavak számozása e kísérletek eredményeinek bemutatásánál nem egyezik meg az ACMG ajánlások számozásával (ahol a lánckezdő metionin definíció szerint 1-es sorszámot kap), hanem itt az érett fehérje első aminosava kapja az 1-es sorszámot. Ennek megfelelően az egyes mutánsok a következőképpen számozódnak: ATBp3, Leu99Phe; AT Basel, Pro41Leu és AT Padua, Arg47His. Az AT egyes szerkezeti elemeit alkotó egyéb aminosavak számozása is ezen elvek szerint történt. A modellezések során, az AT-heparin interakció vizsgálatakor a heparint az öt szénatomos pentaszachariddal (a legkisebb, még antikoaguláns hatást mutató heparin molekula) modelleztük.

Az AT szerkezetén belül a 22-46. aminosavak által alkotott hurok, irodalmi adatok alapján, lényeges szerepet játszik az AT-pentaszacharid interakcióban [438]. Ez a hurok igen flexibilis, jelentős részét nem térképezték fel Rtg diffrakcióval. Így, kísérleti adatok hiányában, a módszertani fejezetben leírtak szerint a javított mintavételezésű MD szimulációt alkalmaztuk e hurokszerkezet konformációjának jellemzésére. A mutáns AT-ok közül e hurok alkotásában az AT Baselnek megfelelő Pro41 vesz részt, ezért logikusnak tűnik, hogy a mutáció e variáns esetében befolyásolja a hurok konformációját, ezáltal hatást gyakorolva az AT Basel heparinnal való kapcsolatára. AT Basel esetén a modellezés során a szimuláció ideje alatt kétféle konformációt figyeltünk meg. Az egyikben a hurok igen közel helyezkedett el a heparin kötő régióhoz, sóhidakat és hidrogén kötések kialakítva azzal, a másikban pedig a két régió távolabb helyezkedett el egymástól. Ez arra utalhat, hogy az AT Basel esetében a 22-46 aminosavak által alkotott hurokszerkezet a vad típushoz viszonyítva nagyobb konformációs variabilitást mutat, bizonyos konformációk esetében akár interferálva a pentaszacharid kötődésével (**38. ábra**).



38. ábra. Az érett antitrombin 22-46. aminosavak által alkotott hurokszerkezet.

A, A vad típusú és az AT Basel 22-46 hurok két-két szimulációjának reprezentatív, szuperponált szerkezete pentaszacharid nélkül, három konformációt véve minden egyes trajektóriából, ahol a sárga és narancs szín az AT Baselt, a kétféle kék pedig a vad típusú szerkezetet ábrázolja.

B, Az idraparinux (pentaszacharid) antitrombinhoz történő kötődési pozíciójának modellje. A szerkezetet az 1NQ9 Rtg diffrakciós szerkezet módosításával és energia minimalizációval kaptuk (ld. módszertani fejezetben).

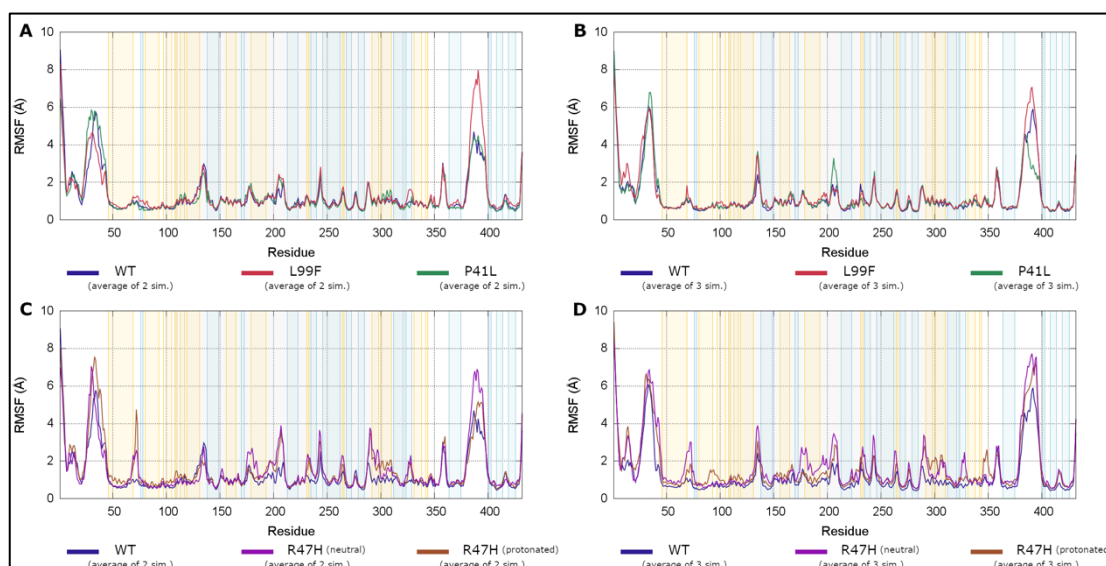
C, Az antitrombin-heparin kötés szempontjából fontos, a 22-46 hurkot alkotó és a pentaszacharid kötésért felelős régió aminosavainak helyzete AT Basel esetében. A reprezentatív frame-eket K-means clustering módszerrel, a CPPTRAJ szoftverrel választottuk [409]. (Gindele, R., Péntes-Daku, K., Balogh, G., Kállai, J., Kissné Bogáti, R., Bécsi, B., Erdődi, 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. közleményünk alapján.)

Meg kell említeni azt is, hogy előzőekkel (vagyis a heparin nélkül történő modellezésekkel) szemben, a pentaszacharid-kötött AT szimulációk során nem figyeltünk meg szoros kapcsolatot a hurok és a heparin kötő régió között. Ez azt sugallja, hogy a mutáció következtében megváltozott konformációnak csekély destabilizáló hatása lehet a pentaszacharid kötésre, a már kialakult komplex esetében. A pentaszacharid erős töltése és a megváltozott elektrosztatikus viszonyok megelőzik a hurok alternatív konformációba történő átmenetét.

Az AT N-terminális részét (1-145 aminosavak, ami a teljes heparin kötő régiót magában foglalja, de az A béta-lemezt már nem) DSSP (define secondary structure of proteins) módszerrel, CPPTRAJ szoftverrel elemeztük úgy, hogy az analízist elvégeztük a nem aktivált AT (1T1F) és az AT-pentaszacharid komplex (1NQ9) esetében is. Előző modellezésünk eredményeit megerősítettük abban a tekintetben, hogy e nagyobb régiót magában foglaló szimulációban, a nem aktivált rendszerben az AT Basel esetében ugyanazokat a konformáció változásokat figyeltük meg a hurokszerkezetet érintő régióban, mint fent. A heparin kötő régióban (beleértve a P

hélix elemeit, azaz a 112-120 aminosavak által alkotott régiót) nem figyeltünk meg konformációváltozást. Az AT-pentaszacharid komplex szimulációi során az AT Padua esetében konformációváltozásokat figyeltünk meg a 30-35 régióban. A heparin kötő régióban, az 1T1F-alapú (nem aktivált AT) szimulációkhoz hasonlóan, itt sem volt konformációváltozás. Az ATBp3 a D-hélix kis mértékű megnyúlását mutatta a vad típushoz képest.

Az RMSF (root mean square fluctuations) analízis jól bevált módszer az aminosavak flexibilitásának jellemzésére egy adott fehérjén belül. Misszensz mutációk, vagy konformációváltozások megváltoztathatják egyes fehérjerészeknél a fluktuációkat. A nem aktivált AT-t tartalmazó szimulációk során az ATBp3 a vad típushoz és az AT Baselhez viszonyítva mérsékelten megnövekedett fluktuációkat mutatott (39. ábra).



39. ábra. Az RMSF (root mean square fluctuations) ábrázolása a vad típusú és a mutáns antitrombinok esetében.

Két (1T1F, nem aktivált), illetve három (1NQ9, AT-pentaszacharid komplex) független szimuláció átlagait mutatják az ábrák. Az A és C ábra a nem aktivált AT szimulációkat mutatja, a B és D ábra pedig az AT-pentaszacharid komplexet tartalmazó szimulációkat mutatja. A görbék háttére a fehérje másodlagos szerkezete alapján van színezve, ahol a narancs az alfa-hélixet, a kék a béta-redőt szimbolizálja. (Gindele, R., Péntes-Daku, K., Balogh, G., Kállai, J., Kissné Bogáti, R., Bécsi, B., Erdődi, 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. közleményünk alapján.)

Megnövekedett fluktuációkat mutattunk ki az ATBp3 fehérje mutáció (99F) által érintett részében (50-100. aminosavak) és távolabbi régiókban is (320-330, 360-

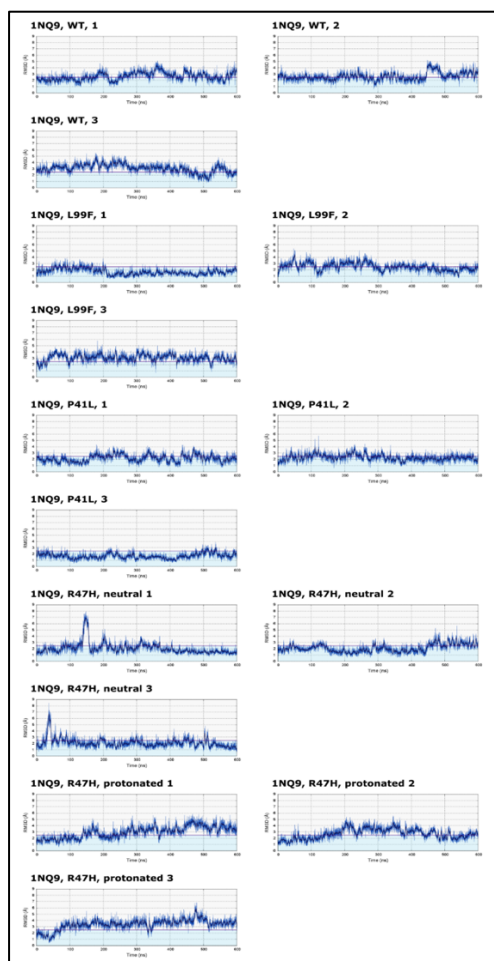
380 és 420-430 aminosavak). Más régiókban elhanyagolható volt a fluktuáció növekedés. Ezek az eredmények megfelelnek egy olyan variánsnak, amelynél a natív konformáció stabilitása csak mérsékelten csökkent, ezért érdemi szekréciózavar nem következik be. Ez összhangban van az ATBp3 esetében észlelt laboratóriumi eredményekkel, vagyis azzal, hogy a mutáns AT plazmában mért koncentrációja csak igen mérsékelten csökkent.

Az AT Basel esetében fluktuáció növekedést érdemben a 110-130 és 300-320 aminosavak által határolt régiókban figyeltünk meg. Legérdekesebb az AT Padua esete, ahol jelentős fluktuáció növekedéseket detektáltunk a 47. reziduum mindkét féle protonáltsági állapota esetén. A fluktuációk különösen nagyok voltak az F-hélix (180-210 aminosavak) és a 290-310 aminosavak területén. Ez azt jelzi, hogy az Padua variáns befolyásolja az AT konformációját és a mutáció helyétől távolabbi régiókra is hatása van. A heparin-aktivált állapot esetében az RMSF értékek egyrészt – a nem aktivált állapothoz hasonlóan – tükrözik a fehérje tercier szerkezetében a mutációk hatására bekövetkező stabilitás változásokat, de itt az allosztérikus aktivációban részt vevő régiók is okozhatnak RMSF változásokat. E régiók a D-hélix C-terminális része (125-135 aminosavak), a reaktív centrum hurok (RCL) és a FXa-val és FIXa-val reagáló exosite. Az ATBp3 variáns – a nem aktivált modellhez hasonlóan – itt is megnövekedett fluktuációkat mutatott a vad típushoz viszonyítva. Míg a vad típusú AT esetében a D-hélix C-terminális részénél RMSF csökkenést észleltünk a pentaszacharid-kötött formában a nem aktivált formához képest (**39. ábra A, B**), az ATBp3 és az AT Basel esetében az RMSF értékek a pentaszacharid-kötött formákban is magasak maradtak (**39. ábra A, B**). AT Padua esetében, ahol a nem aktivált formánál is magas RMSF értékeket tapasztaltunk, ezek a pentaszacharid kötött formában is magasak maradtak (**39. ábra C, D**).

Az AT heparin által történő aktivációja egy allosztérikus folyamat, melynek elemeit jelen munkát megelőzően, korábban feltártuk. E folyamatban a heparin kötő régió, a reaktív centrum hurok (RCL) és a gátlási folyamatban részt vevő alvadási faktort kötő exosite vesz részt. E folyamatot olyan molekuladinamikai szimulációval vizsgáltuk, ami képes egymással összefüggő molekuláris elmozdulások tanulmányozására. Ebben az elemzésben az AT Basel a vad típusú AT-hoz hasonló mintázatokat mutatott, azt jelezve, hogy e variánsnak csekély hatása van az allosztérikus aktivációra. Az ATBp3 és az AT Padua esetében viszont a vad típustól

különböző mintázatokat észleltünk, így e variánsokról feltételezhető, hogy hatással vannak az allosztérikus folyamatokra.

Végül, megvizsgáltuk a pentaszacharid gyűrű és interglikozidos atomok, azaz a ligand RMSD értékeit (root mean square deviations), a különböző AT variánsok esetében. Megállapítottuk, hogy a vad típus, ATBp3, AT Basel esetében nincs a pentaszacharidra vonatkoztatott RMSD értékekben különbség. Az AT Padua esetében viszont, annak protonált változata esetén, megnövekedett pentaszacharid RMSD értékeket figyeltünk meg (40. ábra).



40. ábra. A pentaszacharid gyűrű és interglikozidos atomok RMSD értékei a különböző AT-pentaszacharid rendszerek szimulációi során, az 1NQ9 Rtg diffrakciós szerkezetéhez viszonyítva.

WT, vad típus, L99F, ATBp3, P41L, AT Basel és R47H, AT Padua. Utóbbi esetében a semleges és a protonált változatot is szimuláltuk. (Gindele, R., Péntes-Daku, K., Balogh, G., Kállai, J., Kissné Bogáti, R., Bécsi, B., Erdődi, 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. közleményünk alapján.)

Teljes, vagy közel teljes ligand disszociációt egyik szimulációban sem figyeltünk meg. Azt figyelembe kell venni, hogy az elemzéseinket a β -AT izoformára végeztük el, ahol – az eggyel kevesebb N-glikozilált Asn reziduum miatt – az AT-heparin interakció alapvetően erősebb. Azért kellett mégis ezt az izoformát használnunk a modellezések során, mert jobb konformációs mintavételezést tett lehetővé, mint ami a kötőhely közelében glikozilált α -izoforma esetében lehetséges lett volna.

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, 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 szekréción zavar eredményezhetnek, vagy éppen az ATBp3 fokozott eliminációjához vezethetnek annak instabilitása miatt. Ugyan pulse-chase kísérleteket az ATBp3 esetében nem végeztek még, és mi sem végeztünk ilyen kísérleteket, de két tanulmányban, ami az ATBp3 mutációs hely közelében lévő mutációkat vizsgált, csökkent szekréción állapítottak meg [439,440].

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 felszínen 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 különböző IIHBS AT-ok közül a vad típushoz legközelebb az ATBp3 állt e tekintetben, jóllehet még itt is két nagyságrendnyi különbséget mutattunk ki. Heparin affinitás tekintetében az AT Basel a kettő, azaz 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 sem figyeltünk meg, így szabadenergia számításokat és kvantitatív analízist sem tudtunk készíteni. Ehhez még haladóbb módszerre van szükség, mint például a közelmúltban publikált LiGaMD [441]. 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.

Vizsgálatunk jelentőségét alátámasztja, hogy korábban sem olyan biokémiai, sem olyan in silico vizsgálatok nem történtek, ahol a háromféle AT IIHBS variánst egy kísérletben, azonos módszertannal hasonlították volna össze. Komplex vizsgálataink eredményei magyarázatot szolgáltattak az ATBp3, AT Basel és AT Padua eltérő viselkedésére a laboratóriumi diagnosztikai tesztekben és indirekt módon a klinikai tünettant illetően megfigyelt különbségekre is.

5.2.5 Az új Antitrombin mutációk klinikai, laboratóriumi és biokémiai karakterizálása

Az ATD-val való évtizedes munkánk során ugyan zömmel IIHBS típussal találkoztunk, de ritkán előfordultak olyan betegek is, akik korábban még nem karakterizált, új AT variánssal rendelkeztek. Egyik ilyen betegünk esete kapcsán térképeztünk fel egy nagy, több generációs ATD családot és jellemeztük a deficienciát klinikai, laboratóriumi és biokémiai szempontokból.

5.2.5.1 Az AT Debrecen klinikai és laboratóriumi jellemzői

Egy négy generációs család összesen n=31 tagját vontuk be a tanulmányba. Közülük n=20 személy ATD-nek bizonyult. A betegek klinikuma és a rutin laboratóriumi diagnosztika során született eredmények a **XXII. Táblázatban** láthatóak.

XXII. Táblázat. Az Antitrombin Debrecen betegek klinikai és laboratóriumi jellemzői

ID (nem)	Első thrombosis típusa	Életkor az első thrombosis idején (év)	Szekunder profilaxis	Rekurrens thrombosis	AT aktivitás (%)	AT antigén (g/L)
I/1 (F)	MVT	34	-	Multiplex TE	NA	NA
II/1 (N)	MVT	65	VKA	MVT	63	NA
II/4 (N)	PE	15	-	-	NA	NA
II/5 (F)	PE	34	VKA	MVT+PE, AMI	38	NA
II/8 (N)	MVT	35	VKA	MVT, SVT	58	0,20
II/9 (N)	MVT+PE	42	VKA	MVT	65	0,22
II/11 (F)	MVT	40	VKA	MVT	55	0,18
II/13 (F)	Sinus thrombosis	36	-	-	NA	NA
III/4 (F)	MVT	34	VKA	-	59	0,19
III/11 (F)	MVT	32	VKA	-	63	NA
IV/1 (F)	nincs	-	-	-	61	0,16
IV/4 (F)	nincs	-	-	-	56	0,15

MVT, mély vénás thrombosis; VTE, vénás thromboembolia; PE, tüdőembolia; SVT, superficialis vénás thrombosis; AMI, acut myocardialis infarctus; VKA, K-vitamin antagonistá; F, férfi; N, nő; NA, nem

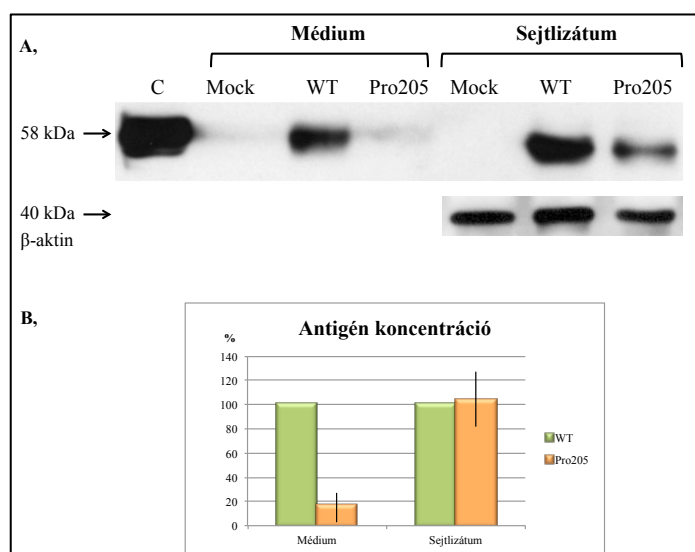
elérhető. Az AT aktivitás referencia tartomány 80-120%, AT antigén referncia tartománya 0,19-0,31 g/L. A II/4 és II/13 beteg thrombosis következtében elhunyt, a többiek túléltek. (Selmeczi, A., Gindele, R., Ilonczai, P., Fekete, A., Komáromi, I., Schlammadinger, Á., Molnárné Rázsó, K., Kovács, K., Bárdos, 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. közleményünk alapján.)

A proband (II/8) a vizsgálatunk idején 75 éves nőbeteg, anamnesisében többszörös thrombosisokkal, majd postthromboticus szindrómával. 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. A proband édesapja (I/1) tüdőembóliában hunyt el 62 éves korában, az ATD diagnózisát nála soha nem erősítették meg (vizsgálati lehetőségek hiányában), antikoagulálva nem volt. A proband hét testvére közül hatan szintén szenvedtek thrombosis, közülük két testvér thrombosisa fatális kimenetelű volt. A II/5 személy mind vénás, mind artériás thrombosis szenvedett, ő myocardialis infarctusban halt meg 51 éves korában. A legfiatalabb generáció két tagja a vizsgálatunk idején még tünetmentes volt, de ők még igen fiatalok (18 és 21 évesek). A családban az első thrombosis idején az életkor mediánja 36,7 év volt (tartomány 15-65 év), minden esetben nem provokált eseményről volt szó. Egyéb thrombophilia egyik családtagnál sem igazolódott. A laboratóriumi eredmények I-es típusú ATD-t valószínűsítettek, bár a betegeknél az AT antigén koncentráció csupán határérték csökkent volt, ami több betegnél nem állt arányban az AT aktivitás csökkenésének mértékével. A genetikai vizsgálat c.614T>C (p.Leu205Pro) mutációt igazolt, az érintett személyeknél heterozigóta formában.

5.2.5.2 Az AT Debrecen biokémiai karakterizálása és in silico jellemzése

A HEK293 sejtekben expresszált vad típusú és mutáns (Pro205) AT fehérje koncentrációját ELISA módszerrel, aktivitását a fentiekben már ismertetett hc-anti-FXa módszerrel vizsgáltuk 4 független mérésben. A fehérjét Western blot technikával vizualizáltuk. A vad típusú AT egy markáns sávként, míg a Pro205 AT fehérje egy halvány sávként jelent meg 58 kDa magasságnál a sejtek felülúszójából. A sejtlizátumban mind a vad típusú, mind a mutáns AT jól látható volt. Az AT antigén koncentrációt 48 órával a transzfekciót követően mértük. A β -galaktozidáz aktivitásra korrigáltuk a transzfekciós hatékonyságot. Az AT koncentráció a vad típusú plazmiddal transzfektált sejtek felülúszójában $2,33 \pm 0,76 \mu\text{g/mL}$, míg a Pro205 mutánsal

transzfektált sejtekében csak $0,56 \pm 0,43 \mu\text{g/mL}$ volt. A WB-nak megfelelően a sejtlizátumban 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 (**41. ábra**). Az amidolitikus tesztet elvégezve 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) 3 független kísérlethől 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.



41. ábra. A vad típusú (WT) és a Pro205 mutáns AT fehérjék expressziójának detektálása Western blot (A) és ELISA (B) módszerekkel

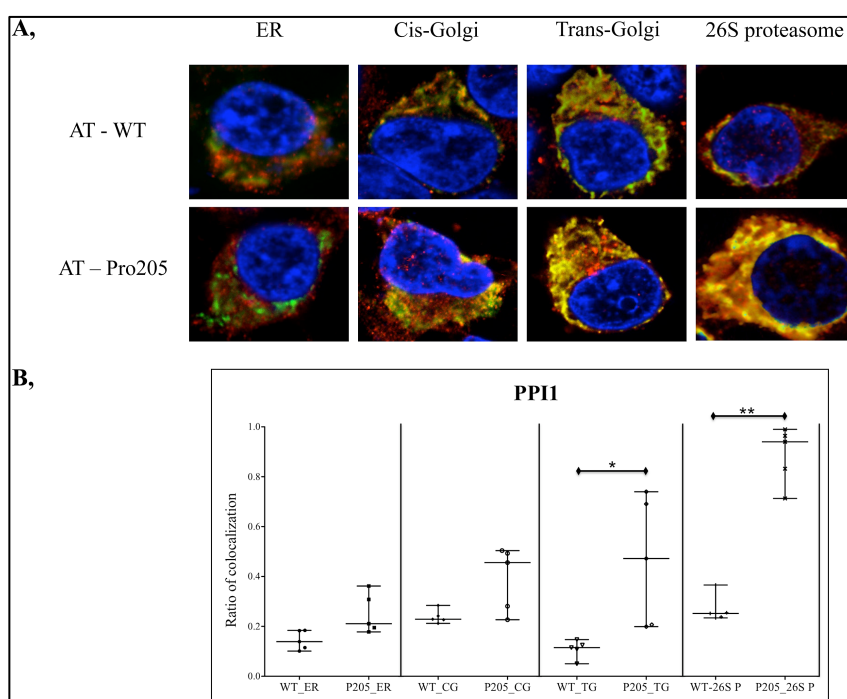
A. Az SDS-PAGE analízis nem-redukáló körülmények között zajlott. A pozitív kontrol (C) 5 egészséges egyéntől származó, 40-szeresen hígított plazma volt. Negatív kontrolként a „mock” transzfektált sejteket használtuk. A béta-aktint alkalmaztuk, mint belső kontroll.

B. Az AT antigén szinteket 4 független kísérletben, ELISA módszer segítségével határoztuk meg a transzfektált HEK293 sejtek médiumából és sejtlizátumából. Az eredményeket normalizáltuk a transzfekciós hatékonyságra és az expresszió mértéke a WT átlag koncentrációjának százalékában lett megadva. A szórások fel vannak tüntetve az oszlopdiagramon. (Selmeczi, 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. közleményünk alapján.)

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 felülúszójába 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 (**42. ábra**) 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 proteasómát jelölő markerekkel jelentősebb együttállást detektáltunk. A Pearson korrelációs koefficiens értéke transz-Golgi esetében 0,48, a 26S proteasóma esetén 0,71 volt, utóbbi erős kolokalizációt jelent.



42. ábra. A vad típusú (WT) és a Pro205 antitrombin (AT) kettős immunfluoreszcens festése.

A, A WT és Pro205 AT konfokális mikroszkópos felvételei. A sárga szín az egymásra vetített (merge) képeken kolokalizációt jelez az AT és az egyes sejtorganelumoknak megfelelő markerek között. Az AT-t zölddel, a sejtorganelumokat pirossal látjuk, a sejtmag kék. B, A kolokalizáció kvantitatív elemzése Protein Proximity Analyzer (PPA) szoftverrel. A PPI1 érték (0-1 közötti értéket vehet fel), ami a vertikális tengelyen látható, az AT azon hányadát jelenti, ami kolokalizál az adott sejtorganelum markerével. Az ábrán a PPI1 medián és minimum-maximum értékek láthatóak. Rövidítések: ER, endoplazmás retikulum; CG, cisz-Golgi; TG, transz-Golgi; 26S_P, 26S proteasóma. * $p=0,0161$, ** $p<0,0001$. (Selmeczi, 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. közleményünk alapján.)

A p.Leu205Pro mutáció hatását *in silico* is jellemeztük a korábban már említésre kerülő módszertannal. Röviden, a 4 μ 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. Mindezek a mutáns AT szerkezeti torzulását valószínűsítik.

Összefoglalva, a p.Leu205Pro ATD súlyos, alapvetően kvantitatív deficiencia, melynek hátterében szerkezeti torzulás következtében bekövetkező szekréciós zavar áll; a mutáns AT valószínűleg letér a normál szekréciós útvonatról 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. A klinikum számára ennek jelentősége a már thrombosison átesett, érintett személyek élethosszig történő antikoagulálásának megajánlásában és a még thrombosisra nem szenvedett, tünetmentes, de érintett családtagok primer thromboprofilaxisában áll, akik esetében az biztosan javasolt minden, a thrombosis szempontjából fokozott kockázatú szituációban.

5.2.5.3 *A kilenc új, korábban nem karakterizált antitrombin mutáció klinikai és laboratóriumi jellemzői*

A közelmúltban azonosított kilenc új, korábban nem karakterizált mutációt (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr és p.Pro461Thr) hordozó betegek rövid jellemzését a Betegek és módszerek fejezetben megtettük. Az egyes mutációk klinikumával kapcsolatban kiemelendő, hogy a c.41G>A (p.Arg14Lys) mutáció egy esetben thrombosisal társult, a beteg szintén mutáció hordozó apja azonban tünetmentes volt. A c.95G>A (p.Cys32Tyr) mutáció súlyos, recurrens thrombosisokkal járt, erősen pozitív családi anamnesissel (a családtagokat nem volt alkalmunk vizsgálni). A c.232C>G (p.Arg78Gly), az AT heparin kötő helyét érintő mutáció nem társult thrombosisal. A c.362T>G (p.Met121Arg) és a c.734T>C, (p.Leu245Pro) hordozása fiatal korban elszenvedett thrombosisal járt, a c.807delT (p.Leu270Argfs*14) pedig különösen súlyos, recurrens thrombosisal asszociálódott. A c.1349A>T (p.Asn450Ile) hordozása két esetben társult thrombosisal, két esetben néma volt. A c.1367-1368del,c.1367-1371ins (p.Gly456delins_Ala_Thr) eltérés

recurrens thrombosissal járt, végül, a c.1384C>A (p.Pro461Thr) a három, nem rokon betegnél thrombosissal járt. A rutin laboratóriumi vizsgálatok I-es típusú, kvantitatív deficienciát sugalltak a p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile és a p.Gly456delins_Ala-Thr esetekben, míg minőségi zavarra utaltak a p.Arg78Gly és a p.Pro461Thr esetében, bár utóbbinál egyes betegek AT antigén koncentrációja enyhe csökkenést mutatott.

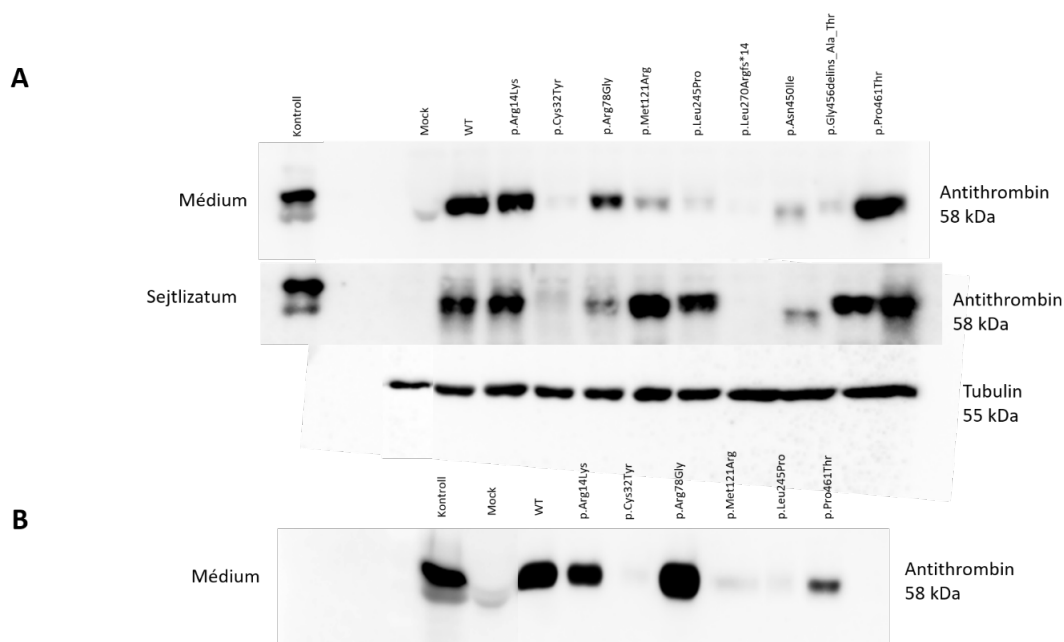
5.2.5.4 A kilenc új, korábban nem karakterizált antitrombin mutáció biokémiai vizsgálata

A kilenc új mutáció in vitro, in silico és szekvencia homológia vizsgálatával célunk volt, hogy az egyes mutációk patogenitására indirekt és direkt bizonyítékokat gyűjtsünk és ezeken keresztül az ATD alcsoportjaiba is besorolhassuk azokat, valamint hozzájáruljunk az ATD regiszter bővítéséhez.

Elvégeztük a kilenc új mutáció szekvencia homológia azonosítását hét különböző fajban az UniProt fehérjeszekvencia adatbázis segítségével. A vizsgált aminosav pozíciókban, mind a hét faj esetében, azonos aminosavakat találtunk (kivéve a 270-es pozíciót, ahol három faj esetében leucin helyett prolin van, ezek azonban hasonlóak egymáshoz, nem poláros aminosavak hidrofób oldalláncokkal). Ezek alapján elmondhatjuk, hogy minden mutáció esetében erősen konzervált pozícióról van szó, bár maga a szignál szekvencia heterogén volt a vizsgált hét fajban. A hét misszensz mutációt vizsgáltuk különböző webes felületen elérhető alkalmazás (PolyPhen2 HumDiv és HumVar modellek, MutPred2, PhD-SNP, SIFT, MutationTaster) segítségével, amelyekkel megjósoltuk az egyes mutációk fehérje szerkezetre gyakorolt következményét. A p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Asn450Ile, és p.Pro461Thr esetében minden módszer egybehangzóan patogénnek ítélte a variánsokat. A p.Arg78Gly mutációval kapcsolatban nem voltak egységesek az eredmények, egyes alkalmazások patogénnek, mások benignusnak (PolyPhen 2 programok és a PhD-SNP) jósolták. Két misszensz mutáció, a p.Arg14Lys és a p.Cys32Tyr, az AT szignál szekvenciájában helyezkedik el. A PolyPhen 2 és a SIFT programok ártalmasnak jósolták ezeket a mutációkat, míg a MutPred2 és a MutationTaster nem patogénnek ítélte őket. A PhD-SNP az első mutációt jóindulatúnak a másodikat betegséget okozónak sorolta be. Végrehajtottunk egy in silico vizsgálatot a szignál peptid hasítására a SignalP 6.0. program segítségével az ezen a szekvencián elhelyezkedő mutációk esetében. A program a szignál peptid hasító helyet a 32-es és a 33-as aminosav közé jósolta a vad típusú és a p.Arg14Lys mutáns esetében nagy megbízhatósággal (>0,999). A

p.Cys32Tyr vonatkozásában a program a hasító helyet szintén a 32-es pozíció után helyezte, de a predikció megbízhatósága nagyon alacsony volt (0,542), ami e mutáció patogén jellegét sugallta.

Biokémiai vizsgálataink során először a tranziensen transzfektált HEK-293 sejtek felülúszójából 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 sejtlizátumban 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 (43. ábra A része).



43. ábra: A vad típusú és a mutáns antitrombinok kimutatása Western blot technikával a tranziensen (A) és a stabilan (B) transzfektált HEK-293 sejtek felülúszójából és a sejtek lizátumából.

Az SDS-PAGE nem-redukáló körülmények között történt. A sejt lizátumok esetében a tubulin (55 kDa) szolgált külső kontroll fehérjeként. A Mock-transzfektált sejtek negatív kontrollként, a 40-szeres hígításban felvitt poolozott plazma pozitív kontrollként szolgált. (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. közleményünk alapján.)

A transzfektált sejtek lizátumából és a felülúszóból ELISA módszerrel mért AT antigén szintek összhangban voltak a Western blot eredményeivel. A Western blot analízis és az ELISA eredményei alapján a mutációkat három csoportba soroltuk. Az első csoportba azokat soroltuk (p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*14, és a p.Asn450Ile), melyeknél alacsony AT fehérje expressziót detektáltunk mind a felülúszóban mind a sejt-lizátumban, 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 sejt-lizátumban de alacsony AT fehérje expressziót a felülúszóban, ezzel szekréciós zavarra utalva. A harmadik csoport (p.Arg14Lys, p.Arg78Gly, p.Pro461Thr) azokat foglalja magába, ahol az AT fehérje erősen kimutatható mind a sejt-lizátumban mind a felülúszóban. Ezek a mutánsok lehetnek funkcionális variánsok vagy az AT szerkezetére és funkciójára csak csekélyebb hatással bírnak.

Hat mutáció esetében (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, és a p.Pro461Thr) stabil transzfekciót is végeztünk annak érdekében, hogy nagyobb fehérje hozamot érjünk el a további (funkcionális) vizsgálatokhoz. A stabil transzfekció minőségének ellenőrzésére Western blot technikát alkalmaztunk és detektáltuk a vad típusú és a hat mutáns AT fehérjét a sejtek felülúszójából (**43. ábra B része**). A mutánsok heparin kofaktor aktivitás (hc-anti-FXa) és progresszív aktivitás (p-anti-FXa) eredményeit a vad típus AT aktivitásához (melyet 100%-nak vettünk) viszonyítva adtuk meg. A hc-anti-FXa értékek a következők voltak: p.Arg14Lys $85,16 \pm 18,99$ %; p.Arg78Gly $61,50 \pm 8,50$ %; p.Met121Arg $106,5 \pm 26,67$ %; p.Leu245Pro $110,00 \pm 25,07$ %; és p.Pro461Thr $93,75 \pm 44,67$ %. p-antiFXa értékek pedig a következőképpen alakultak: p.Arg14Lys $99,56 \pm 30,07$ %; p.Arg78Gly $67,54 \pm 59,85$ %; p.Met121Arg $133,46 \pm 46,10$ %; p.Leu245Pro $120,14 \pm 43,47$ % és p.Pro461Thr $160,27 \pm 67,06$ %. A p.Arg14Lys, p.Met121Arg, és p.Leu245Pro mutánsok esetében az AT aktivitás nem mutatott csökkenést a heparin kofaktor és a progresszív mérésekben és a két mérés arányos eredményeket adott. A funkcionális mérések diskrepanciát mutattak, ezért megváltozott heparin kötést feltételeztünk a p.Arg78Gly és a p.Pro461Thr AT esetében. Ezért ezen két mutáció heparin kötő tulajdonságát (és kontrollként a vad típust) vizsgáltuk tovább tisztított rekombináns fehérjék felhasználásával SPR módszerrel. A kölcsönhatás kinetikus és affinitási paramétereit különböző AT koncentrációnál mért szenzorgramokból számoltuk és átlagoltuk az egyes antithrombinoknál. Ahogy vártuk, a legerősebb AT-heparin kötés a vad típus

estében volt megfigyelhető ($K_D = 8,49 \times 10^{-7}$ M). Az asszociációs állandó $k_a = 2,66 \times 10^6$ 1/Ms. Ezek az adatok azt mutatták, hogy az AT-heparin komplex a leggyorsabban a vad típusú AT esetében alakult ki. A p.Arg78Gly AT mutánsnál a következő eredményeket kaptuk: $K_D = 1,69 \times 10^{-6}$ M és az asszociációs konstans $k_a = 1,15 \times 10^3$ 1/Ms. A p.Pro461Thr AT mutáns vonatkozásában a következő eredményeket kaptuk: $K_D = 1,61 \times 10^{-6}$ M és az asszociációs konstans $k_a = 1,38 \times 10^4$ 1/Ms. Ezek az eredmények a vad típusnál gyengébb heparin affinitásra utaltak a két vizsgált mutáns esetében.

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

Szisztematikusan végzett in vitro biokémiai vizsgálataink eredményeit összegezve és az in silico predikciókkal összevetve, a kilenc új *SERPINC1* mutációt az alábbiak szerint értékeljük és csoportosítjuk:

1. A rekombináns p.Arg14Lys AT mennyisége nem volt szignifikánsan alacsonyabb, mint a WT AT fehérje (a Western blot, az AT antigén és aktivitás eredmények alapján). Ezek és a variáns pozíciója (a szignál peptid N-terminális régiójának pozitívan töltött bázikus részét érinti, amely nagyon semleges rész) nem erősítik meg kétségtelenül a mutáció patogén voltát, és azt sugallják, hogy az index beteg MVT-jének és alacsony AT szintjének hátterében egyéb okozati tényező is állhatott. Elképzelhető az AT gén transzkripció kontrolljában vagy poszttranszlációs módosításban részt vevő gének mutációi, vagy az AT eltávolításában részt vevő fehérjék génjeinek eltérései, melyeket nem vizsgáltunk, de az is lehetséges, hogy a p.Arg14Lys mutációhoz kapcsolódik egy másik mutáció a *SERPINC1* gén távoli promoter vagy introni régiójában, amit nem detektáltunk a Sanger szekvenálással, és együtt okozzák az alacsony AT szintet. Sajnos nem tudtunk kiterjesztett családvizsgálatot végrehajtani a variáns és az okozott betegség kapcsolatának további elemzésére.
2. A fehérje szintézis zavarát (transzlációs, poszt-transzlációs defektus), így I-es típusú ATD-t okozó eltérések a p.Cys32Tyr, a p.Leu270Argfs*14 és a p.Asn450Ile variánsok.
3. Szekréciós zavart okozó, így szintén I-es típusú ATD-hoz vezető eltérések a p.Met121Arg, a p.Leu245Pro és a p.Gly456delins_Ala_Thr.

4. Heparin kötés zavarával járó, enyhe II-es típusú ATD-hez vezet a p.Arg78Gly variáns.
5. Pleiotrop hatású II-es típusú ATD-vel jár a p.Pro461Thr, hiszen a beteg plazmájában a hc-anti-FXa és a p-anti-FXa AT aktivitás értékek aránytalanul alacsonyak voltak az AT antigén értékekhez képest, ezzel inkább funkcionális ATD-re utalva. A rekombináns p.Pro461Thr fehérje Western blot analízise és az AT antigén meghatározás magas AT fehérje szinteket mutatott a médiumban és a sejtlyúzátumban is. A heparin kofaktor aktivitás aránytalanul csökkent volt a progresszív aktivitáshoz képest. Az SPR mérések alátámasztották a módosult heparin – AT kölcsönhatást.

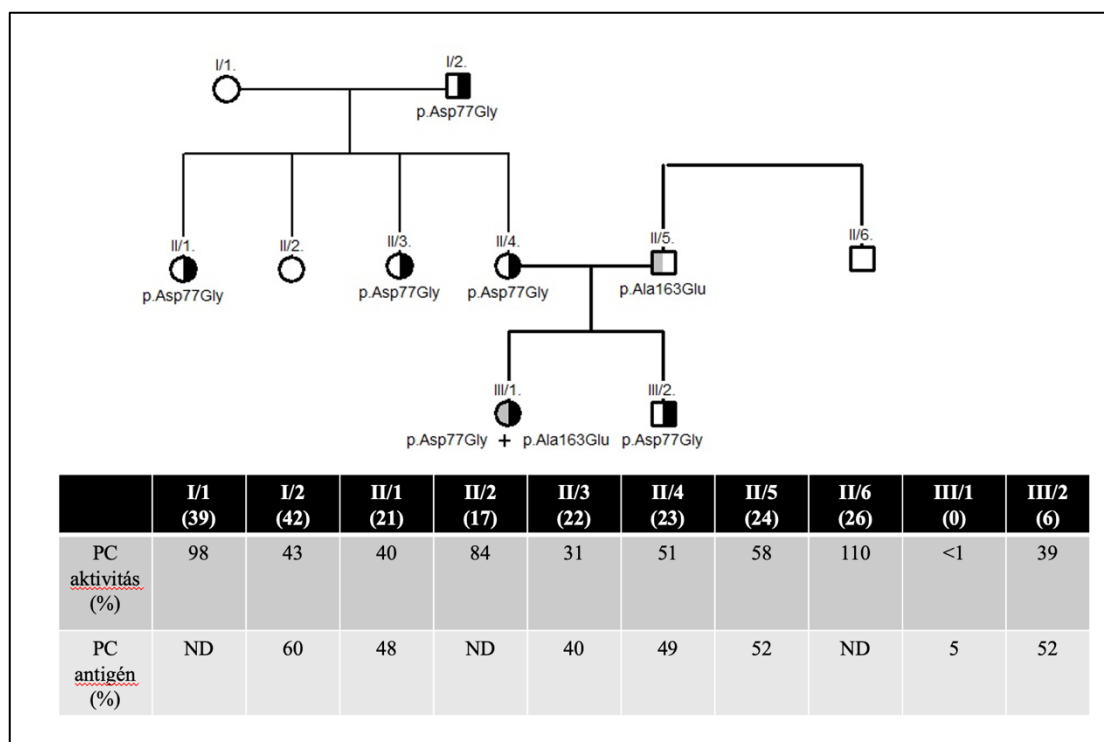
Az ATD-val kapcsolatos, szerteágazó vizsgálataink rövid összefoglalásaként elmondhatjuk, hogy feltérképeztük a hazai ATD genetikai hátterét, melynek során megállapítottuk, hogy a magyarországi ATD betegek több mint 80%-a egy rekurrens mutációt hordoz (p. Leu131Phe, ATBp3), melynek alapító hatását polimorf genetikai markerekkel igazoltuk és felvetettük a mutáció roma eredetét. A nemzetközi irodalomban a legnagyobb számú ATBp3 beteg klinikumát elemezve felfedeztük az ATBp3 homozigóta állapot és a v. cava inferior atresia extrém gyakori asszociációját, melynek hátterében az in utero elszenvedett súlyos thrombosit véljük. Leírtuk, hogy a IIHBS típusú ATD mind klinikumát, mind laboratóriumi jellemzőit tekintve különbözik az I-es típusú kvantitatív és az egyéb II-es típusú minőségi deficienciáktól, sőt, a IIHBS típuson belül, a leggyakoribb variánsok (ATBp3, AT Basel, AT Padua) szintén különböző klinikummal és laboratóriumi viselkedéssel bírnak. E három rekurrens ATD IIHBS variáns heparinnal való kapcsolatát in vitro rekombináns rendszerekben és in silico módszerekkel vizsgálva bizonyítottuk a különböző mértékű heparin affinitást és feltártuk a háttérben álló strukturális rendellenességek természetét. Ezen túl megállapítottuk, hogy az ATBp3 mutáció nem pusztán heparin kötés rendellenességgel járó forma (enyhe heparin kötés zavar), de enyhe szekréciós zavarhoz vezető molekuláris instabilitással is jár. A IIHBS ATD-ra fókuszálva laboratóriumi tesztet fejlesztettünk, ami nemcsak a heparin jelenlétében történő hc-anti-FXa aktivitást, hanem az annak hiányában észlelhető, progresszív aktivitást (p-anti-Xa) is detektálja, és a tesztet automata koagulométerekre adaptáltuk, majd diagnosztikus algoritmust javasoltunk az ATD hatékony diagnosztikája érdekében, beleértve a genetikai tesztek helyét és szerepét is a diagnosztikai folyamatban. Bizonyítottuk, hogy

az ATD elsővonalbeli tesztjeként alkalmazott, heparin jelenlétében történő AT aktivitás meghatározásra szolgáló kereskedelmi forgalomban kapható tesztek nem ekvivalensek a teljesítőképesség szempontjából, és feltártuk, hogy mely esszé kondíciók a legkritikusabbak (FXa vs. trombin, heparin koncentráció, ionerő). Tapasztalataink és szisztematikus klinikai laboratóriumi vizsgálataink nyomán javaslatot tettünk a legmegfelelőbb reagens jellemzőire és segítettünk optimalizálni a kevésbé szenzitív reagenst. Új AT mutációk patogenitását igazoltuk biokémiai és in silico módszerekkel. Felismerve, hogy az ATD ritka betegség mivoltából fakadóan egy-egy centrum esetszáma és tapasztalata kevés ahhoz, hogy klinikai és laboratóriumi ajánlásokat fogalmazhassanak meg, kezdeményeztük és felvállaltuk egy nemzetközi ATD regiszter kialakítását és gondozását. A regiszterben, az értekezés jelen fejezetének írásakor már közel 700 beteg adatai találhatóak, így hamarosan lehetőség nyílik nagyobb volumenű statisztikai elemzésre és nemzetközi ajánlások megfogalmazására.

5.2.6 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. Érdeklődésünk fókuszterületébe a kétféle – alvadási idő meghatározáson alapuló vs. kromogén amidolitikus teszt – teljesítőképességének összehasonlítása áll, ami azért lényeges kérdés, mert az alvadási tesztet számos preanalitikai és analitikai tényező befolyásolja, elsősorban alámérést előidézve, fals pozitív teszt eredményt okozva. Ilyen tényező például az APC rezisztencia, ami a hazai népességben gyakori, ezért ez az interferencia nálunk mindennapos diagnosztikai probléma. Egyszerű lenne követni azt a gyakorlatot, amit a legtöbb nemzetközi ajánlás is támogat, hogy kromogén módszertant alkalmazzunk első vonalbeli szűrőtesztként, ezzel kiküszöbölve az APC rezisztencia által okozott problémát. Ugyanakkor arra is tekintettel kell lennünk, hogy bizonyos PCD típusokat (IIB) a kromogén teszt nem detektál megbízhatóan, és e típus prevalenciáját nem ismerjük, bár azt sejtjük, hogy igen ritka. Amíg pontos adatokkal és szisztematikus klinikai laboratóriumi vizsgálatok eredményeivel nem rendelkezünk (ilyen vizsgálat munkacsoportunkban is zajlik) azt ajánljuk, hogy a kétféle tesztet egymás mellett, megfontolt algoritmus mentén alkalmazzuk annak érdekében, hogy minél kevesebb fals diagnózis szülessen, de ne tévesszünk el kimutatni egyetlen PCD beteget sem.

A PCD betegeink között sok ismert *PROC* mutációval rendelkező személy van, azonban elszórtan találkoztunk új variánsokkal is. Közülük két beteg esetében elvégeztük a komplex laboratóriumi és in vitro vizsgálatokat is a mutációk PC fehérjére gyakorolt hatásainak megállapítására. A betegek klinikuma a módszertani fejezetben már ismertetésre került. Röviden, egy fatális purpura fulminánsban szenvedő csecsemő és egy ötven éves, első thrombosisát 24 éves korban elszenvedő nőbeteg esetét dolgoztuk fel. A csecsemő PC aktivitása alvadási tesztet alkalmazva 1% alattinak bizonyult (életkorspecifikus referencia érték $42 \pm 11\%$). A PC antigén koncentráció 5% volt. Az AT és a PS aktivitása életkorának megfelelő volt (mindkettő 60%). APC rezisztencia nem igazolódott, a beteg vad típusúnak bizonyult a FII20210G>A polimorfizmusra nézve is. A *PROC* génben, transz helyzetben egy-egy új mutációt detektáltunk (c.230A>G, p.Asp77Gly és c.488C>A, p.Ala163Glu), a beteg tehát összetett heterozigótának bizonyult, ami magyarázta a homozigótákhoz hasonló klinikumot és laboratóriumi eredményeket. A beteg édesanyja, aki a vizsgálat idején 23 éves volt, hordozta a p.Asp77Gly variánst, PC aktivitása és antigén szintje 51% és 49%, édesapja pedig, aki 24 éves volt, a p.Ala163Glu mutációt hordozta, PC aktivitása és antigén szintje 58%, illetve 52% volt. Egyikük sem szenvedett thrombosiszt a vizsgálat idejével bezárólag. Az édesanyjának három lánytestvére közül ketten szintén érintettek voltak (21 és 22 évesek), tünetmentesek, PC aktivitás és antigén szintjük a heterozigóta állapotnak megfelelően alakult (**43. ábra**).



43. ábra. A protein C deficiens család (proband 1 és családja) laboratóriumi jellemzői.

A táblázatban az egyes személyeket a családfán elfoglalt pozíciójuk alapján tüntettük fel. Zárójelben a vizsgálat idején regisztrált életkoruk látható (év). (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.Ala163Val and p.Ala163Glu mutations causing protein C deficiency. *Thromb. Res.* 135 (4), 718-726, 2015. közleményünk alapján.)

Az édesanya és húgai a PCD-t édesapjuktól örökölték, aki a vizsgálat idején fiatal, csupán 42 éves volt, eddig thrombosis nem szerepelt az anamnesisében. A proband testvére szintén tünetmentes volt a vizsgálat idején, ő az anyai mutációt örökölte.

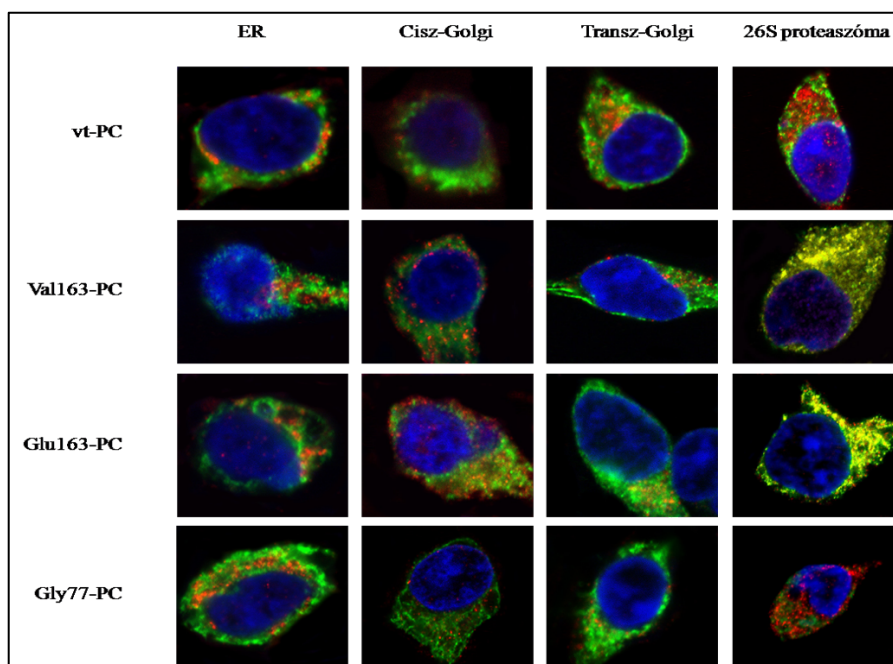
A másik beteg heterozigóta volt a c.488C>T, p.Ala163Val mutációra. Ez a mutáció ugyanazt az aminosavat érinti, mint az előző beteg esetében, de itt nem glutamát, hanem valin kerül az alanin helyére a misszensz mutáció következtében. A beteg PC aktivitása és antigén szintje 49%, illetve 50% volt. A thrombophilia kivizsgálása során APC rezisztenciát (FVL heterozigóta) detektáltunk, egyéb eltérés nem volt. A Lp(a) értéke emelkedett (606 mg/L). E beteg családjáról nem rendelkezünk érdemi információkkal.

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 betegeink, ezért, hogy a normál allélról átíródó variáns ne befolyásolja a vizsgálatainkat, in vitro rekombináns fehérjéken végeztük el azokat. Három különböző kísérletben határoztuk meg tehát a vad típusú és a 77Gly, a 163Val és 163Glu mutánsok koncentrációját a HEK293 sejtek médiumában és a sejtlyázatokban. A transzfekció hatékonyságát a FluoReporterR lacZ/Galactosidase Quantification Kit-tel határoztuk meg és a PC ELISA eredményeket ennek megfelelően korrigáltuk. A vad típusú fehérje antigén koncentrációja $0,142 \pm 0,007$ $\mu\text{g/mL}$ és $0,034 \pm 0,003$ $\mu\text{g/mg}$ protein volt rendre a médiumban és a sejtlyázatokban. A vad típusú és a mutáns PC fehérjék antigén koncentrációja nem különbözött jelentősen a sejtlyázatokban ($0,033 \pm 0,002$, $0,019 \pm 0,002$ és $0,021 \pm 0,002$ $\mu\text{g/mg}$ protein rendre a 77Gly, 163Val és 163Glu PC esetében). A 77Gly mutáns koncentrációja mérhető volt a médiumban, de alacsonyabb volt a vad típusú PC-nél ($0,059 \pm 0,001$ $\mu\text{g/mL}$). A 163Val és 163Glu mutánsok koncentrációja detektálási határ alatt volt a médiumban. Ezeket az eredményeket Western blottal is igazoltuk, ahol a sejtlyázatokban a vad típus és minden mutáns PC megjelent, és mind a vad típus, mind a 77Gly PC jól látható diszkrét sávként volt detektálható a transzfektált sejtek médiumában. Ezzel ellentétben, a 163Glu és 163Val mutánsok médiumában nem detektáltuk a PC jelenlétét. (Nem lehetett PC-t detektálni a negatív kontrollként alkalmazott „mock” mintákból sem.) A 77Gly PC aktivitása az amidolitikus tesztben történő meghatározás során összehasonlítható volt a vad típusú PC aktivitásával három különböző kísérletben ($77,5\% \pm 15,1\%$, 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 típus PC specifikus aktivitását 100%-nak véve). A mock transzfekcióból származó médiumban nem lehetett PC aktivitást detektálni, hasonlóan a 163Val és 163Glu mutánsok médiumához. A 77Gly PC aktivitása alvadási tesztben a vad típusú PC $80\% \pm 9,4\%$ -a volt. Az amidolitikus esszéhez hasonlóan, az alvadási tesztrel sem lehetett PC aktivitást mérni a mock, a 163Val és 163Glu minták médiumából. Annak vizsgálatára, hogy van-e különbség a vad típusú és a 77Gly PC

aktivációjának sebességében, a médiumokat Protac-kal előinkubáltuk különböző időtartamon keresztül 1-től 10 percig terjedően és a mintákhoz APTI reagenst és kalcium-kloridot adva megmértük az alvadási időket. Nem volt különbség a vad típus és 77Gly mutáns között ebben a tekintetben.

Mindezekből, a 163-as pozíciót érintően, egyértelműen szekréció zavart feltételeztünk, a 77-es pozíciót érintő variáns viselkedésében egy sokkal enyhébb következménnyel szembesültünk: enyhe szekréció zavar dominált és érdemi funkcionális komponenst nem tudtunk igazolni. A szekréció zavart tovább jellemzendő, kettős immunfluoreszcens festést és konfokális lézer szkennig mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk, illetve kvantitatívan is meghatároztuk a vad típusú és mutáns PC-k különböző sejtorganellumokkal való kolokalizációját. Amint az várható volt, a vad típusú PC azonos mértékben volt jelen az ER-ben, a cis-és a transz-Golgiban és ezekkel a sejtorganellumokkal történő kolokalizáció PPA szoftverrel meghatározott értékei is hasonlóak voltak. A vad típusú fehérjéhez hasonlóan a 163Val, a 163Glu és a 77Gly mutánsok is detektálhatóak voltak az ER-ben, a cis-és a transz-Golgi apparátusban. A 77Gly mutáns egyik sejtorganellummal sem mutatott kifejezett együttállást (44. ábra). A helyzet más volt a 163Glu és 163Val mutánsoknál, esetükben az egymásra illesztett felvételeken látható sárga szín mutatja a 26S proteasómában feltételezett akkumulálódást. A PPA szoftverrel meghatározott PPI1 értékek a vad típus és a 77Gly esetében egyik sejtalkotó markerre sem mutattak szignifikáns különbséget, míg a 163Glu és 163Val esetében a 26S proteasómát jelölő markerrel szignifikánsan magasabb PPI1 értékeket találtunk a vad típushoz viszonyítva (26S proteasómára PPI1 vad típus: 0,125 (0,079-0,158); 77Gly: 0,105 (0,078-0,111); 163Glu: 0,190 (0,185-0,202); 163Val: 0,220 (0,161-0,224) volt). Az eredmények a 163-as pozíciót érintő mutánsok esetében alátámasztják a szekréció zavart és a mutáns PC 26S proteasómában történő akkumulációját sugallják. A 77Gly esetében jelentős intracelluláris felhalmozódást nem igazoltunk.



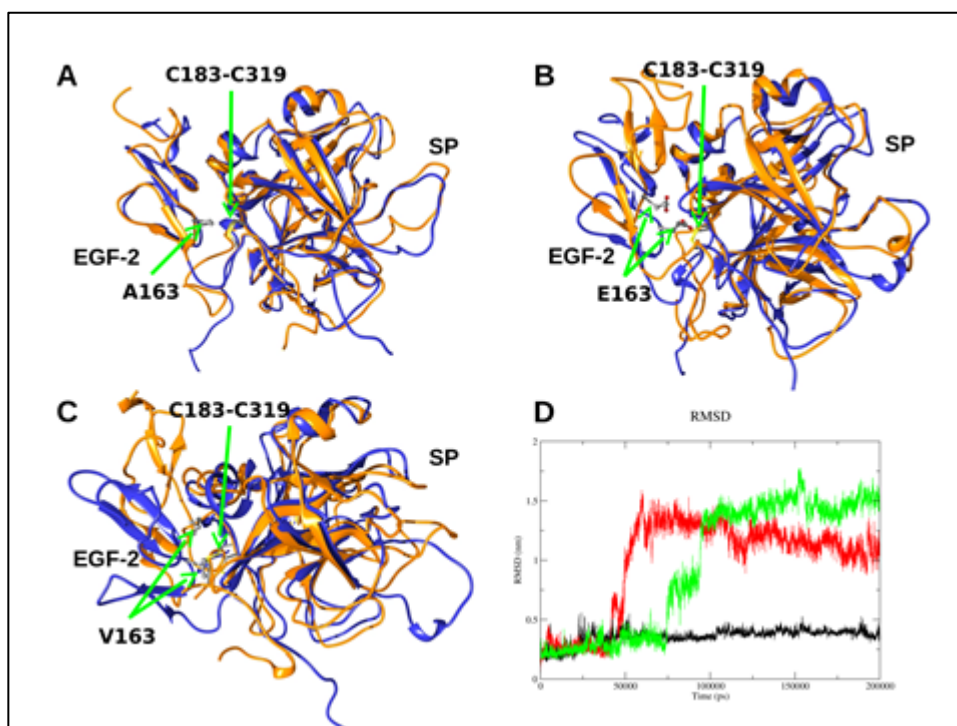
44. ábra. A vad típusú, a 163Val és 163Glu PC mutánsok kettős immunfluoreszcens festése.

A képeken a PC zöld, a különböző sejtorganellumokat jelölő markerek piros színben láthatók. A PC kolokalizációja valamely sejtorganellummal sárga színben látható. Az ábra a 163Val és 163Glu PC nagyfokú kolokalizációját mutatja a 26S proteasómával. VT, vad típus; ER, endoplazmatikus reticulum. (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.Ala163Val and p.Ala163Glu mutations causing protein C deficiency. *Thromb. Res.* 135 (4), 718-726, 2015. közleményünk alapján.)

Az abnormalis 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).

A mutációk következményeinek in silico módszerekkel történő vizsgálata során megállapítottuk, hogy a p.Asp77Gly mutáció a Gla-domén C-terminális helikális szegmensén található. A mutáció által érintett aminosavnak nincs közvetlen interakciója egyik környező reziduummal sem. Ennél fogva nem valószínű, hogy a mutáció esszenciális intramolekuláris H-hidakat (vagy sóhidakat) szakítana fel. A másik két mutáció esetében nem ez a helyzet. Azok az EGF2 és SP doméneket összekötő láncközi diszulfid híd közelében helyezkednek el. Molekuladinamikai

szimulációk segítségével megkíséreltük kideríteni, miként befolyásolják az utóbbi mutációk az EGF2 és SP domének közötti interakció erősségét és/vagy ezen domének relatív helyzetét. A kérdés tisztázására az egyes trajektóriákból származó szerkezetek pillanatfelvételét a megfelelő SP domén első (kiindulási szerkezetnek megfelelő) pillanatfelvételére illesztettük vissza. Ilyen módon könnyen követhetővé vált az EGF2 domén elmozdulása az SP doménhez viszonyítva. A **45. ábra** A-C részén ennek az illesztésnek az első és utolsó pillanatképét mutatjuk a vad típusú (A), a 163Glu (B) és a 163Val (C) PC esetében. Jelentős különbségeket fedezhetünk fel a vad típusú és a mutáns fehérjék között. Az A. ábrán látható, hogy a vad típusú fehérje esetében a szimuláció végén a két domén relatív helyzete közelítőleg ugyanolyan, mint a szimuláció kezdetén. Jelentősen eltér a helyzet a mutáns fehérjék esetében, ahogy azt a B. és C. ábrák mutatják. Ezekben az esetekben a szimuláció alatt mindvégig diszulfid hídon keresztül egymáshoz rögzített domének egymáshoz viszonyított helyzete szignifikánsan különbözik a szimuláció kezdetén és végén. A referenciától való eltérést (root mean square deviation, RMSD) a megfelelő EGF2 domén első pillanatfelvétel geometriájából (ez a referencia) és a visszaillesztett, trajektóriából származó pillanatfelvétel geometria (ez az eltérés) alapján számoltuk ki a vad típusú fehérje és a 163Glu és 163Val PC fehérjék esetén (**D. ábra**). A vad típusú PC esetében a kicsi, közel állandó RMSD értékek jelzik azt, hogy az EGF2 domén relatív helyzete csak minimálisan változott a 200 ns-os szimuláció alatt. Ezzel ellentétben a 163Glu és 163Val mutációk esetében az EGF2 domén relatív helyzete jelentős mértékben megváltozott, ahogy azt a vonatkozó RMSD értékek is mutatják. A 163Val mutáns fehérje deformációja, habár később alakul ki, szembetűnőbb, mint a 163Glu mutánsé.



45. ábra. A p.Ala163Glu és p.Ala163Val mutációk által eredményezett szerkezeti változások a PC-ben. A 200 ns-os molekuladinamikai szimuláció trajektóriákból származó első és utolsó pillanattfelvétel az EGF2 és SP doménekről a vad típus (A), a 163Glu (B) és 163Val (C) APC esetében.

Az EGF2 és SP doméneket és az azokat összekötő diszulfid hidat alkotó ciszteineket, a 163Ala (ez a vad típus), 163Glu és 163Val reziduumokat az ábra A-C részein jelöltük. A diszulfid hidat alkotó ciszteineket, a 163 pozícióban lévő vad típusú és mutáns reziduumokat golyó és pálcika ábrázolással jelöltük. Az ábra D részén látható az EGF2 domén kiindulási röntgenszerkezettől, mint referenciától való eltéréseit (root mean square deviation, RMSD) jelző grafikon. A megfelelő szerkezeteket úgy állítottuk elő, hogy szuperponáltuk az EGF2-SP geometriákat a kiindulási röntgendiffrakciós szerkezetre, minden egyes szimuláció esetében. A visszaillesztés során a legkisebb négyzetek módszerét használtuk és csak az SP doménekre illesztettük. Az RMSD-eket a vad típus esetén feketével, a 163Glu mutánsnál pirossal, a 163Val mutánsnál zölddel jelöltük. (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.Ala163Val and p.Ala163Glu mutations causing protein C deficiency. *Thromb. Res.* 135 (4), 718-726, 2015. közleményünk alapján.)

Fentiek alapján elmondható, hogy a mutáns 163Glu és 163Val reziduumok helyzete a vad típussal ellentétben jelentősen megváltozik a szimulációs periódus alatt, ami megváltozott fehérje feltekeredést (foldingot) valószínűsít. Ennek a kóros foldingnak az egyik lehetséges következménye az, hogy nem jön létre a diszulfid-kötés.

Vizsgálatainkat összefoglalva, két új mutáció a PC EGF2 doménje ugyanazon pozícióját érintette (p.Ala163Glu és p.Ala163Val). A harmadik eltérés (p.Asp77Gly) egy már közölt, de eddig részletesen még nem vizsgált mutáció. Ezen mutációk egyike

sem fordult elő 100 egészséges, normál PC szintekkel rendelkező egyénben és valamennyi mutáció heterozigóta hordozója csökkent PC aktivitással és antigén szinttel rendelkezett. A 163-as pozíció konzervált az adatbázisban elérhető fajok PC-je esetén és a humán FX megfelelő pozíciójában szintén alanin reziduum található. Habár a szekvenciában több mint húsz aminosav választja el, a 3D szerkezetben a 163Ala az EGF2 és SP doméneket összekötő láncok közti diszulfid híd közelségében található. Vizsgálatainkban a 163Val és 163Glu 26S proteaszómával történő kolokalizációját észleltük, utóbbi a kóros feltekeredésű fehérjék ismert, sejten belüli degradációjának potenciális színhelye poliubikvitinációt követően [442,443]. Ezeket az eredményeket alátámasztja a 163Val és 163Glu mutánsok magasabb poliubikvitináltsági szintje, mely így az intracelluláris degradáció egyik indirekt bizonyítéka. Összefoglalásképpen eredményeink azt mutatják, hogy a p.Ala163Glu és p.Ala163Val mutációk a PC szerkezeti károsodásához és szekréciós defektusához vezetnek. Saját vizsgálatainkban a p.Asp77Gly mutációra heterozigóta személyek PC aktivitása és antigén szintje arányosan csökkent volt I-es típusú deficienciát sugallva. Mivel a 77Gly PC fehérje nagy mennyiségben volt jelen a transzfektált sejtek médiumában, súlyos szekréciós zavar nem igazolódott. Továbbá mind az amidolitikus, mind az alvadási funkcionális tesztek normál aktivitásúnak mutatták a 77Gly fehérjét. Azt is kimutattuk, hogy a 77Gly aktiválódási rátája Protac-kal nem különbözött a vad típusú PC fehérjéjétől. Kettős immunfluoreszcens festéssel nem tapasztaltunk kolokalizációt egyik sejtalkotóval sem, és nem detektáltunk fokozott poliubikvitinációt sem. A molekula ezen része konzerváltnak tűnik az emlős fajokban és más K-vitamin függő alvadási fehérjékben. A 77-es pozícióban aszpartát található a humán PC-ben és FX-ben és vagy aszpartát, vagy a hasonló karakterű glutamát található meg a FVII-ben és a FIX-ben, hasonlóan más fajok PC-jéhez. Molekulamodellézéses 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. A 77Gly mutáns PC médiumban való jelenléte és normál aktivitása alapján és arra tekintettel, hogy nem igazolódott jelentősebb szekréciós defektus, azt várhatnánk, hogy a heterozigóta betegek PC plazma koncentrációja legalább 70%. Ennek ellenére a mutációra heterozigóták plazma PC antigén szintje csak 50% körüli. (Megjegyzendő, hogy a HEK sejtek által történő in vitro szekréció összehasonlítása a májsejtekben zajló in vivo szekrécióval túl mechanikus.) Valamennyi eredményünket összevetve elmondható,

hogy a p.Asp77Gly mutáció normál aktivitású PC-hez vezet, és mivel esetében nem látható jelentősebb szekréción zavar, elképzelhető, hogy a mutáció az intermolekuláris kölcsönhatásokat módosítja, melyekben a PC részt vesz és annak clearance-t is befolyásolhatja.

6 ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK RITKA HEMOSZTÁZIS RENDELLENESÉGEKBEN

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, patogenitásukat igazoltuk. A súlyos klinikai tünetek, a plazmában és a thrombocytákban detektálhatatlan FXIII aktivitás és FXIII-A antigén szint összhangban volt a molekuláris defektussal, mely I-es típusú FXIII deficienciát valószínűsített.

- Kidolgoztuk a veleszületett FXIII deficiencia diagnosztikai protokollját és nemzetközi ajánlásként 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 patogenitását 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. A ritka coagulopathiák esetén – mivel az alvadási faktor szintek nem korrelálnak jól a vérzéses tünetekkel – a 10-50% közötti faktorszintekkel rendelkező személyek is lehetnek vérzékenyek, amit nem minden szűrőteszt jelez, így a klinikai fenotípus-laboratóriumi fenotípus összefüggése FV deficienciában bonyolult.

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 hátterében 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 szekréciónak 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), amit a 12-es kromoszóma q13,11 - q13,13 régiójában 8 polimorf marker alkalmazásával bizonyítottunk. Geneológiai vizsgálatokkal kiegészítve feltérképeztük az 5 családot összekapcsoló lehetséges közös őseket. 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 tünettannát.

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, de legfőképpen az utóbbi években 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 háttérben, véleményünk szerint, legalább részben thromboticus események állnak, ezért javaslatot tettünk a v. cava inferior rendszert 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 különbségeért, hanem a heparin koncentrációja a reagensben és az ionerő, a pH 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 allosztériát 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 allosztérikus 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 allosztérikus aktiváció érintett és a 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 hátterében alapító hatás áll. Felvetettük a mutáció roma eredetét és javaslatot tettünk az ATBp3 vizsgálat integrálására a thrombosis kockázat megítélése szempontjából a cardiovascularis betegségekre vulnérabilis populációban.

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 hátterében. 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 hátterében 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 molekulamodellezéssel 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 pályán elindított, a naiv és bizonytalan orvostanhallgatót a Tudományos Diákköri tevékenységbe bevonva, majd az orvosi laboratóriumi diagnosztikai szakma felé terelve és az intézetében működő kutatócsoportba bekapcsolva segített eljutni a szakvizsgáig és a PhD fokozat megszerzéséig és tovább. Tőle tanultam meg a szakmai igényesség iránti elkötelezettséget. Köszönöm bölcsességét, a belém vetett bizalmát és támogatását, amit azóta is érzek. Köszönöm Kappelmayer János professzornak a folyamatos támogatását, a tartalmas szakmai beszélgetéseket, szemléletformáló értékrendjét, emberségét és azt, hogy minden helyzetben fordulhatok hozzá tanácsért. Nagyon hálás vagyok neki mindezekért. 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. Nehéz lenne itt minden kollégát felsorolni....a teljesség igénye nélkül, itt az értekezésben szereplő közleményeim társszerzőit említem, köszönöm Prof. Balla Györgynek, Prof. Boda Zoltánnak, Dr. Ilonczai Péternek, Prof. Kiss Csongornak, Prof. Losonczy Hajnának, 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 Csűry-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 hallgatómnak, 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.

zsbereczky_271_24

Az értekezést megalapozó közlemények elkészítéséhez az alábbi pályázatok járultak hozzá:

Vérzékenységek:

OTKA-NKTH NI 69238 és OTKA K62087, MTA 2006TKI227, ETT 406/2006 (FX deficiencia), OTKA K78386 (FV deficiencia), OTKA K78386, MTA11003, TKI227, TAMOP 4.2.2.B-10/1-2010-0024, 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 (FXIII deficiencia), OTKA K116228 (HHT), GINOP-2.3.2-15-2016-00039 (vWD, HHT és fibrinogén rendellenességek).

Thrombophiliák:

OTKA K116228, OTKA K106294, OTKA K139293, OTKA PD 101120, MTA11003, TKI227, GINOP-2.3.2-15-2016-00039, TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 és GINOP-2.3.2-15-2016-00050.

8 REFERENCIÁK

1. I. Gilbert C. White, V.J.M., Sam Schulman, William C. Aird, and Joel S. Bennett. Overview of Basic Coagulation and Fibrinolysis. In *Hemostasis and Thrombosis*, Marder, V., Ed. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health: Philadelphia, 2013; pp. 103-108.
2. Lippi, G.; Favalaro, E.J.; Franchini, M.; Guidi, G.C. Milestones and perspectives in coagulation and hemostasis. *Semin Thromb Hemost* **2009**, *35*, 9-22, doi:10.1055/s-0029-1214144.
3. Hoffman, M.; Monroe, D.M., 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* **2001**, *85*, 958-965.
4. Monroe, D.M. Basic principles underlying coagulation. In *Practical hemostasis and thrombosis*, Key NS, M.M., Lillicrap D, Ed. Wiley Blackwell: 2017; pp. 1-9.
5. Bombeli, T.; Mueller, M.; Haeberli, A. Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb Haemost* **1997**, *77*, 408-423.
6. Hoffman, M.; Colina, C.M.; McDonald, A.G.; Arepally, G.M.; Pedersen, L.; Monroe, D.M. Tissue factor around dermal vessels has bound factor VII in the absence of injury. *J Thromb Haemost* **2007**, *5*, 1403-1408, doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02576.x.
7. Nemerson, Y. Tissue factor and the initiation of blood coagulation. *Adv Exp Med Biol* **1987**, *214*, 83-94, doi:10.1007/978-1-4757-5985-3_7.
8. Mackman, N.; Morrissey, J.H.; Fowler, B.; Edgington, T.S. Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry* **1989**, *28*, 1755-1762, doi:10.1021/bi00430a050.
9. Fowler, W.E.; Fretto, L.J.; Hamilton, K.K.; Erickson, H.P.; McKee, P.A. Substructure of human von Willebrand factor. *J Clin Invest* **1985**, *76*, 1491-1500, doi:10.1172/JCI112129.
10. Goto, S.; Salomon, D.R.; Ikeda, Y.; Ruggeri, Z.M. Characterization of the unique mechanism mediating the shear-dependent binding of soluble von Willebrand factor to platelets. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 23352-23361, doi:10.1074/jbc.270.40.23352.
11. Majumder, R.; Weinreb, G.; Lentz, B.R. Efficient thrombin generation requires molecular phosphatidylserine, not a membrane surface. *Biochemistry* **2005**, *44*, 16998-17006, doi:10.1021/bi051469f.
12. Morrissey, J.H.; Choi, S.H.; Smith, S.A. Polyphosphate: an ancient molecule that links platelets, coagulation, and inflammation. *Blood* **2012**, *119*, 5972-5979, doi:10.1182/blood-2012-03-306605.
13. Wolberg, A.S. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev* **2007**, *21*, 131-142, doi:10.1016/j.blre.2006.11.001.
14. Muszbek, L.; Bereczky, Z.; Bagoly, Z.; Komaromi, I.; Katona, E. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev* **2011**, *91*, 931-972, doi:10.1152/physrev.00016.2010.
15. Mast, A.E. Tissue Factor Pathway Inhibitor: Multiple Anticoagulant Activities for a Single Protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2016**, *36*, 9-14, doi:10.1161/ATVBAHA.115.305996.
16. Gierula, M.; Ahnstrom, J. Anticoagulant protein S-New insights on interactions and functions. *J Thromb Haemost* **2020**, *18*, 2801-2811, doi:10.1111/jth.15025.

17. Dahlback, B.; Guo, L.J.; Livaja-Koshlar, R.; Tran, S. Factor V-short and protein S as synergistic tissue factor pathway inhibitor (TFPIalpha) cofactors. *Res Pract Thromb Haemost* **2018**, *2*, 114-124, doi:10.1002/rth2.12057.
18. Esmon, C.T. The protein C pathway. *Chest* **2003**, *124*, 26S-32S, doi:10.1378/chest.124.3_suppl.26s.
19. Esmon, C.T. The endothelial protein C receptor. *Curr Opin Hematol* **2006**, *13*, 382-385, doi:10.1097/01.moh.0000239712.93662.35.
20. Kalafatis, M.; Rand, M.D.; Mann, K.G. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 31869-31880.
21. Nicolaes, G.A.; Tans, G.; Thomassen, M.C.; Hemker, H.C.; Pabinger, I.; Varadi, K.; Schwarz, H.P.; Rosing, J. Peptide bond cleavages and loss of functional activity during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 21158-21166, doi:10.1074/jbc.270.36.21158.
22. Mann, K.G.; Kalafatis, M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood* **2003**, *101*, 20-30, doi:10.1182/blood-2002-01-0290.
23. Bock, S.C. Antithrombin and the Serpin Family. In *Hemostasis and Thrombosis*, Marder, V.J., Aird, W.C., Bennett, J.S., Schulman, S., Gilbert, I., White, C., Ed. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health: Philadelphia, 2013; pp. 286-299.
24. Rijken, D.C.; Hoylaerts, M.; Collen, D. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J Biol Chem* **1982**, *257*, 2920-2925.
25. Hoylaerts, M.; Rijken, D.C.; Lijnen, H.R.; Collen, D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem* **1982**, *257*, 2912-2919.
26. Lee, K.N.; Jackson, K.W.; Christiansen, V.J.; Chung, K.H.; McKee, P.A. A novel plasma proteinase potentiates alpha2-antiplasmin inhibition of fibrin digestion. *Blood* **2004**, *103*, 3783-3788, doi:10.1182/blood-2003-12-4240.
27. Mutch, N.J.; Thomas, L.; Moore, N.R.; Lisiak, K.M.; Booth, N.A. TAFIa, PAI-1 and alpha-antiplasmin: complementary roles in regulating lysis of thrombi and plasma clots. *J Thromb Haemost* **2007**, *5*, 812-817, doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02430.x.
28. Jacobson, R.M.; Pignolo, R.J.; Lazaridis, K.N. Clinical Trials for Special Populations: Children, Older Adults, and Rare Diseases. *Mayo Clin Proc* **2024**, *99*, 318-335, doi:10.1016/j.mayocp.2023.03.003.
29. Kruer, M.C.; Steiner, R.D. The role of evidence-based medicine and clinical trials in rare genetic disorders. *Clin Genet* **2008**, *74*, 197-207, doi:10.1111/j.1399-0004.2008.01041.x.
30. Reinhard, C.; Bachoud-Levi, A.C.; Baumer, T.; Bertini, E.; Brunelle, A.; Buizer, A.I.; Federico, A.; Gasser, T.; Groeschel, S.; Hermanns, S., et al. The European Reference Network for Rare Neurological Diseases. *Front Neurol* **2020**, *11*, 616569, doi:10.3389/fneur.2020.616569.
31. Dargaud, Y.; Fontana, P.; Fenaux, P.; Hermans, C. Specialist training in thrombosis and haemostasis across Europe: From aspirations to actions. *Haemophilia* **2023**, *29*, 1369-1370, doi:10.1111/hae.14829.
32. Commision, E. Rare diseases. Availabe online: https://ec.europa.eu/info/research-and-innovation/research-area/health/rare-diseases_en (accessed on 4 February 2022).

33. Nguengang Wakap, S.; Lambert, D.M.; Olry, A.; Rodwell, C.; Gueydan, C.; Lanneau, V.; Murphy, D.; Le Cam, Y.; Rath, A. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur J Hum Genet* **2020**, *28*, 165-173, doi:10.1038/s41431-019-0508-0.
34. Union, E. Regulation (EC) No 141/2000 of the European Parliament and of the council of 16 December 1999 on orphan medicinal products. 1999.
35. EU. EU Health Programme. Reaching out to rare disease patients across Europe. Available online: https://ec.europa.eu/health/non-communicable-diseases/steering-group/rare-diseases_en (accessed on
36. Kountouris, P.; Stephanou, C.; Archer, N.; Bonifazi, F.; Giannuzzi, V.; Kuo, K.H.M.; Maggio, A.; Makani, J.; Manu-Pereira, M.D.M.; Michailidou, K., et al. The International Hemoglobinopathy Research Network (INHERENT): An international initiative to study the role of genetic modifiers in hemoglobinopathies. *Am J Hematol* **2021**, *96*, E416-E420, doi:10.1002/ajh.26323.
37. Iolascon, A.; Bianchi, P.; Andolfo, I.; Russo, R.; Barcellini, W.; Fermo, E.; Toldi, G.; Ghirardello, S.; Rees, D.; Van Wijk, R., et al. Recommendations for diagnosis and treatment of methemoglobinemia. *Am J Hematol* **2021**, *96*, 1666-1678, doi:10.1002/ajh.26340.
38. Collado, A.; Boaro, M.P.; van der Veen, S.; Idrizovic, A.; Biemond, B.J.; Beneitez Pastor, D.; Ortuno, A.; Cela, E.; Ruiz-Llobet, A.; Bartolucci, P., et al. Challenges and Opportunities of Precision Medicine in Sickle Cell Disease: Novel European Approach by GenoMed4All Consortium and ERN-EuroBloodNet. *Hemasphere* **2023**, *7*, e844, doi:10.1097/HS9.0000000000000844.
39. Dupuis-Girod, S.; Shovlin, C.L.; Kjeldsen, A.D.; Mager, H.J.; Sabba, C.; Droege, F.; Fargeton, A.E.; Fialla, A.D.; Gandolfi, S.; Hermann, R., et al. European Reference Network for Rare Vascular Diseases (VASCERN): When and how to use intravenous bevacizumab in Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia (HHT)? *Eur J Med Genet* **2022**, *65*, 104575, doi:10.1016/j.ejmg.2022.104575.
40. Shovlin, C.; Bamford, K.; Sabba, C.; Mager, H.J.; Kjeldsen, A.; Droege, F.; Buscarini, E.; Dupuis-Girod, S.; Vascern, H.H.T. Prevention of serious infections in hereditary hemorrhagic telangiectasia: roles for prophylactic antibiotics, the pulmonary capillaries-but not vaccination. *Haematologica* **2019**, *104*, e85-e86, doi:10.3324/haematol.2018.209791.
41. Buscarini, E.; Botella, L.M.; Geithoff, U.; Kjeldsen, A.D.; Mager, H.J.; Pagella, F.; Suppressa, P.; Zarrabeitia, R.; Dupuis-Girod, S.; Shovlin, C.L., et al. Safety of thalidomide and bevacizumab in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Orphanet J Rare Dis* **2019**, *14*, 28, doi:10.1186/s13023-018-0982-4.
42. Peyvandi, F.; Kaufman, R.J.; Seligsohn, U.; Salomon, O.; Bolton-Maggs, P.H.; Spreafico, M.; Menegatti, M.; Palla, R.; Siboni, S.; Mannucci, P.M. Rare bleeding disorders. *Haemophilia* **2006**, *12 Suppl 3*, 137-142, doi:10.1111/j.1365-2516.2006.01271.x.
43. Peyvandi, F.; Spreafico, M. National and international registries of rare bleeding disorders. *Blood Transfus* **2008**, *6 Suppl 2*, s45-48, doi:10.2450/2008.0037-08.
44. Palla, R.; Peyvandi, F.; Shapiro, A.D. Rare bleeding disorders: diagnosis and treatment. *Blood* **2015**, *125*, 2052-2061, doi:10.1182/blood-2014-08-532820.

45. Peyvandi, F.; Cattaneo, M.; Inbal, A.; De Moerloose, P.; Spreafico, M. Rare bleeding disorders. *Haemophilia* **2008**, *14 Suppl 3*, 202-210, doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01751.x.
46. Sadler, J.E.; Budde, U.; Eikenboom, J.C.; Favaloro, E.J.; Hill, F.G.; Holmberg, L.; Ingerslev, J.; Lee, C.A.; Lillicrap, D.; Mannucci, P.M., et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost* **2006**, *4*, 2103-2114, doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02146.x.
47. Peyvandi, F. Rare coagulation disorders: an emerging issue. *Blood Transfus* **2007**, *5*, 185-186, doi:10.2450/2007.0044-07.
48. Acharya, S.S.; Coughlin, A.; Dimichele, D.M.; North American Rare Bleeding Disorder Study, G. Rare Bleeding Disorder Registry: deficiencies of factors II, V, VII, X, XIII, fibrinogen and dysfibrinogenemias. *J Thromb Haemost* **2004**, *2*, 248-256, doi:10.1111/j.1538-7836.2003.t01-1-00553.x.
49. Muszbek, L.; Yee, V.C.; Hevessy, Z. Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res* **1999**, *94*, 271-305, doi:10.1016/s0049-3848(99)00023-7.
50. Alshehri, F.S.M.; Whyte, C.S.; Mutch, N.J. Factor XIII-A: An Indispensable "Factor" in Haemostasis and Wound Healing. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22063055.
51. Adany, R.; Bardos, H. Factor XIII subunit A as an intracellular transglutaminase. *Cell Mol Life Sci* **2003**, *60*, 1049-1060, doi:10.1007/s00018-003-2178-9.
52. Nurminskaya, M.; Kaartinen, M.T. Transglutaminases in mineralized tissues. *Front Biosci* **2006**, *11*, 1591-1606, doi:10.2741/1907.
53. Ichinose, A.; Davie, E.W. Characterization of the gene for the a subunit of human factor XIII (plasma transglutaminase), a blood coagulation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, *85*, 5829-5833, doi:10.1073/pnas.85.16.5829.
54. Schroeder, V.; Kohler, H.P. Factor XIII: Structure and Function. *Semin Thromb Hemost* **2016**, *42*, 422-428, doi:10.1055/s-0036-1571341.
55. Katona, E.; Haramura, G.; Karpati, L.; Fachet, J.; Muszbek, L. A simple, quick one-step ELISA assay for the determination of complex plasma factor XIII (A2B2). *Thromb Haemost* **2000**, *83*, 268-273.
56. Muszbek, L.; Bagoly, Z.; Bereczky, Z.; Katona, E. The involvement of blood coagulation factor XIII in fibrinolysis and thrombosis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* **2008**, *6*, 190-205, doi:10.2174/187152508784871990.
57. Inbal, A.; Muszbek, L. Coagulation factor deficiencies and pregnancy loss. *Semin Thromb Hemost* **2003**, *29*, 171-174, doi:10.1055/s-2003-38832.
58. Koseki-Kuno, S.; Yamakawa, M.; Dickneite, G.; Ichinose, A. Factor XIII A subunit-deficient mice developed severe uterine bleeding events and subsequent spontaneous miscarriages. *Blood* **2003**, *102*, 4410-4412, doi:10.1182/blood-2003-05-1467.
59. Dardik, R.; Loscalzo, J.; Inbal, A. Factor XIII (FXIII) and angiogenesis. *J Thromb Haemost* **2006**, *4*, 19-25, doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01473.x.
60. Hsieh, L.; Nugent, D. Factor XIII deficiency. *Haemophilia* **2008**, *14*, 1190-1200, doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01857.x.
61. Kohler, H.P.; Ichinose, A.; Seitz, R.; Ariens, R.A.; Muszbek, L.; Factor, X.; Fibrinogen, S.S.C.S.O.T.I. Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies. *J Thromb Haemost* **2011**, *9*, 1404-1406, doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04315.x.

62. Ivaskevicius, V.; Seitz, R.; Kohler, H.P.; Schroeder, V.; Muszbek, L.; Ariens, R.A.; Seifried, E.; Oldenburg, J.; Study, G. International registry on factor XIII deficiency: a basis formed mostly on European data. *Thromb Haemost* **2007**, *97*, 914-921.
63. Lak, M.; Peyvandi, F.; Ali Sharifian, A.; Karimi, K.; Mannucci, P.M. Pattern of symptoms in 93 Iranian patients with severe factor XIII deficiency. *J Thromb Haemost* **2003**, *1*, 1852-1853, doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00338.x.
64. Jennings, I.; Kitchen, S.; Woods, T.A.; Preston, F.E.; Uk, N. Problems relating to the laboratory diagnosis of factor XIII deficiency: a UK NEQAS study. *J Thromb Haemost* **2003**, *1*, 2603-2608, doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00469.x.
65. Lee, K.N.; Birckbichler, P.J.; Patterson, M.K., Jr. Colorimetric assay of blood coagulation factor XIII in plasma. *Clin Chem* **1988**, *34*, 906-910.
66. Song, Y.C.; Sheng, D.; Taubenfeld, S.M.; Matsueda, G.R. A microtiter assay for factor XIII using fibrinogen and biotinylcadaverine as substrates. *Anal Biochem* **1994**, *223*, 88-92, doi:10.1006/abio.1994.1551.
67. Wilmer, M.; Rudin, K.; Kolde, H.; Poetzsch, B.; Lenz, W.; Moessmer, G.; Meili, E.; Egbring, R.; Gempeler-Messina, P.; Gempeler, M., et al. Evaluation of a sensitive colorimetric FXIII incorporation assay. Effects of FXIII Val34Leu, plasma fibrinogen concentration and congenital FXIII deficiency. *Thromb Res* **2001**, *102*, 81-91, doi:10.1016/s0049-3848(01)00224-9.
68. Muszbek, L.; Polgar, J.; Fesus, L. Kinetic determination of blood coagulation Factor XIII in plasma. *Clin Chem* **1985**, *31*, 35-40.
69. Fickenscher, K.; Aab, A.; Stuber, W. A photometric assay for blood coagulation factor XIII. *Thromb Haemost* **1991**, *65*, 535-540.
70. Peyvandi, F.; Tagliabue, L.; Menegatti, M.; Karimi, M.; Komaromi, I.; Katona, E.; Muszbek, L.; Mannucci, P.M. Phenotype-genotype characterization of 10 families with severe a subunit factor XIII deficiency. *Hum Mutat* **2004**, *23*, 98, doi:10.1002/humu.9206.
71. Anwar, R.; Stewart, A.D.; Miloszewski, K.J.; Losowsky, M.S.; Markham, A.F. Molecular basis of inherited factor XIII deficiency: identification of multiple mutations provides insights into protein function. *Br J Haematol* **1995**, *91*, 728-735, doi:10.1111/j.1365-2141.1995.tb05376.x.
72. Vysokovsky, A.; Saxena, R.; Landau, M.; Zivelin, A.; Eskaraev, R.; Rosenberg, N.; Seligsohn, U.; Inbal, A. Seven novel mutations in the factor XIII A-subunit gene causing hereditary factor XIII deficiency in 10 unrelated families. *J Thromb Haemost* **2004**, *2*, 1790-1797, doi:10.1111/j.1538-7836.2004.00908.x.
73. Schroeder, V.; Meili, E.; Cung, T.; Schmutz, P.; Kohler, H.P. Characterisation of six novel A-subunit mutations leading to congenital factor XIII deficiency and molecular analysis of the first diagnosed patient with this rare bleeding disorder. *Thromb Haemost* **2006**, *95*, 77-84.
74. Takahashi, N.; Tsukamoto, H.; Umeyama, H.; Castaman, G.; Rodeghiero, F.; Ichinose, A. Molecular mechanisms of type II factor XIII deficiency: novel Gly562-Arg mutation and C-terminal truncation of the A subunit cause factor XIII deficiency as characterized in a mammalian expression system. *Blood* **1998**, *91*, 2830-2838.
75. Mikkola, H.; Muszbek, L.; Haramura, G.; Hamalainen, E.; Jalanko, A.; Palotie, A. Molecular mechanisms of mutations in factor XIII A-subunit deficiency: in vitro expression in COS-cells demonstrates intracellular degradation of the mutant proteins. *Thromb Haemost* **1997**, *77*, 1068-1072.

76. Mikkola, H.; Yee, V.C.; Syrjala, M.; Seitz, R.; Egbring, R.; Petrini, P.; Ljung, R.; Ingerslev, J.; Teller, D.C.; Peltonen, L., et al. Four novel mutations in deficiency of coagulation factor XIII: consequences to expression and structure of the A-subunit. *Blood* **1996**, *87*, 141-151.
77. Kangsadalampai, S.; Chelvanayagam, G.; Baker, R.T.; Yenchitsomanus, P.; Pung-amritt, P.; Mahasandana, C.; Board, P.G. A novel Asn344 deletion in the core domain of coagulation factor XIII A subunit: its effects on protein structure and function. *Blood* **1998**, *92*, 481-487.
78. Aslam, S.; Standen, G.R.; Bruce, L.J.; Gialeraki, R.; Mandalaki, T. A novel insertion mutation (1286insC) in exon 9 of the factor XIII-A subunit gene. *Blood Coagul Fibrinolysis* **1998**, *9*, 441-443, doi:10.1097/00001721-199807000-00007.
79. Izumi, T.; Nagaoka, U.; Saito, T.; Takamatsu, J.; Saito, H.; Ichinose, A. Novel deletion and insertion mutations cause splicing defects, leading to severe reduction in mRNA levels of the A subunit in severe factor XIII deficiency. *Thromb Haemost* **1998**, *79*, 479-485.
80. Niiya, T.; Osawa, H.; Bando, S.; Oto, Y.; Tokuda, K.; Takeda, N.; Sumioka, M.; Murase, M.; Kida, K.; Makino, H. A complete deficiency of coagulation factor XIII A-subunit due to a novel compound heterozygote of Ser 413 Leu missense and an nt 389 (ins G) frameshift mutation. *Br J Haematol* **1999**, *107*, 772-775, doi:10.1046/j.1365-2141.1999.01764.x.
81. Anwar, R.; Miloszewski, K.J.; Markham, A.F. Identification of a large deletion, spanning exons 4 to 11 of the human factor XIII A gene, in a factor XIII-deficient family. *Blood* **1998**, *91*, 149-153.
82. Jenny, R.J.; Pittman, D.D.; Toole, J.J.; Kriz, R.W.; Aldape, R.A.; Hewick, R.M.; Kaufman, R.J.; Mann, K.G. Complete cDNA and derived amino acid sequence of human factor V. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84*, 4846-4850, doi:10.1073/pnas.84.14.4846.
83. Camire, R.M. A new look at blood coagulation factor V. *Curr Opin Hematol* **2011**, *18*, 338-342, doi:10.1097/MOH.0b013e3283497ebc.
84. Duga, S.; Asselta, R.; Tenchini, M.L. Coagulation factor V. *Int J Biochem Cell Biol* **2004**, *36*, 1393-1399, doi:10.1016/j.biocel.2003.08.002.
85. Cai, X.H.; Wang, X.F.; Ding, Q.L.; Fu, Q.H.; Wang, H.L. Factor V C1149G and 5609-10INSCGTGGTT causing factor V deficiency: molecular characterization by in-vitro expression. *Thromb Haemost* **2007**, *98*, 683-685.
86. Hirbawi, J.; Vaughn, J.L.; Bukys, M.A.; Vos, H.L.; Kalafatis, M. Contribution of amino acid region 659-663 of Factor Va heavy chain to the activity of factor Xa within prothrombinase. *Biochemistry* **2010**, *49*, 8520-8534, doi:10.1021/bi101097t.
87. Dahlback, B. Pro- and anticoagulant properties of factor V in pathogenesis of thrombosis and bleeding disorders. *Int J Lab Hematol* **2016**, *38 Suppl 1*, 4-11, doi:10.1111/ijlh.12508.
88. Nicolaes, G.A.; Dahlback, B. Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2002**, *22*, 530-538, doi:10.1161/01.atv.0000012665.51263.b7.
89. Cramer, T.J.; Gale, A.J. The anticoagulant function of coagulation factor V. *Thromb Haemost* **2012**, *107*, 15-21, doi:10.1160/TH11-06-0431.
90. Wildhagen, K.C.; Lutgens, E.; Loubele, S.T.; ten Cate, H.; Nicolaes, G.A. The structure-function relationship of activated protein C. Lessons from natural and

- engineered mutations. *Thromb Haemost* **2011**, *106*, 1034-1045, doi:10.1160/TH11-08-0522.
91. Segers, K.; Dahlback, B.; Nicolaes, G.A. Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms. *Thromb Haemost* **2007**, *98*, 530-542.
92. Dahlback, B.; Villoutreix, B.O. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett* **2005**, *579*, 3310-3316, doi:10.1016/j.febslet.2005.03.001.
93. Dahlback, B. Novel insights into the regulation of coagulation by factor V isoforms, tissue factor pathway inhibitor alpha, and protein S. *J Thromb Haemost* **2017**, *15*, 1241-1250, doi:10.1111/jth.13665.
94. Dahlback, B. Natural anticoagulant discovery, the gift that keeps on giving: finding FV-Short. *J Thromb Haemost* **2023**, *21*, 716-727, doi:10.1016/j.jth.2023.01.033.
95. Asselta, R.; Tenchini, M.L.; Duga, S. Inherited defects of coagulation factor V: the hemorrhagic side. *J Thromb Haemost* **2006**, *4*, 26-34, doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01590.x.
96. Tabibian, S.; Shiravand, Y.; Shams, M.; Safa, M.; Gholami, M.S.; Heydari, F.; Ahmadi, A.; Rashidpanah, J.; Dorgalaleh, A. A Comprehensive Overview of Coagulation Factor V and Congenital Factor V Deficiency. *Semin Thromb Hemost* **2019**, *45*, 523-543, doi:10.1055/s-0039-1687906.
97. Huang, J.N.; Koerper, M.A. Factor V deficiency: a concise review. *Haemophilia* **2008**, *14*, 1164-1169, doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01785.x.
98. Nuzzo, F.; Beshlawi, I.; Wali, Y.; Castoldi, E. High incidence of intracranial bleeding in factor V-deficient patients with homozygous F5 splicing mutations. *Br J Haematol* **2017**, *179*, 163-166, doi:10.1111/bjh.14195.
99. Yang, J.; Mao, H.; Sun, L. Congenital coagulation factor V deficiency with intracranial hemorrhage. *J Clin Lab Anal* **2022**, *36*, e24705, doi:10.1002/jcla.24705.
100. Castoldi, E.; Duckers, C.; Radu, C.; Spiezia, L.; Rossetto, V.; Tagariello, G.; Rosing, J.; Simioni, P. Homozygous F5 deep-intronic splicing mutation resulting in severe factor V deficiency and undetectable thrombin generation in platelet-rich plasma. *J Thromb Haemost* **2011**, *9*, 959-968, doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04237.x.
101. Peyvandi, F.; Palla, R.; Menegatti, M.; Siboni, S.M.; Halimeh, S.; Faeser, B.; Pergantou, H.; Platokouki, H.; Giangrande, P.; Peerlinck, K., 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*, 615-621, doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04653.x.
102. Mann, K.G. How much factor V is enough? *Thromb Haemost* **2000**, *83*, 3-4.
103. Lunghi, B.; Pinotti, M.; Maestri, I.; Batorova, A.; Bernardi, F. Evaluation of factor V mRNA to define the residual factor V expression levels in severe factor V deficiency. *Haematologica* **2008**, *93*, 477-478, doi:10.3324/haematol.11952.
104. Naderi, M.; Tabibian, S.; Alizadeh, S.; Hosseini, S.; Zaker, F.; Bamedi, T.; Shamsizadeh, M.; Dorgalaleh, A. Congenital factor V deficiency: comparison of the severity of clinical presentations among patients with rare bleeding disorders. *Acta Haematol* **2015**, *133*, 148-154, doi:10.1159/000363598.
105. Uprichard, J.; Perry, D.J. Factor X deficiency. *Blood Rev* **2002**, *16*, 97-110, doi:10.1054/blre.2002.0191.

106. Stanton, C.; Wallin, R. Processing and trafficking of clotting factor X in the secretory pathway. Effects of warfarin. *Biochem J* **1992**, *284* (Pt 1), 25-31, doi:10.1042/bj2840025.
107. Titani, K.; Hermodson, M.A.; Fujikawa, K.; Ericsson, L.H.; Walsh, K.A.; Neurath, H.; Davie, E.W. Bovine factor X 1a (activated Stuart factor). Evidence of homology with mammalian serine proteases. *Biochemistry* **1972**, *11*, 4899-4903, doi:10.1021/bi00776a004.
108. Di Scipio, R.G.; Hermodson, M.A.; Yates, S.G.; Davie, E.W. A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S. *Biochemistry* **1977**, *16*, 698-706, doi:10.1021/bi00623a022.
109. McMullen, B.A.; Fujikawa, K.; Kisiel, W.; Sasagawa, T.; Howald, W.N.; Kwa, E.Y.; Weinstein, B. Complete amino acid sequence of the light chain of human blood coagulation factor X: evidence for identification of residue 63 as beta-hydroxyaspartic acid. *Biochemistry* **1983**, *22*, 2875-2884, doi:10.1021/bi00281a016.
110. Leytus, S.P.; Chung, D.W.; Kisiel, W.; Kurachi, K.; Davie, E.W. Characterization of a cDNA coding for human factor X. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1984**, *81*, 3699-3702, doi:10.1073/pnas.81.12.3699.
111. Leytus, S.P.; Foster, D.C.; Kurachi, K.; Davie, E.W. Gene for human factor X: a blood coagulation factor whose gene organization is essentially identical with that of factor IX and protein C. *Biochemistry* **1986**, *25*, 5098-5102, doi:10.1021/bi00366a018.
112. Fung, M.R.; Campbell, R.M.; MacGillivray, R.T. Blood coagulation factor X mRNA encodes a single polypeptide chain containing a prepro leader sequence. *Nucleic Acids Res* **1984**, *12*, 4481-4492, doi:10.1093/nar/12.11.4481.
113. Padmanabhan, K.; Padmanabhan, K.P.; Tulinsky, A.; Park, C.H.; Bode, W.; Huber, R.; Blankenship, D.T.; Cardin, A.D.; Kisiel, W. Structure of human des(1-45) factor Xa at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol* **1993**, *232*, 947-966, doi:10.1006/jmbi.1993.1441.
114. Camire, R.M. Blood coagulation factor X: molecular biology, inherited disease, and engineered therapeutics. *J Thromb Thrombolysis* **2021**, *52*, 383-390, doi:10.1007/s11239-021-02456-w.
115. Menegatti, M.; Peyvandi, F. Factor X deficiency. *Semin Thromb Hemost* **2009**, *35*, 407-415, doi:10.1055/s-0029-1225763.
116. Peyvandi, F.; Menegatti, M.; Palla, R. Rare bleeding disorders: worldwide efforts for classification, diagnosis, and management. *Semin Thromb Hemost* **2013**, *39*, 579-584, doi:10.1055/s-0033-1349221.
117. Peyvandi, F.; Di Michele, D.; Bolton-Maggs, P.H.; Lee, C.A.; Tripodi, A.; Srivastava, A.; Project on Consensus Definitions in Rare Bleeding Disorders of the Factor, V.F.I.X.S.; Standardisation Committee of the International Society on, T.; Haemostasis. Classification of rare bleeding disorders (RBDs) based on the association between coagulant factor activity and clinical bleeding severity. *J Thromb Haemost* **2012**, *10*, 1938-1943, doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04844.x.
118. Brown, D.L.; Kouides, P.A. Diagnosis and treatment of inherited factor X deficiency. *Haemophilia* **2008**, *14*, 1176-1182, doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01856.x.
119. Herrmann, F.H.; Auerswald, G.; Ruiz-Saez, A.; Navarrete, M.; Pollmann, H.; Lopaciuk, S.; Batorova, A.; Wulff, K.; Greifswald Factor, X.D.S.G. Factor X deficiency: clinical manifestation of 102 subjects from Europe and Latin

- America with mutations in the factor 10 gene. *Haemophilia* **2006**, *12*, 479-489, doi:10.1111/j.1365-2516.2006.01303.x.
120. Peyvandi, F.; Mannucci, P.M.; Lak, M.; Abdoullahi, M.; Zeinali, S.; Sharifian, R.; Perry, D. Congenital factor X deficiency: spectrum of bleeding symptoms in 32 Iranian patients. *Br J Haematol* **1998**, *102*, 626-628, doi:10.1046/j.1365-2141.1998.00806.x.
121. Girolami, A.; Cosi, E.; Santarossa, C.; Ferrari, S.; Girolami, B.; Lombardi, A.M. Prevalence of bleeding manifestations in 128 heterozygotes for Factor X deficiency, mainly for FX Friuli, matched versus 128 unaffected family members, during a long sequential observation period (23.5 years). *Eur J Haematol* **2016**, *97*, 547-553, doi:10.1111/ejh.12767.
122. Peyvandi, F.; Auerswald, G.; Austin, S.K.; Liesner, R.; Kavakli, K.; Alvarez Roman, M.T.; Millar, C.M. Diagnosis, therapeutic advances, and key recommendations for the management of factor X deficiency. *Blood Rev* **2021**, *50*, 100833, doi:10.1016/j.blre.2021.100833.
123. Mumford, A.D.; Ackroyd, S.; Alikhan, R.; Bowles, L.; Chowdary, P.; Grainger, J.; Mainwaring, J.; Mathias, M.; O'Connell, N.; Committee, B. Guideline for the diagnosis and management of the rare coagulation disorders: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization guideline on behalf of the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* **2014**, *167*, 304-326, doi:10.1111/bjh.13058.
124. Girolami, A.; Scarparo, P.; Vettore, S.; Candeo, N.; Scandellari, R.; Lombardi, A.M. Unexplained discrepancies in the activity--antigen ratio in congenital FX deficiencies with defects in the catalytic domain. *Clin Appl Thromb Hemost* **2009**, *15*, 621-627, doi:10.1177/1076029609343447.
125. Watzke, H.H.; Wallmark, A.; Hamaguchi, N.; Giardina, P.; Stafford, D.W.; High, K.A. Factor XSanto Domingo. Evidence that the severe clinical phenotype arises from a mutation blocking secretion. *J Clin Invest* **1991**, *88*, 1685-1689, doi:10.1172/JCI115484.
126. Cooper, D.N.; Millar, D.S.; Wacey, A.; Pemberton, S.; Tuddenham, E.G. Inherited factor X deficiency: molecular genetics and pathophysiology. *Thromb Haemost* **1997**, *78*, 161-172.
127. James, A.H.; Eikenboom, J.; Federici, A.B. State of the art: von Willebrand disease. *Haemophilia* **2016**, *22 Suppl 5*, 54-59, doi:10.1111/hae.12984.
128. Zhou, Y.F.; Eng, E.T.; Zhu, J.; Lu, C.; Walz, T.; Springer, T.A. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood* **2012**, *120*, 449-458, doi:10.1182/blood-2012-01-405134.
129. Sadler, J.E. von Willebrand factor assembly and secretion. *J Thromb Haemost* **2009**, *7 Suppl 1*, 24-27, doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03375.x.
130. Purvis, A.R.; Sadler, J.E. A covalent oxidoreductase intermediate in propeptide-dependent von Willebrand factor multimerization. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 49982-49988, doi:10.1074/jbc.M408727200.
131. Mazurier, C.; Ribba, A.S.; Gaucher, C.; Meyer, D. Molecular genetics of von Willebrand disease. *Ann Genet* **1998**, *41*, 34-43.
132. Sadler, J.E. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* **1998**, *67*, 395-424, doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.395.
133. Ruggeri, Z.M. Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation. *Best Pract Res Clin Haematol* **2001**, *14*, 257-279, doi:10.1053/beh.2001.0133.

134. Zander, C.B.; Cao, W.; Zheng, X.L. ADAMTS13 and von Willebrand factor interactions. *Curr Opin Hematol* **2015**, *22*, 452-459, doi:10.1097/MOH.0000000000000169.
135. Tsai, H.M.; Sussman, II; Nagel, R.L. Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma. *Blood* **1994**, *83*, 2171-2179.
136. Furlan, M.; Robles, R.; Lammle, B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* **1996**, *87*, 4223-4234.
137. Tsai, H.M. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* **1996**, *87*, 4235-4244.
138. Fujikawa, K.; Suzuki, H.; McMullen, B.; Chung, D. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood* **2001**, *98*, 1662-1666, doi:10.1182/blood.v98.6.1662.
139. Terraube, V.; O'Donnell, J.S.; Jenkins, P.V. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia* **2010**, *16*, 3-13, doi:10.1111/j.1365-2516.2009.02005.x.
140. Castaman, G. How I treat von Willebrand disease. *Thromb Res* **2020**, *196*, 618-625, doi:10.1016/j.thromres.2020.07.051.
141. Moser, M.M.; Schoergenhofer, C.; Jilma, B. Progress in von Willebrand Disease Treatment: Evolution towards Newer Therapies. *Semin Thromb Hemost* **2024**, *50*, 720-732, doi:10.1055/s-0044-1779485.
142. Sadler, J.E.; Mannucci, P.M.; Berntorp, E.; Bochkov, N.; Boulyjenkov, V.; Ginsburg, D.; Meyer, D.; Peake, I.; Rodeghiero, F.; Srivastava, A. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* **2000**, *84*, 160-174.
143. Itzhar-Baikian, N.; Boisseau, P.; Joly, B.; Veyradier, A. Updated overview on von Willebrand disease: focus on the interest of genotyping. *Expert Rev Hematol* **2019**, *12*, 1023-1036, doi:10.1080/17474086.2019.1670638.
144. James, P.; Leebeek, F.; Casari, C.; Lillicrap, D. Diagnosis and treatment of von Willebrand disease in 2024 and beyond. *Haemophilia* **2024**, *30 Suppl 3*, 103-111, doi:10.1111/hae.14970.
145. Kontogiannis, A.; Matsas, A.; Valsami, S.; Livanou, M.E.; Panoskaltsis, T.; Christopoulos, P. Primary Hemostasis Disorders as a Cause of Heavy Menstrual Bleeding in Women of Reproductive Age. *J Clin Med* **2023**, *12*, doi:10.3390/jcm12175702.
146. Verweij, C.L.; Diergaarde, P.J.; Hart, M.; Pannekoek, H. Full-length von Willebrand factor (vWF) cDNA encodes a highly repetitive protein considerably larger than the mature vWF subunit. *EMBO J* **1986**, *5*, 1839-1847.
147. Ginsburg, D.; Sadler, J.E. von Willebrand disease: a database of point mutations, insertions, and deletions. For the Consortium on von Willebrand Factor Mutations and Polymorphisms, and the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* **1993**, *69*, 177-184.
148. Sadler, J.E.; Ginsburg, D. A database of polymorphisms in the von Willebrand factor gene and pseudogene. For the Consortium on von Willebrand Factor Mutations and Polymorphisms and the Subcommittee on von Willebrand Factor

- of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* **1993**, *69*, 185-191.
149. James, P.D.; Notley, C.; Hegadorn, C.; Leggo, J.; Tuttle, A.; Tinlin, S.; Brown, C.; Andrews, C.; Labelle, A.; Chirinian, Y., et al. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study. *Blood* **2007**, *109*, 145-154, doi:10.1182/blood-2006-05-021105.
150. Cumming, A.; Grundy, P.; Keeney, S.; Lester, W.; Enayat, S.; Guiliatt, A.; Bowen, D.; Pasi, J.; Keeling, D.; Hill, F., et al. An investigation of the von Willebrand factor genotype in UK patients diagnosed to have type 1 von Willebrand disease. *Thromb Haemost* **2006**, *96*, 630-641.
151. Eikenboom, J.C. Congenital von Willebrand disease type 3: clinical manifestations, pathophysiology and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol* **2001**, *14*, 365-379, doi:10.1053/beh.2001.0139.
152. Castaman, G.; Rodeghiero, F.; Tosetto, A.; Cappelletti, A.; Baudo, F.; Eikenboom, J.C.; Federici, A.B.; Lethagen, S.; Linari, S.; Lusher, J., et al. Hemorrhagic symptoms and bleeding risk in obligatory carriers of type 3 von Willebrand disease: an international, multicenter study. *J Thromb Haemost* **2006**, *4*, 2164-2169, doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02070.x.
153. Tosetto, A.; Rodeghiero, F.; Castaman, G.; Bernardi, M.; Bertonecello, K.; Goodeve, A.; Federici, A.B.; Batlle, J.; Meyer, D.; Mazurier, C., et al. Impact of plasma von Willebrand factor levels in the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1VWD). *J Thromb Haemost* **2007**, *5*, 715-721, doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02444.x.
154. Castaman, G.; Tosetto, A.; Goodeve, A.; Federici, A.B.; Lethagen, S.; Budde, U.; Batlle, J.; Meyer, D.; Mazurier, C.; Goudemand, J., et al. The impact of bleeding history, von Willebrand factor and PFA-100((R)) on the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: results from the European study MCMDM-1VWD. *Br J Haematol* **2010**, *151*, 245-251, doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08333.x.
155. Brehm, M.A.; Huck, V.; Aponte-Santamaria, C.; Obser, T.; Grassle, S.; Oyen, F.; Budde, U.; Schneppenheim, S.; Baldauf, C.; Grater, F., et al. von Willebrand disease type 2A phenotypes IIC, IID and IIE: A day in the life of shear-stressed mutant von Willebrand factor. *Thromb Haemost* **2014**, *112*, 96-108, doi:10.1160/TH13-11-0902.
156. Vangenechten, I.; Gadisseur, A. Improving diagnosis of von Willebrand disease: Reference ranges for von Willebrand factor multimer distribution. *Res Pract Thromb Haemost* **2020**, *4*, 1024-1034, doi:10.1002/rth2.12408.
157. Saadalla, A.; Seheult, J.; Pruthi, R.K.; Chen, D. Von Willebrand Factor Multimer Analysis and Classification: A Comprehensive Review and Updates. *Semin Thromb Hemost* **2023**, *49*, 580-591, doi:10.1055/s-0042-1757183.
158. Kruse-Jarres, R.; Johnsen, J.M. How I treat type 2B von Willebrand disease. *Blood* **2018**, *131*, 1292-1300, doi:10.1182/blood-2017-06-742692.
159. Favaloro, E.J. Rare forms of von Willebrand disease. *Ann Transl Med* **2018**, *6*, 345, doi:10.21037/atm.2018.09.10.
160. Riddell, A.F.; Gomez, K.; Millar, C.M.; Mellars, G.; Gill, S.; Brown, S.A.; Sutherland, M.; Laffan, M.A.; McKinnon, T.A. Characterization of W1745C and S1783A: 2 novel mutations causing defective collagen binding in the A3 domain of von Willebrand factor. *Blood* **2009**, *114*, 3489-3496, doi:10.1182/blood-2008-10-184317.

161. Schneppenheim, R.; Federici, A.B.; Budde, U.; Castaman, G.; Drewke, E.; Krey, S.; Mannucci, P.M.; Riesen, G.; Rodeghiero, F.; Zieger, B., et al. Von Willebrand Disease type 2M "Vicenza" in Italian and German patients: identification of the first candidate mutation (G3864A; R1205H) in 8 families. *Thromb Haemost* **2000**, *83*, 136-140.
162. Seidizadeh, O.; Peyvandi, F.; Mannucci, P.M. Von Willebrand disease type 2N: An update. *J Thromb Haemost* **2021**, *19*, 909-916, doi:10.1111/jth.15247.
163. Casonato, A.; Galletta, E.; Sarolo, L.; Daidone, V. Type 2N von Willebrand disease: Characterization and diagnostic difficulties. *Haemophilia* **2018**, *24*, 134-140, doi:10.1111/hae.13366.
164. Baronciani, L.; Peyvandi, F. How we make an accurate diagnosis of von Willebrand disease. *Thromb Res* **2020**, *196*, 579-589, doi:10.1016/j.thromres.2019.07.010.
165. Favalaro, E.J.; Pasalic, L. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease in the age of the new guidelines: considerations based on geography and resources. *Res Pract Thromb Haemost* **2023**, *7*, 102143, doi:10.1016/j.rpth.2023.102143.
166. Colonne, C.K.; Reardon, B.; Curnow, J.; Favalaro, E.J. Why is Misdiagnosis of von Willebrand Disease Still Prevalent and How Can We Overcome It? A Focus on Clinical Considerations and Recommendations. *J Blood Med* **2021**, *12*, 755-768, doi:10.2147/JBM.S266791.
167. Favalaro, E.J. Navigating the Myriad of von Willebrand Factor Assays. *Hamostaseologie* **2020**, *40*, 431-442, doi:10.1055/s-0040-1713735.
168. Sharma, R.; Haberichter, S.L. New advances in the diagnosis of von Willebrand disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2019**, *2019*, 596-600, doi:10.1182/hematology.2019000064.
169. Keesler, D.A.; Flood, V.H. Current issues in diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Res Pract Thromb Haemost* **2018**, *2*, 34-41, doi:10.1002/rth2.12064.
170. Montgomery, R.R.; Flood, V.H. What have we learned from large population studies of von Willebrand disease? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2016**, *2016*, 670-677, doi:10.1182/asheducation-2016.1.670.
171. Favalaro, E.J.; Pasalic, L.; Lippi, G. Towards 50 years of platelet function analyser (PFA) testing. *Clin Chem Lab Med* **2023**, *61*, 851-860, doi:10.1515/cclm-2022-0666.
172. Harris, N.S.; Pelletier, J.P.; Marin, M.J.; Winter, W.E. Von Willebrand factor and disease: a review for laboratory professionals. *Crit Rev Clin Lab Sci* **2022**, *59*, 241-256, doi:10.1080/10408363.2021.2014781.
173. Higgins, R.A.; Goodwin, A.J. Automated assays for von Willebrand factor activity. *Am J Hematol* **2019**, *94*, 496-503, doi:10.1002/ajh.25393.
174. Favalaro, E.J. Utility of the von Willebrand factor collagen binding assay in the diagnosis of von Willebrand disease. *Am J Hematol* **2017**, *92*, 114-118, doi:10.1002/ajh.24556.
175. Michiels, J.J.; Smejkal, P.; Penka, M.; Batorova, A.; Pricangova, T.; Budde, U.; Vangenechten, I.; Gadisseur, A. Diagnostic Differentiation of von Willebrand Disease Types 1 and 2 by von Willebrand Factor Multimer Analysis and DDAVP Challenge Test. *Clin Appl Thromb Hemost* **2017**, *23*, 518-531, doi:10.1177/1076029616647157.
176. Batlle, J.; Perez-Rodriguez, A.; Corrales, I.; Borrás, N.; Costa Pinto, J.; Lopez-Fernandez, M.F.; Vidal, F.; Team, P.-E.-E.I. Update on Molecular Testing in

- von Willebrand Disease. *Semin Thromb Hemost* **2019**, *45*, 708-719, doi:10.1055/s-0039-1679922.
177. Favalaro, E.J.; Mohammed, S.; Lippi, G. Postanalytical considerations that may improve the diagnosis or exclusion of haemophilia and von Willebrand disease. *Haemophilia* **2018**, *24*, 849-861, doi:10.1111/hae.13587.
178. Acharya, S.S.; Dimichele, D.M. Rare inherited disorders of fibrinogen. *Haemophilia* **2008**, *14*, 1151-1158, doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01831.x.
179. Haverkate, F.; Samama, M. Familial dysfibrinogenemia and thrombophilia. Report on a study of the SSC Subcommittee on Fibrinogen. *Thromb Haemost* **1995**, *73*, 151-161.
180. Casini, A.; Undas, A.; Palla, R.; Thachil, J.; de Moerloose, P.; Subcommittee on Factor, X.; Fibrinogen. Diagnosis and classification of congenital fibrinogen disorders: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* **2018**, *16*, 1887-1890, doi:10.1111/jth.14216.
181. Mackie, I.J.; Kitchen, S.; Machin, S.J.; Lowe, G.D.; Haemostasis; Thrombosis Task Force of the British Committee for Standards in, H. Guidelines on fibrinogen assays. *Br J Haematol* **2003**, *121*, 396-404, doi:10.1046/j.1365-2141.2003.04256.x.
182. Peyvandi, F.; Haertel, S.; Knaub, S.; Mannucci, P.M. Incidence of bleeding symptoms in 100 patients with inherited afibrinogenemia or hypofibrinogenemia. *J Thromb Haemost* **2006**, *4*, 1634-1637, doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02014.x.
183. Casini, A.; Blondon, M.; Lebreton, A.; Koegel, J.; Tintillier, V.; de Maistre, E.; Gautier, P.; Biron, C.; Neerman-Arbez, M.; de Moerloose, P. Natural history of patients with congenital dysfibrinogenemia. *Blood* **2015**, *125*, 553-561, doi:10.1182/blood-2014-06-582866.
184. Casini, A.; Brungs, T.; Lavenu-Bombled, C.; Vilar, R.; Neerman-Arbez, M.; de Moerloose, P. Genetics, diagnosis and clinical features of congenital hypodysfibrinogenemia: a systematic literature review and report of a novel mutation. *J Thromb Haemost* **2017**, *15*, 876-888, doi:10.1111/jth.13655.
185. de Moerloose, P.; Casini, A.; Neerman-Arbez, M. Congenital fibrinogen disorders: an update. *Semin Thromb Hemost* **2013**, *39*, 585-595, doi:10.1055/s-0033-1349222.
186. Krammer, B.; Anders, O.; Nagel, H.R.; Burstein, C.; Steiner, M. Screening of dysfibrinogenaemia using the fibrinogen function versus antigen concentration ratio. *Thromb Res* **1994**, *76*, 577-579, doi:10.1016/0049-3848(94)90287-9.
187. Paraboschi, E.M.; Duga, S.; Asselta, R. Fibrinogen as a Pleiotropic Protein Causing Human Diseases: The Mutational Burden of Aalpha, Bbeta, and gamma Chains. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, doi:10.3390/ijms18122711.
188. Casini, A.; de Moerloose, P.; Congenital Fibrinogen Disorders, G. Management of congenital quantitative fibrinogen disorders: a Delphi consensus. *Haemophilia* **2016**, *22*, 898-905, doi:10.1111/hae.13061.
189. Casini, A.; Neerman-Arbez, M.; Ariens, R.A.; de Moerloose, P. Dysfibrinogenemia: from molecular anomalies to clinical manifestations and management. *J Thromb Haemost* **2015**, *13*, 909-919, doi:10.1111/jth.12916.
190. Tiscia, G.L.; Margaglione, M. Human Fibrinogen: Molecular and Genetic Aspects of Congenital Disorders. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19061597.

191. Casini, A.; de Moerloose, P. Can the phenotype of inherited fibrinogen disorders be predicted? *Haemophilia* **2016**, *22*, 667-675, doi:10.1111/hae.12967.
192. McDonald, J.; Bayrak-Toydemir, P.; Pyeritz, R.E. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an overview of diagnosis, management, and pathogenesis. *Genet Med* **2011**, *13*, 607-616, doi:10.1097/GIM.0b013e3182136d32.
193. Dakeishi, M.; Shioya, T.; Wada, Y.; Shindo, T.; Otaka, K.; Manabe, M.; Nozaki, J.; Inoue, S.; Koizumi, A. Genetic epidemiology of hereditary hemorrhagic telangiectasia in a local community in the northern part of Japan. *Hum Mutat* **2002**, *19*, 140-148, doi:10.1002/humu.10026.
194. Pierucci, P.; Lenato, G.M.; Suppressa, P.; Lastella, P.; Triggiani, V.; Valerio, R.; Comelli, M.; Salvante, D.; Stella, A.; Resta, N., et al. A long diagnostic delay in patients with Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia: a questionnaire-based retrospective study. *Orphanet J Rare Dis* **2012**, *7*, 33, doi:10.1186/1750-1172-7-33.
195. Shovlin, C.L.; Guttmacher, A.E.; Buscarini, E.; Faughnan, M.E.; Hyland, R.H.; Westermann, C.J.; Kjeldsen, A.D.; Plauchu, H. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* **2000**, *91*, 66-67, doi:10.1002/(sici)1096-8628(20000306)91:1<66::aid-ajmg12>3.0.co;2-p.
196. van Gent, M.W.; Velthuis, S.; Post, M.C.; Snijder, R.J.; Westermann, C.J.; Letteboer, T.G.; Mager, J.J. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: how accurate are the clinical criteria? *Am J Med Genet A* **2013**, *161A*, 461-466, doi:10.1002/ajmg.a.35715.
197. Faughnan, M.E.; Palda, V.A.; Garcia-Tsao, G.; Geisthoff, U.W.; McDonald, J.; Proctor, D.D.; Spears, J.; Brown, D.H.; Buscarini, E.; Chesnutt, M.S., et al. International guidelines for the diagnosis and management of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* **2011**, *48*, 73-87, doi:10.1136/jmg.2009.069013.
198. Brinjikji, W.; Iyer, V.N.; Wood, C.P.; Lanzino, G. Prevalence and characteristics of brain arteriovenous malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: a systematic review and meta-analysis. *J Neurosurg* **2017**, *127*, 302-310, doi:10.3171/2016.7.JNS16847.
199. McDonald, M.T.; Papenberg, K.A.; Ghosh, S.; Glatfelter, A.A.; Biesecker, B.B.; Helmbold, E.A.; Markel, D.S.; Zolotor, A.; McKinnon, W.C.; Vanderstoep, J.L., et al. A disease locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q33-34. *Nat Genet* **1994**, *6*, 197-204, doi:10.1038/ng0294-197.
200. McDonald, J.; Wooderchak-Donahue, W.; VanSant Webb, C.; Whitehead, K.; Stevenson, D.A.; Bayrak-Toydemir, P. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: genetics and molecular diagnostics in a new era. *Front Genet* **2015**, *6*, 1, doi:10.3389/fgene.2015.00001.
201. Hernandez, F.; Huether, R.; Carter, L.; Johnston, T.; Thompson, J.; Gossage, J.R.; Chao, E.; Elliott, A.M. Mutations in RASA1 and GDF2 identified in patients with clinical features of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Genome Var* **2015**, *2*, 15040, doi:10.1038/hgv.2015.40.
202. Abdalla, S.A.; Letarte, M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet* **2006**, *43*, 97-110, doi:10.1136/jmg.2005.030833.

203. Wooderchak-Donahue, W.L.; McDonald, J.; O'Fallon, B.; Upton, P.D.; Li, W.; Roman, B.L.; Young, S.; Plant, P.; Fulop, G.T.; Langa, C., et al. BMP9 mutations cause a vascular-anomaly syndrome with phenotypic overlap with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet* **2013**, *93*, 530-537, doi:10.1016/j.ajhg.2013.07.004.
204. Revencu, N.; Boon, L.M.; Mendola, A.; Cordisco, M.R.; Dubois, J.; Clapuyt, P.; Hammer, F.; Amor, D.J.; Irvine, A.D.; Baselga, E., et al. RASA1 mutations and associated phenotypes in 68 families with capillary malformation-arteriovenous malformation. *Hum Mutat* **2013**, *34*, 1632-1641, doi:10.1002/humu.22431.
205. El Hajjam, M.; Mekki, A.; Palmyre, A.; Eyries, M.; Soubrier, F.; Bourgault Villada, I.; Ozanne, A.; Carlier, R.Y.; Chinet, T. RASA1 phenotype overlaps with hereditary haemorrhagic telangiectasia: two case reports. *J Med Genet* **2021**, *58*, 645-647, doi:10.1136/jmedgenet-2019-106792.
206. Faughnan, M.E.; Mager, J.J.; Hetts, S.W.; Palda, V.A.; Lang-Robertson, K.; Buscarini, E.; Deslandres, E.; Kasthuri, R.S.; Lausman, A.; Poetker, D., et al. Second International Guidelines for the Diagnosis and Management of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Ann Intern Med* **2020**, *173*, 989-1001, doi:10.7326/M20-1443.
207. Thompson, K.P.; Nelson, J.; Kim, H.; Pawlikowska, L.; Marchuk, D.A.; Lawton, M.T.; Faughnan, M.E.; Brain Vascular Malformation Consortium, H.H.T.I.G. Predictors of mortality in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Orphanet J Rare Dis* **2021**, *16*, 12, doi:10.1186/s13023-020-01579-2.
208. Shovlin, C.L.; Buscarini, E.; Sabba, C.; Mager, H.J.; Kjeldsen, A.D.; Pagella, F.; Sure, U.; Ugolini, S.; Topping, P.M.; Suppressa, P., et al. The European Rare Disease Network for HHT Frameworks for management of hereditary haemorrhagic telangiectasia in general and speciality care. *Eur J Med Genet* **2022**, *65*, 104370, doi:10.1016/j.ejmg.2021.104370.
209. Day, I.S.C.f.W.T. Thrombosis: a major contributor to the global disease burden. *J Thromb Haemost* **2014**, *12*, 1580-1590, doi:10.1111/jth.12698.
210. Pastori, D.; Cormaci, V.M.; Marucci, S.; Franchino, G.; Del Sole, F.; Capozza, A.; Fallarino, A.; Corso, C.; Valeriani, E.; Menichelli, D., et al. A Comprehensive Review of Risk Factors for Venous Thromboembolism: From Epidemiology to Pathophysiology. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms24043169.
211. Mannucci, P.M.; Franchini, M. Classic thrombophilic gene variants. *Thromb Haemost* **2015**, *114*, 885-889, doi:10.1160/TH15-02-0141.
212. Bertina, R.M.; Koeleman, B.P.; Koster, T.; Rosendaal, F.R.; Dirven, R.J.; de Ronde, H.; van der Velden, P.A.; Reitsma, P.H. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* **1994**, *369*, 64-67, doi:10.1038/369064a0.
213. Dahlback, B.; Carlsson, M.; Svensson, P.J. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90*, 1004-1008, doi:10.1073/pnas.90.3.1004.
214. Koster, T.; Rosendaal, F.R.; de Ronde, H.; Briet, E.; Vandenbroucke, J.P.; Bertina, R.M. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* **1993**, *342*, 1503-1506, doi:10.1016/s0140-6736(05)80081-9.

215. Poort, S.R.; Rosendaal, F.R.; Reitsma, P.H.; Bertina, R.M. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* **1996**, *88*, 3698-3703.
216. Di Minno, M.N.; Ambrosino, P.; Ageno, W.; Rosendaal, F.; Di Minno, G.; Dentali, F. Natural anticoagulants deficiency and the risk of venous thromboembolism: a meta-analysis of observational studies. *Thromb Res* **2015**, *135*, 923-932, doi:10.1016/j.thromres.2015.03.010.
217. Griffin, J.H.; Evatt, B.; Zimmerman, T.S.; Kleiss, A.J.; Wideman, C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* **1981**, *68*, 1370-1373, doi:10.1172/jci110385.
218. Egeberg, O. Inherited Antithrombin Deficiency Causing Thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* **1965**, *13*, 516-530.
219. ten Kate, M.K.; van der Meer, J. Protein S deficiency: a clinical perspective. *Haemophilia* **2008**, *14*, 1222-1228, doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01775.x.
220. van Boven, H.H.; Vandenbroucke, J.P.; Briet, E.; Rosendaal, F.R. Gene-gene and gene-environment interactions determine risk of thrombosis in families with inherited antithrombin deficiency. *Blood* **1999**, *94*, 2590-2594.
221. Gemmati, D.; Longo, G.; Franchini, E.; Araujo Silva, J.; Gallo, I.; Lunghi, B.; Moratelli, S.; Maestri, I.; Serino, M.L.; Tisato, V. Cis-Segregation of c.1171C>T Stop Codon (p.R391*) in SERPINC1 Gene and c.1691G>A Transition (p.R506Q) in F5 Gene and Selected GWAS Multilocus Approach in Inherited Thrombophilia. *Genes (Basel)* **2021**, *12*, doi:10.3390/genes12060934.
222. Campello, E.; Spiezia, L.; Adamo, A.; Simioni, P. Thrombophilia, risk factors and prevention. *Expert Rev Hematol* **2019**, *12*, 147-158, doi:10.1080/17474086.2019.1583555.
223. Croles, F.N.; Nasserinejad, K.; Duvekot, J.J.; Kruip, M.J.; Meijer, K.; Leebeek, F.W. Pregnancy, thrombophilia, and the risk of a first venous thrombosis: systematic review and bayesian meta-analysis. *BMJ* **2017**, *359*, j4452, doi:10.1136/bmj.j4452.
224. Barbati, M.E.; Avgerinos, E.D.; Baccellieri, D.; Doganci, S.; Lichtenberg, M.; Jalaie, H. Interventional treatment for post-thrombotic chronic venous obstruction: Progress and challenges. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord* **2024**, 10.1016/j.jvsv.2024.101910, 101910, doi:10.1016/j.jvsv.2024.101910.
225. Franchini, M. Utility of testing for factor V Leiden. *Blood Transfus* **2012**, *10*, 257-259, doi:10.2450/2012.0095-12.
226. Favaloro, E.J.; McDonald, D. Futility of testing for factor V Leiden. *Blood Transfus* **2012**, *10*, 260-263, doi:10.2450/2012.0097-12.
227. Favaloro, E.J. The futility of thrombophilia testing. *Clin Chem Lab Med* **2014**, *52*, 499-503, doi:10.1515/cclm-2013-0560.
228. Colucci, G.; Tsakiris, D.A. Thrombophilia Screening: Universal, Selected, or Neither? *Clin Appl Thromb Hemost* **2017**, *23*, 893-899, doi:10.1177/1076029616683803.
229. De Stefano, V.; Rossi, E. Testing for inherited thrombophilia and consequences for antithrombotic prophylaxis in patients with venous thromboembolism and their relatives. A review of the Guidelines from Scientific Societies and Working Groups. *Thromb Haemost* **2013**, *110*, 697-705, doi:10.1160/TH13-01-0011.

230. Heleen van Ommen, C.; Middeldorp, S. Thrombophilia in childhood: to test or not to test. *Semin Thromb Hemost* **2011**, *37*, 794-801, doi:10.1055/s-0031-1297170.
231. Middeldorp, S. Is thrombophilia testing useful? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2011**, *2011*, 150-155, doi:10.1182/asheducation-2011.1.150.
232. Middeldorp, S. Inherited thrombophilia: a double-edged sword. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2016**, *2016*, 1-9, doi:10.1182/asheducation-2016.1.1.
233. Franchini, M. The utility of thrombophilia testing. *Clin Chem Lab Med* **2014**, *52*, 495-497, doi:10.1515/cclm-2013-0559.
234. Dahlback, B. New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg506 to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* **1995**, *74*, 139-148.
235. Balogh, I.; Poka, R.; Losonczy, G.; Muszbek, L. High frequency of factor V Leiden mutation and prothrombin 20210A variant in Romanies of Eastern Hungary. *Thromb Haemost* **1999**, *82*, 1555-1556.
236. Balogh, I.; Poka, R.; Pfliegler, G.; Dekany, M.; Boda, Z.; Muszbek, L. High prevalence of factor V Leiden mutation and 20210A prothrombin variant in Hungary. *Thromb Haemost* **1999**, *81*, 660-661.
237. Favaloro, E.J.; McDonald, D.; Lippi, G. Laboratory investigation of thrombophilia: the good, the bad, and the ugly. *Semin Thromb Hemost* **2009**, *35*, 695-710, doi:10.1055/s-0029-1242723.
238. Baglin, T.; Gray, E.; Greaves, M.; Hunt, B.J.; Keeling, D.; Machin, S.; Mackie, I.; Makris, M.; Nokes, T.; Perry, D., et al. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia. *Br J Haematol* **2010**, *149*, 209-220, doi:10.1111/j.1365-2141.2009.08022.x.
239. Moll, S. Thrombophilia: clinical-practical aspects. *J Thromb Thrombolysis* **2015**, *39*, 367-378, doi:10.1007/s11239-015-1197-3.
240. Pruthi, R.K. Optimal utilization of thrombophilia testing. *Int J Lab Hematol* **2017**, *39 Suppl 1*, 104-110, doi:10.1111/ijlh.12672.
241. Moore, G.W. Thrombophilia Screening: Not So Straightforward. *Semin Thromb Hemost* **2024**, 10.1055/s-0044-1786807, doi:10.1055/s-0044-1786807.
242. Middeldorp, S.; Nieuwlaat, R.; Baumann Kreuziger, L.; Coppens, M.; Houghton, D.; James, A.H.; Lang, E.; Moll, S.; Myers, T.; Bhatt, M., et al. American Society of Hematology 2023 guidelines for management of venous thromboembolism: thrombophilia testing. *Blood Adv* **2023**, *7*, 7101-7138, doi:10.1182/bloodadvances.2023010177.
243. Stevens, S.M.; Woller, S.C.; Bauer, K.A.; Kasthuri, R.; Cushman, M.; Streiff, M.; Lim, W.; Douketis, J.D. Guidance for the evaluation and treatment of hereditary and acquired thrombophilia. *J Thromb Thrombolysis* **2016**, *41*, 154-164, doi:10.1007/s11239-015-1316-1.
244. Pabinger, I.; Thaler, J. How I treat patients with hereditary antithrombin deficiency. *Blood* **2019**, *134*, 2346-2353, doi:10.1182/blood.2019002927.
245. Van Cott, E.M.; Orlando, C.; Moore, G.W.; Cooper, P.C.; Meijer, P.; Marlar, R.; Subcommittee on Plasma Coagulation, I. Recommendations for clinical laboratory testing for antithrombin deficiency; Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* **2020**, *18*, 17-22, doi:10.1111/jth.14648.
246. Cooper, P.C.; Pavlova, A.; Moore, G.W.; Hickey, K.P.; Marlar, R.A. Recommendations for clinical laboratory testing for protein C deficiency, for

- the subcommittee on plasma coagulation inhibitors of the ISTH. *J Thromb Haemost* **2020**, *18*, 271-277, doi:10.1111/jth.14667.
247. Marlar, R.A.; Gausman, J.N.; Tsuda, H.; Rollins-Raval, M.A.; Brinkman, H.J.M. Recommendations for clinical laboratory testing for protein S deficiency: Communication from the SSC committee plasma coagulation inhibitors of the ISTH. *J Thromb Haemost* **2021**, *19*, 68-74, doi:10.1111/jth.15109.
 248. Moore, G.W.; Van Cott, E.M.; Cutler, J.A.; Mitchell, M.J.; Adcock, D.M.; subcommittee on plasma coagulation, i. Recommendations for clinical laboratory testing of activated protein C resistance; communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* **2019**, *17*, 1555-1561, doi:10.1111/jth.14532.
 249. Moore, G.W.; Castoldi, E.; Teruya, J.; Morishita, E.; Adcock, D.M. Factor V Leiden-independent activated protein C resistance: Communication from the plasma coagulation inhibitors subcommittee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis Scientific and Standardisation Committee. *J Thromb Haemost* **2023**, *21*, 164-174, doi:10.1016/j.jtha.2022.10.014.
 250. Szilagyi, S.; Peter, A.; Magyar, M.T.; 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* **2012**, *34*, 276-279, doi:10.1097/MPH.0b013e3182331ecd.
 251. Favaloro, E.J.; Gosselin, R.C.; Pasalic, L.; Lippi, G. Post-analytical Issues in Hemostasis and Thrombosis Testing: An Update. *Methods Mol Biol* **2023**, *2663*, 787-811, doi:10.1007/978-1-0716-3175-1_53.
 252. Muszbek, L.; Bereczky, Z.; Kovacs, B.; Komaromi, I. Antithrombin deficiency and its laboratory diagnosis. *Clin Chem Lab Med* **2010**, *48 Suppl 1*, S67-78, doi:10.1515/CCLM.2010.368.
 253. Law, R.H.; Zhang, Q.; McGowan, S.; Buckle, A.M.; Silverman, G.A.; Wong, W.; Rosado, C.J.; Langendorf, C.G.; Pike, R.N.; Bird, P.I., et al. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol* **2006**, *7*, 216, doi:10.1186/gb-2006-7-5-216.
 254. Swedenborg, J. The mechanisms of action of alpha- and beta-isoforms of antithrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis* **1998**, *9 Suppl 3*, S7-10.
 255. Hernandez-Espinosa, D.; Ordonez, A.; Vicente, V.; Corral, J. Factors with conformational effects on haemostatic serpins: implications in thrombosis. *Thromb Haemost* **2007**, *98*, 557-563.
 256. Kottke-Marchant, K.; Duncan, A. Antithrombin deficiency: issues in laboratory diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* **2002**, *126*, 1326-1336, doi:10.5858/2002-126-1326-AD.
 257. Huntington, J.A. Shape-shifting serpins--advantages of a mobile mechanism. *Trends Biochem Sci* **2006**, *31*, 427-435, doi:10.1016/j.tibs.2006.06.005.
 258. Silverman, G.A.; Bird, P.I.; Carrell, R.W.; Church, F.C.; Coughlin, P.B.; Gettins, P.G.; Irving, J.A.; Lomas, D.A.; Luke, C.J.; Moyer, R.W., et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 33293-33296, doi:10.1074/jbc.R100016200.
 259. Bjork, I.; Jackson, C.M.; Jornvall, H.; Lavine, K.K.; Nordling, K.; Salsgiver, W.J. The active site of antithrombin. Release of the same proteolytically cleaved

- form of the inhibitor from complexes with factor IXa, factor Xa, and thrombin. *J Biol Chem* **1982**, 257, 2406-2411.
260. Johnson, D.J.; Li, W.; Adams, T.E.; Huntington, J.A. Antithrombin-S195A factor Xa-heparin structure reveals the allosteric mechanism of antithrombin activation. *EMBO J* **2006**, 25, 2029-2037, doi:10.1038/sj.emboj.7601089.
261. Liu, J.; Pedersen, L.C. Anticoagulant heparan sulfate: structural specificity and biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **2007**, 74, 263-272, doi:10.1007/s00253-006-0722-x.
262. Li, W.; Johnson, D.J.; Esmon, C.T.; Huntington, J.A. Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nat Struct Mol Biol* **2004**, 11, 857-862, doi:10.1038/nsmb811.
263. Lindhout, T.; Baruch, D.; Schoen, P.; Franssen, J.; Hemker, H.C. Thrombin generation and inactivation in the presence of antithrombin III and heparin. *Biochemistry* **1986**, 25, 5962-5969, doi:10.1021/bi00368a019.
264. Rezaie, A.R.; Giri, H. Anticoagulant and signaling functions of antithrombin. *J Thromb Haemost* **2020**, 18, 3142-3153, doi:10.1111/jth.15052.
265. Broze, G.J., Jr.; Likert, K.; Higuchi, D. Inhibition of factor VIIa/tissue factor by antithrombin III and tissue factor pathway inhibitor. *Blood* **1993**, 82, 1679-1681.
266. Opal, S.M.; Kessler, C.M.; Roemisch, J.; Knaub, S. Antithrombin, heparin, and heparan sulfate. *Crit Care Med* **2002**, 30, S325-331, doi:10.1097/00003246-200205001-00024.
267. Teitel, J.M.; Rosenberg, R.D. Protection of factor Xa from neutralization by the heparin-antithrombin complex. *J Clin Invest* **1983**, 71, 1383-1391, doi:10.1172/jci110891.
268. Kounnas, M.Z.; Church, F.C.; Argaves, W.S.; Strickland, D.K. Cellular internalization and degradation of antithrombin III-thrombin, heparin cofactor II-thrombin, and alpha 1-antitrypsin-trypsin complexes is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* **1996**, 271, 6523-6529, doi:10.1074/jbc.271.11.6523.
269. Schlommer, C.; Brandtner, A.; Bachler, M. Antithrombin and Its Role in Host Defense and Inflammation. *Int J Mol Sci* **2021**, 22, doi:10.3390/ijms22084283.
270. Levy, J.H.; Snieciński, R.M.; Welsby, I.J.; Levi, M. Antithrombin: anti-inflammatory properties and clinical applications. *Thromb Haemost* **2016**, 115, 712-728, doi:10.1160/TH15-08-0687.
271. O'Reilly, M.S. Antiangiogenic antithrombin. *Semin Thromb Hemost* **2007**, 33, 660-666, doi:10.1055/s-2007-991533.
272. Olds, R.J.; Lane, D.A.; Chowdhury, V.; De Stefano, V.; Leone, G.; Thein, S.L. Complete nucleotide sequence of the antithrombin gene: evidence for homologous recombination causing thrombophilia. *Biochemistry* **1993**, 32, 4216-4224, doi:10.1021/bi00067a008.
273. Bock, S.C.; Harris, J.F.; Balazs, I.; Trent, J.M. Assignment of the human antithrombin III structural gene to chromosome 1q23-25. *Cytogenet Cell Genet* **1985**, 39, 67-69, doi:10.1159/000132105.
274. Olds, R.J.; Lane, D.A.; Chowdhury, V.; Sas, G.; Pabinger, I.; Auburger, K.; Thein, S.L. (ATT) trinucleotide repeats in the antithrombin gene and their use in determining the origin of repeated mutations. *Hum Mutat* **1994**, 4, 31-41, doi:10.1002/humu.1380040105.

275. Sas, G.; Blasko, G.; Banhegyi, D.; Jako, J.; Palos, L.A. Abnormal antithrombin III (antithrombin III "Budapest") as a cause of a familial thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* **1974**, *32*, 105-115.
276. Lane, D.A.; Bayston, T.; Olds, R.J.; Fitches, A.C.; Cooper, D.N.; Millar, D.S.; Jochmans, K.; Perry, D.J.; Okajima, K.; Thein, S.L., et al. Antithrombin mutation database: 2nd (1997) update. For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* **1997**, *77*, 197-211.
277. Patnaik, M.M.; Moll, S. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia* **2008**, *14*, 1229-1239, doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01830.x.
278. Bravo-Perez, C.; de la Morena-Barrio, M.E.; Vicente, V.; Corral, J. Antithrombin deficiency as a still underdiagnosed thrombophilia: a primer for internists. *Pol Arch Intern Med* **2020**, *130*, 868-877, doi:10.20452/pamw.15371.
279. Corral, J.; de la Morena-Barrio, M.E.; Vicente, V. The genetics of antithrombin. *Thromb Res* **2018**, *169*, 23-29, doi:10.1016/j.thromres.2018.07.008.
280. Picard, V.; Chen, J.M.; Tardy, B.; Aillaud, M.F.; Boiteux-Vergnes, C.; Dreyfus, M.; Emmerich, J.; Lavenu-Bombled, C.; Nowak-Gottl, U.; Trillot, N., et al. Detection and characterisation of large SERPINC1 deletions in type I inherited antithrombin deficiency. *Hum Genet* **2010**, *127*, 45-53, doi:10.1007/s00439-009-0742-6.
281. Blajchman, M.A.; Fernandez-Rachubinski, F.; Sheffield, W.P.; Austin, R.C.; Schulman, S. Antithrombin-III-Stockholm: a codon 392 (Gly----Asp) mutation with normal heparin binding and impaired serine protease reactivity. *Blood* **1992**, *79*, 1428-1434.
282. Olds, R.J.; Lane, D.A.; Boisclair, M.; Sas, G.; Bock, S.C.; Thein, S.L. Antithrombin Budapest 3. An antithrombin variant with reduced heparin affinity resulting from the substitution L99F. *FEBS Lett* **1992**, *300*, 241-246, doi:10.1016/0014-5793(92)80854-a.
283. Chang, J.Y.; Tran, T.H. Antithrombin III Basel. Identification of a Pro-Leu substitution in a hereditary abnormal antithrombin with impaired heparin cofactor activity. *J Biol Chem* **1986**, *261*, 1174-1176.
284. Caso, R.; Lane, D.A.; Thompson, E.; Zangouras, D.; Panico, M.; Morris, H.; Olds, R.J.; Thein, S.L.; Girolami, A. Antithrombin Padua. I: Impaired heparin binding caused by an Arg47 to his (CGT to CAT) substitution. *Thromb Res* **1990**, *58*, 185-190, doi:10.1016/0049-3848(90)90175-c.
285. Alhenc-Gelas, M.; Plu-Bureau, G.; Hugon-Rodin, J.; Picard, V.; Horellou, M.H.; Thrombophilia, G.s.g.o.G. Thrombotic risk according to SERPINC1 genotype in a large cohort of subjects with antithrombin inherited deficiency. *Thromb Haemost* **2017**, *117*, 1040-1051, doi:10.1160/TH16-08-0635.
286. Perry, D.J.; Daly, M.E.; Tait, R.C.; Walker, I.D.; Brown, K.; Beauchamp, N.J.; Preston, F.E.; Gyde, H.; Harper, P.L.; Carrell, R.W. Antithrombin cambridge II (Ala384Ser): clinical, functional and haplotype analysis of 18 families. *Thromb Haemost* **1998**, *79*, 249-253.
287. Corral, J.; Hernandez-Espinosa, D.; Soria, J.M.; Gonzalez-Conejero, R.; Ordonez, A.; Gonzalez-Porrás, J.R.; Perez-Ceballos, E.; Lecumberri, R.; Sanchez, I.; Roldan, V., et al. Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood* **2007**, *109*, 4258-4263, doi:10.1182/blood-2006-08-040774.

288. Girolami, A.; Lazzaro, A.R.; Simioni, P. The relationship between defective heparin cofactor activities and thrombotic phenomena in AT III abnormalities. *Thromb Haemost* **1988**, *59*, 121.
289. Ates, O. The deficiencies of protein C, protein S and antithrombin III in patients with retinal vein occlusion: a Turkish sample. *Clin Lab Haematol* **2006**, *28*, 391-392, doi:10.1111/j.1365-2257.2006.00834.x.
290. Calcaterra, D.; Martin, J.T.; Ferneini, A.M.; De Natale, R.W. Acute mesenteric and aortic thrombosis associated with antithrombin deficiency: a rare occurrence. *Ann Vasc Surg* **2010**, *24*, 415 e415-417, doi:10.1016/j.avsg.2009.07.028.
291. Harmanci, O.; Ersoy, O.; Gurgey, A.; Buyukasik, Y.; Gedikoglu, G.; Balkanci, F.; Sivri, B.; Bayraktar, Y. The etiologic distribution of thrombophilic factors in chronic portal vein thrombosis. *J Clin Gastroenterol* **2007**, *41*, 521-527, doi:10.1097/01.mcg.0000225635.52780.47.
292. Santangeli, P.; Sestito, A. Acute left atrial thrombosis during anticoagulant therapy in a patient with antithrombin deficiency. *Acta Cardiol* **2008**, *63*, 635-637, doi:10.2143/AC.63.5.2033233.
293. Bereczky, Z.; Balogh, L.; Bagoly, Z. Inherited thrombophilia and the risk of myocardial infarction: current evidence and uncertainties. *Kardiol Pol* **2019**, *77*, 419-429, doi:10.33963/KP.14804.
294. Sabadell, J.; Casellas, M.; Alijotas-Reig, J.; Arellano-Rodrigo, E.; Cabero, L. Inherited antithrombin deficiency and pregnancy: maternal and fetal outcomes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **2010**, *149*, 47-51, doi:10.1016/j.ejogrb.2009.12.004.
295. Hernandez-Espinosa, D.; Minano, A.; Martinez, C.; Perez-Ceballos, E.; Heras, I.; Fuster, J.L.; Vicente, V.; Corral, J. L-asparaginase-induced antithrombin type I deficiency: implications for conformational diseases. *Am J Pathol* **2006**, *169*, 142-153, doi:10.2353/ajpath.2006.051238.
296. Maclean, P.S.; Tait, R.C. Hereditary and acquired antithrombin deficiency: epidemiology, pathogenesis and treatment options. *Drugs* **2007**, *67*, 1429-1440, doi:10.2165/00003495-200767100-00005.
297. Bushman, J.E.; Palmieri, D.; Whinna, H.C.; Church, F.C. Insight into the mechanism of asparaginase-induced depletion of antithrombin III in treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* **2000**, *24*, 559-565, doi:10.1016/s0145-2126(00)00017-5.
298. Hernandez-Espinosa, D.; Minano, A.; Ordonez, A.; Mota, R.; Martinez-Martinez, I.; Vicente, V.; Corral, J. Dexamethasone induces a heat-stress response that ameliorates the conformational consequences on antithrombin of L-asparaginase treatment. *J Thromb Haemost* **2009**, *7*, 1128-1133, doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03449.x.
299. Schulman, S.; Kearon, C.; Kakkar, A.K.; Schellong, S.; Eriksson, H.; Baanstra, D.; Kvanme, A.M.; Friedman, J.; Mismetti, P.; Goldhaber, S.Z., et al. Extended use of dabigatran, warfarin, or placebo in venous thromboembolism. *N Engl J Med* **2013**, *368*, 709-718, doi:10.1056/NEJMoa1113697.
300. Agnelli, G.; Buller, H.R.; Cohen, A.; Curto, M.; Gallus, A.S.; Johnson, M.; Porcari, A.; Raskob, G.E.; Weitz, J.I.; Investigators, A.-E. Apixaban for extended treatment of venous thromboembolism. *N Engl J Med* **2013**, *368*, 699-708, doi:10.1056/NEJMoa1207541.
301. Campello, E.; Prandoni, P. Evolving Knowledge on Primary and Secondary Prevention of Venous Thromboembolism in Carriers of Hereditary

- Thrombophilia: A Narrative Review. *Semin Thromb Hemost* **2022**, *48*, 937-948, doi:10.1055/s-0042-1753527.
302. Elsebaie, M.A.T.; van Es, N.; Langston, A.; Buller, H.R.; Gaddh, M. Direct oral anticoagulants in patients with venous thromboembolism and thrombophilia: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* **2019**, *17*, 645-656, doi:10.1111/jth.14398.
 303. Campello, E.; Spiezia, L.; Simion, C.; Tormene, D.; Camporese, G.; Dalla Valle, F.; Poretto, A.; Bulato, C.; Gavasso, S.; Radu, C.M., et al. Direct Oral Anticoagulants in Patients With Inherited Thrombophilia and Venous Thromboembolism: A Prospective Cohort Study. *J Am Heart Assoc* **2020**, *9*, e018917, doi:10.1161/JAHA.120.018917.
 304. Bhoelan, B.S.; Mulder, R.; Lukens, M.V.; Meijer, K. Direct Oral Anticoagulants in Antithrombin Deficiency: Initial Experience in a Single Center. *Thromb Haemost* **2021**, *121*, 242-245, doi:10.1055/s-0040-1715647.
 305. Kawano, H.; Maemura, K. Edoxaban Was Effective for the Treatment of Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Thromboembolism in a Cancer Patient with Antithrombin III Deficiency. *Intern Med* **2016**, *55*, 3285-3289, doi:10.2169/internalmedicine.55.7314.
 306. Van Bruwaene, L.; Huisman, A.; Urbanus, R.T.; Versluys, B. Heparin-resistant Thrombosis Due to Homozygous Antithrombin Deficiency Treated With Rivaroxaban: A Case Report. *J Pediatr Hematol Oncol* **2016**, *38*, 658-660, doi:10.1097/MPH.0000000000000608.
 307. Yamaguchi, J.; Hara, N.; Yamaguchi, T.; Nagata, Y.; Nozato, T.; Miyamoto, T. Successful treatment of a massive pulmonary embolism using rivaroxaban in a patient with antithrombin III deficiency. *J Cardiol Cases* **2017**, *16*, 144-147, doi:10.1016/j.jccase.2017.06.008.
 308. Minami, K.; Kumagai, K.; Sugai, Y.; Nakamura, K.; Naito, S.; Oshima, S. Efficacy of Oral Factor Xa Inhibitor for Venous Thromboembolism in a Patient with Antithrombin Deficiency. *Intern Med* **2018**, *57*, 2025-2028, doi:10.2169/internalmedicine.0483-17.
 309. Nojima, Y.; Ihara, M.; Adachi, H.; Kurimoto, T.; Nanto, S. Efficacy and safety of apixaban in a patient with systemic venous thromboembolism associated with hereditary antithrombin deficiency. *J Cardiol Cases* **2019**, *19*, 106-109, doi:10.1016/j.jccase.2018.12.007.
 310. Appignani, M.; Sciartilli, A.; Caputo, M.; Di Girolamo, E. Successful treatment with rivaroxaban of an extended deep vein thrombosis complicated by pulmonary embolism in a patient with familial antithrombin III deficiency: a case report. *Eur Heart J Case Rep* **2020**, *4*, 1-5, doi:10.1093/ehjcr/ytz235.
 311. Miyashita, H.; Tobita, K.; Morishita, E.; Saito, S. Ilio-femoral venous thrombosis with hereditary antithrombin deficiency: a case report of rare thrombotic disease and successful treatment with catheter directed thrombolysis. *Eur Heart J Case Rep* **2021**, *5*, ytaa531, doi:10.1093/ehjcr/ytaa531.
 312. Condoluci, A.; Alberio, L.; Gomez, F.J.; Studt, J.D.; Orlando, C.; Jochmans, K.; Gerber, B. Thrombotic storm under DOAC treatment in a patient with homozygous antithrombin Budapest III mutation. *Thromb Res* **2021**, *201*, 161-163, doi:10.1016/j.thromres.2021.04.002.
 313. Meijer, P.; Kluft, C.; Haverkate, F.; De Maat, M.P. The long-term within- and between-laboratory variability for assay of antithrombin, and proteins C and S: results derived from the external quality assessment program for thrombophilia

- screening of the ECAT Foundation. *J Thromb Haemost* **2003**, *1*, 748-753, doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00141.x.
314. Odegard, O.R.; Lie, M.; Abildgaard, U. Antifactor Xa activity measured with amidolytic methods. *Haemostasis* **1976**, *5*, 265-275, doi:10.1159/000214145.
315. Abildgaard, U.; Lie, M.; Odegard, O.R. Antithrombin (heparin cofactor) assay with "new" chromogenic substrates (S-2238 and Chromozym TH). *Thromb Res* **1977**, *11*, 549-553, doi:10.1016/0049-3848(77)90208-0.
316. Cooper, P.C.; Coath, F.; Daly, M.E.; Makris, M. The phenotypic and genetic assessment of antithrombin deficiency. *Int J Lab Hematol* **2011**, *33*, 227-237, doi:10.1111/j.1751-553X.2011.01307.x.
317. Conard, J.; Bara, L.; Horellou, M.H.; Samama, M.M. Bovine or human thrombin in amidolytic at III assays. Influence of heparin cofactor II. *Thromb Res* **1986**, *41*, 873-878, doi:10.1016/0049-3848(86)90386-5.
318. Rossi, E.; Chiusolo, P.; Za, T.; Marietti, S.; Ciminello, A.; Leone, G.; De Stefano, V. Report of a novel kindred with antithrombin heparin-binding site variant (47 Arg to His): demand for an automated progressive antithrombin assay to detect molecular variants with low thrombotic risk. *Thromb Haemost* **2007**, *98*, 695-697.
319. Parvez, Z.; Fareed, J.; Messmore, H.L.; Moncada, R. Laser nephelometric quantitation of antithrombin-III (AT-III) development of a new assay. *Thromb Res* **1981**, *24*, 367-377, doi:10.1016/0049-3848(81)90072-4.
320. Antovic, J.; Soderstrom, J.; Karlman, B.; Blomback, M. Evaluation of a new immunoturbidimetric test (Liatest antithrombin III) for determination of antithrombin antigen. *Clin Lab Haematol* **2001**, *23*, 313-316, doi:10.1046/j.1365-2257.2001.00410.x.
321. Stenflo, J. A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J Biol Chem* **1976**, *251*, 355-363.
322. Dahlback, B. Factor V and protein S as cofactors to activated protein C. *Haematologica* **1997**, *82*, 91-95.
323. Bereczky, Z.; Kovacs, K.B.; Muszbek, L. Protein C and protein S deficiencies: similarities and differences between two brothers playing in the same game. *Clin Chem Lab Med* **2010**, *48 Suppl 1*, S53-66, doi:10.1515/CCLM.2010.369.
324. Dahlback, B.; Villoutreix, B.O. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2005**, *25*, 1311-1320, doi:10.1161/01.ATV.0000168421.13467.82.
325. Loghmani, H.; Conway, E.M. Exploring traditional and nontraditional roles for thrombomodulin. *Blood* **2018**, *132*, 148-158, doi:10.1182/blood-2017-12-768994.
326. Esmon, N.L.; Smirnov, M.D.; Safa, O.; Esmon, C.T. Lupus anticoagulants, thrombosis and the protein C system. *Haematologica* **1999**, *84*, 446-451.
327. Suzuki, K. The multi-functional serpin, protein C inhibitor: beyond thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost* **2008**, *6*, 2017-2026, doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03181.x.
328. Shahzad, K.; Kohli, S.; Al-Dabet, M.M.; Isermann, B. Cell biology of activated protein C. *Curr Opin Hematol* **2019**, *26*, 41-50, doi:10.1097/MOH.0000000000000473.
329. Griffin, J.H.; Zlokovic, B.V.; Mosnier, L.O. Activated protein C, protease activated receptor 1, and neuroprotection. *Blood* **2018**, *132*, 159-169, doi:10.1182/blood-2018-02-769026.

330. Mosnier, L.O.; Zlokovic, B.V.; Griffin, J.H. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* **2007**, *109*, 3161-3172, doi:10.1182/blood-2006-09-003004.
331. Leon, G.; Rehill, A.M.; Preston, R.J.S. The protein C pathways. *Curr Opin Hematol* **2022**, *29*, 251-258, doi:10.1097/MOH.0000000000000726.
332. Healy, L.D.; Puy, C.; Fernandez, J.A.; Mitrugno, A.; Keshari, R.S.; Taku, N.A.; Chu, T.T.; Xu, X.; Gruber, A.; Lupu, F., et al. Activated protein C inhibits neutrophil extracellular trap formation in vitro and activation in vivo. *J Biol Chem* **2017**, *292*, 8616-8629, doi:10.1074/jbc.M116.768309.
333. Bernard, G.R.; Vincent, J.L.; Laterre, P.F.; LaRosa, S.P.; Dhainaut, J.F.; Lopez-Rodriguez, A.; Steingrub, J.S.; Garber, G.E.; Helterbrand, J.D.; Ely, E.W., et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* **2001**, *344*, 699-709, doi:10.1056/NEJM200103083441001.
334. Patracchini, P.; Aiello, V.; Palazzi, P.; Calzolari, E.; Bernardi, F. Sublocalization of the human protein C gene on chromosome 2q13-q14. *Hum Genet* **1989**, *81*, 191-192, doi:10.1007/BF00293902.
335. Tait, R.C.; Walker, I.D.; Reitsma, P.H.; Islam, S.I.; McCall, F.; Poort, S.R.; Conkie, J.A.; Bertina, R.M. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost* **1995**, *73*, 87-93.
336. De Stefano, V.; Simioni, P.; Rossi, E.; Tormene, D.; Za, T.; Pagnan, A.; Leone, G. The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with inherited deficiency of natural anticoagulants antithrombin, protein C and protein S. *Haematologica* **2006**, *91*, 695-698.
337. Rossi, E.; Za, T.; Ciminello, A.; Leone, G.; De Stefano, V. The risk of symptomatic pulmonary embolism due to proximal deep venous thrombosis differs in patients with different types of inherited thrombophilia. *Thromb Haemost* **2008**, *99*, 1030-1034, doi:10.1160/TH08-02-0069.
338. Koster, T.; Rosendaal, F.R.; Briet, E.; van der Meer, F.J.; Colly, L.P.; Trienekens, P.H.; Poort, S.R.; Reitsma, P.H.; Vandenbroucke, J.P. Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood* **1995**, *85*, 2756-2761.
339. Brouwer, J.L.; Lijfering, W.M.; Ten Kate, M.K.; Kluin-Nelemans, H.C.; Veeger, N.J.; van der Meer, J. High long-term absolute risk of recurrent venous thromboembolism in patients with hereditary deficiencies of protein S, protein C or antithrombin. *Thromb Haemost* **2009**, *101*, 93-99.
340. Matitiau, A.; Tabachnik, E.; Sthoeger, D.; Birk, E. Thrombus in the left ventricle of a child with systemic emboli: an unusual presentation of hereditary protein C deficiency. *Pediatrics* **2001**, *107*, 421-422, doi:10.1542/peds.107.2.421.
341. Kim, M.J.; Hur, S.H.; Lee, Y.S.; Hyun, D.W.; Han, S.W.; Kim, K.S.; Kim, Y.N.; Kim, K.B. Intracardiac multichamber thrombi in a patient with combined protein C and protein S deficiencies. *Int J Cardiol* **2005**, *100*, 505-506, doi:10.1016/j.ijcard.2004.10.027.
342. Pabinger, I.; Grafenhofer, H. Thrombosis during pregnancy: risk factors, diagnosis and treatment. *Pathophysiol Haemost Thromb* **2002**, *32*, 322-324, doi:10.1159/000073590.
343. Goldenberg, N.A.; Manco-Johnson, M.J. Protein C deficiency. *Haemophilia* **2008**, *14*, 1214-1221, doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01838.x.
344. Minford, A.; Brandao, L.R.; Othman, M.; Male, C.; Abdul-Kadir, R.; Monagle, P.; Mumford, A.D.; Adcock, D.; Dahlback, B.; Miljic, P., et al. Diagnosis and

- management of severe congenital protein C deficiency (SCPCD): Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* **2022**, *20*, 1735-1743, doi:10.1111/jth.15732.
345. Kohler, J.; Kasper, J.; Witt, I.; von Reutern, G.M. Ischemic stroke due to protein C deficiency. *Stroke* **1990**, *21*, 1077-1080, doi:10.1161/01.str.21.7.1077.
 346. Acar, G.; Dogan, A.; Altinbas, A.; Turker, Y. Recurrent acute stent thrombosis associated with protein C and S deficiencies. *Int J Cardiovasc Imaging* **2006**, *22*, 333-337, doi:10.1007/s10554-005-9074-3.
 347. Peterman, M.A.; Roberts, W.C. Syndrome of protein C deficiency and anterior wall acute myocardial infarction at a young age from a single coronary occlusion with otherwise normal coronary arteries. *Am J Cardiol* **2003**, *92*, 768-770, doi:10.1016/s0002-9149(03)00854-3.
 348. Kottke-Marchant, K.; Comp, P. Laboratory issues in diagnosing abnormalities of protein C, thrombomodulin, and endothelial cell protein C receptor. *Arch Pathol Lab Med* **2002**, *126*, 1337-1348, doi:10.5858/2002-126-1337-LIIDAO.
 349. Sadiq, A.; Ahmed, S.; Karim, A.; Spivak, J.; Mattana, J. Acute myocardial infarction: a rare complication of protein C deficiency. *Am J Med* **2001**, *110*, 414, doi:10.1016/s0002-9343(00)00753-1.
 350. Tiong, I.Y.; Alkotob, M.L.; Ghaffari, S. Protein C deficiency manifesting as an acute myocardial infarction and ischaemic stroke. *Heart* **2003**, *89*, E7, doi:10.1136/heart.89.2.e7.
 351. Yang, F.C.; Hsu, C.H.; Lin, J.C.; Chen, C.Y.; Lee, J.T. Inherited protein C deficiency with acute ischemic stroke in a young adult: a case report. *Blood Coagul Fibrinolysis* **2008**, *19*, 601-604, doi:10.1097/MBC.0b013e3283009c7c.
 352. Hisatomi, K.; Yamada, T.; Odate, T.; Yamashita, K. Intermittent coronary artery occlusion caused by a floating thrombus in the left coronary sinus of valsalva of a patient with a normal aorta and protein C deficiency. *Ann Thorac Surg* **2011**, *92*, 1508-1510, doi:10.1016/j.athoracsur.2011.04.037.
 353. Cheng, Y.C.; Tsai, C.S.; Lin, Y.C.; Kao, C.H.; Tsai, Y.T. Multiple episodes of arterial thrombosis in a young man with protein C deficiency: a case report. *Vascular* **2012**, *20*, 318-320, doi:10.1258/vasc.2011.cr0290.
 354. Tajima, K.; Yamamoto, H.; Yamamoto, M.; Kato, Y.; Kato, T. Adult-onset arterial thrombosis in a pedigree of homozygous and heterozygous protein C deficiency. *Thromb Res* **2013**, *131*, 102-104, doi:10.1016/j.thromres.2012.10.016.
 355. Maqbool, S.; Rastogi, V.; Seth, A.; Singh, S.; Kumar, V.; Mustaqueem, A. Protein-C deficiency presenting as pulmonary embolism and myocardial infarction in the same patient. *Thromb J* **2013**, *11*, 19, doi:10.1186/1477-9560-11-19.
 356. Wypasek, E.; Pankiw-Bembenek, O.; Potaczek, D.P.; Alhenc-Gelas, M.; Trebacz, J.; Undas, A. A missense mutation G109R in the PROC gene associated with type I protein C deficiency in a young Polish man with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* **2013**, *167*, e146-148, doi:10.1016/j.ijcard.2013.04.102.
 357. Ichiyama, M.; Ohga, S.; Ochiai, M.; Fukushima, K.; Ishimura, M.; Torio, M.; Urata, M.; Hotta, T.; Kang, D.; Hara, T. Fetal hydrocephalus and neonatal stroke as the first presentation of protein C deficiency. *Brain Dev* **2016**, *38*, 253-256, doi:10.1016/j.braindev.2015.07.004.
 358. Hubert, A.; Gueret, P.; Leurent, G.; Martins, R.P.; Auffret, V.; Bedossa, M. Myocardial infarction and thrombophilia: Do not miss the right diagnosis! *Rev*

- Port Cardiol (Engl Ed)* **2018**, 37, 89 e81-89 e84, doi:10.1016/j.repc.2016.12.018.
359. Iwamoto, Y.; Kitano, T.; Matsubara, S.; Uno, M.; Yagita, Y. In-stent thrombosis after carotid artery stenting in a patient with protein C deficiency. *Neurol Sci* **2018**, 39, 2229-2230, doi:10.1007/s10072-018-3544-6.
 360. Li, P.; Qin, C. Recurrent cerebellar infarction associated with hereditary heterozygous protein C deficiency in a 35-year-old woman: A case report and genetic study on the pedigree. *Exp Ther Med* **2018**, 16, 2677-2681, doi:10.3892/etm.2018.6518.
 361. Mahmoodi, B.K.; Brouwer, J.L.; Veeger, N.J.; van der Meer, J. Hereditary deficiency of protein C or protein S confers increased risk of arterial thromboembolic events at a young age: results from a large family cohort study. *Circulation* **2008**, 118, 1659-1667, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.780759.
 362. Omran, S.S.; Lerario, M.P.; Gialdini, G.; Merkler, A.E.; Moya, A.; Chen, M.L.; Kamel, H.; DeSancho, M.; Navi, B.B. Clinical Impact of Thrombophilia Screening in Young Adults with Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* **2019**, 28, 882-889, doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.12.006.
 363. Sakata, T.; Kario, K.; Katayama, Y.; Matsuyama, T.; Kato, H.; Miyata, T. Studies on congenital protein C deficiency in Japanese: prevalence, genetic analysis, and relevance to the onset of arterial occlusive diseases. *Semin Thromb Hemost* **2000**, 26, 11-16, doi:10.1055/s-2000-9796.
 364. Haywood, S.; Liesner, R.; Pindora, S.; Ganesan, V. Thrombophilia and first arterial ischaemic stroke: a systematic review. *Arch Dis Child* **2005**, 90, 402-405, doi:10.1136/ad.2004.049163.
 365. Kenet, G.; Lutkhoff, L.K.; Albisetti, M.; Bernard, T.; Bonduel, M.; Brandao, L.; Chabrier, S.; Chan, A.; deVeber, G.; Fiedler, B., et al. Impact of thrombophilia on risk of arterial ischemic stroke or cerebral sinovenous thrombosis in neonates and children: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Circulation* **2010**, 121, 1838-1847, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.913673.
 366. Sugahara, Y.; Miura, O.; Hirosawa, S.; Aoki, N. Compound heterozygous protein C deficiency caused by two mutations, Arg-178 to Gln and Cys-331 to Arg, leading to impaired secretion of mutant protein C. *Thromb Haemost* **1994**, 72, 814-818.
 367. Bovill, E.G.; Tomczak, J.A.; Grant, B.; Bhushan, F.; Pillemer, E.; Rainville, I.R.; Long, G.L. Protein C Vermont: symptomatic type II protein C deficiency associated with two GLA domain mutations. *Blood* **1992**, 79, 1456-1465.
 368. Gaussem, P.; Gandrille, S.; Duchemin, J.; Emmerich, J.; Alhenc-Gelas, M.; Aillaud, M.F.; Aiach, M. Influence of six mutations of the protein C gene on the Gla domain conformation and calcium affinity. *Thromb Haemost* **1994**, 71, 748-754.
 369. Preston, R.J.; Morse, C.; Murden, S.L.; Brady, S.K.; O'Donnell, J.S.; Mumford, A.D. The protein C omega-loop substitution Asn2Ile is associated with reduced protein C anticoagulant activity. *Br J Haematol* **2009**, 144, 946-953, doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07550.x.
 370. Marchetti, G.; Patracchini, P.; Gemmati, D.; Castaman, G.; Rodeghiero, F.; Wacey, A.; Cooper, D.N.; Tuddenham, E.G.; Bernardi, F. Symptomatic type II protein C deficiency caused by a missense mutation (Gly 381-->Ser) in the

- substrate-binding pocket. *Br J Haematol* **1993**, *84*, 285-289, doi:10.1111/j.1365-2141.1993.tb03066.x.
371. Levo, A.; Kuismanen, K.; Holopainen, P.; Vahtera, E.; Rasi, V.; Holopainen, P.; Rasi, V.; Krusius, T.; Partanen, J. Single founder mutation (W380G) in type II protein C deficiency in Finland. *Thromb Haemost* **2000**, *84*, 424-428.
372. Tsay, W.; Shen, M.C. R147W mutation of PROC gene is common in venous thrombotic patients in Taiwanese Chinese. *Am J Hematol* **2004**, *76*, 8-13, doi:10.1002/ajh.20043.
373. Miyata, T.; Sakata, T.; Yasumuro, Y.; Okamura, T.; Katsumi, A.; Saito, H.; Abe, T.; Shirahata, A.; Sakai, M.; Kato, H. Genetic analysis of protein C deficiency in nineteen Japanese families: five recurrent defects can explain half of the deficiencies. *Thromb Res* **1998**, *92*, 181-187, doi:10.1016/s0049-3848(98)00131-5.
374. Zeegers, M.P.; van Poppel, F.; Vlietinck, R.; Spruijt, L.; Ostrer, H. Founder mutations among the Dutch. *Eur J Hum Genet* **2004**, *12*, 591-600, doi:10.1038/sj.ejhg.5201151.
375. Couture, P.; Bovill, E.G.; Demers, C.; Simard, J.; Delage, R.; Scott, B.T.; Valliere, J.E.; Callas, P.W.; Jomphe, M.; Rosendaal, F.R., et al. Evidence of a founder effect for the protein C gene 3363 inserted C mutation in thrombophilic pedigrees of French origin. *Thromb Haemost* **2001**, *86*, 1000-1006.
376. Szeles, G.; Voko, Z.; Jenei, T.; Kardos, L.; Pocsai, Z.; Bajtay, A.; Papp, E.; Pasti, G.; Kosa, Z.; Molnar, I., et al. A preliminary evaluation of a health monitoring programme in Hungary. *Eur J Public Health* **2005**, *15*, 26-32, doi:10.1093/eurpub/cki107.
377. Karpati, L.; Penke, B.; Katona, E.; Balogh, I.; Vamosi, G.; Muszbek, L. A modified, optimized kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. *Clin Chem* **2000**, *46*, 1946-1955.
378. Katona, E.E.; Ajzner, E.; Toth, K.; Karpati, L.; Muszbek, L. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods* **2001**, *258*, 127-135, doi:10.1016/s0022-1759(01)00479-3.
379. Schmittgen, T.D.; Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **2008**, *3*, 1101-1108, doi:10.1038/nprot.2008.73.
380. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E., et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* **2015**, *17*, 405-424, doi:10.1038/gim.2015.30.
381. Hevessy, Z.; Haramura, G.; Boda, Z.; Udvardy, M.; Muszbek, L. Promotion of the crosslinking of fibrin and alpha 2-antiplasmin by platelets. *Thromb Haemost* **1996**, *75*, 161-167.
382. Orban, T.; Kalafatis, M.; Gogonea, V. Completed three-dimensional model of human coagulation factor va. Molecular dynamics simulations and structural analyses. *Biochemistry* **2005**, *44*, 13082-13090, doi:10.1021/bi050891t.
383. Darden, T.; Perera, L.; Li, L.; Pedersen, L. New tricks for modelers from the crystallography toolkit: the particle mesh Ewald algorithm and its use in nucleic acid simulations. *Structure* **1999**, *7*, R55-60, doi:10.1016/s0969-2126(99)80033-1.

384. Venkateswarlu, D.; Perera, L.; Darden, T.; Pedersen, L.G. Structure and dynamics of zymogen human blood coagulation factor X. *Biophys J* **2002**, *82*, 1190-1206, doi:10.1016/S0006-3495(02)75476-3.
385. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **1996**, *14*, 33-38, 27-38, doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5.
386. Kearon, C.; Ageno, W.; Cannegieter, S.C.; Cosmi, B.; Geersing, G.J.; Kyrle, P.A.; Subcommittees on Control of, A.; Predictive; Diagnostic Variables in Thrombotic, D. Categorization of patients as having provoked or unprovoked venous thromboembolism: guidance from the SSC of ISTH. *J Thromb Haemost* **2016**, *14*, 1480-1483, doi:10.1111/jth.13336.
387. Kosa, Z.; Moravcsik-Kornyicki, A.; Dioszegi, J.; Roberts, B.; Szabo, Z.; Sandor, J.; Adany, R. Prevalence of metabolic syndrome among Roma: a comparative health examination survey in Hungary. *Eur J Public Health* **2015**, *25*, 299-304, doi:10.1093/eurpub/cku157.
388. Thygesen, K.; Alpert, J.S.; Jaffe, A.S.; Simoons, M.L.; Chaitman, B.R.; White, H.D.; Joint, E.S.C.A.A.H.A.W.H.F.T.F.f.U.D.o.M.I.; Authors/Task Force Members, C.; Thygesen, K.; Alpert, J.S., et al. Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **2012**, *60*, 1581-1598, doi:10.1016/j.jacc.2012.08.001.
389. Balogh, L.; Katona, E.; Mezei, Z.A.; Kallai, J.; Gindele, R.; Edes, 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* **2018**, *448*, 199-209, doi:10.1007/s11010-018-3326-8.
390. Bereczky, Z.; Gindele, R.; Speker, M.; Kallai, J. Deficiencies of the Natural Anticoagulants - Novel Clinical Laboratory Aspects of Thrombophilia Testing. *EJIFCC* **2016**, *27*, 130-146.
391. Manders, E.M.M.; Verbeek, F.J.; Aten, J.A. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc* **1993**, *169*, 375-382, doi:10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x.
392. Wu, Y.; Eghbali, M.; Ou, J.; Lu, R.; Toro, L.; Stefani, E. Quantitative determination of spatial protein-protein correlations in fluorescence confocal microscopy. *Biophys J* **2010**, *98*, 493-504, doi:10.1016/j.bpj.2009.10.037.
393. Jacobson, M.P.; Pincus, D.L.; Rapp, C.S.; Day, T.J.; Honig, B.; Shaw, D.E.; Friesner, R.A. A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins* **2004**, *55*, 351-367, doi:10.1002/prot.10613.
394. Pronk, S.; Pall, S.; Schulz, R.; Larsson, P.; Bjelkmar, P.; Apostolov, R.; Shirts, M.R.; Smith, J.C.; Kasson, P.M.; van der Spoel, D., et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 845-854, doi:10.1093/bioinformatics/btt055.
395. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **2004**, *25*, 1605-1612, doi:10.1002/jcc.20084.
396. Laskowski, R.A.; Rullmannn, J.A.; MacArthur, M.W.; Kaptein, R.; Thornton, J.M. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR* **1996**, *8*, 477-486, doi:10.1007/BF00228148.
397. Balogh, G.; Komaromi, I.; Bereczky, Z. The mechanism of high affinity pentasaccharide binding to antithrombin, insights from Gaussian accelerated

- molecular dynamics simulations. *J Biomol Struct Dyn* **2020**, *38*, 4718-4732, doi:10.1080/07391102.2019.1688194.
398. Olson, S.T.; Richard, B.; Izaguirre, G.; Schedin-Weiss, S.; Gettins, P.G. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie* **2010**, *92*, 1587-1596, doi:10.1016/j.biochi.2010.05.011.
 399. Schedin-Weiss, S.; Richard, B.; Olson, S.T. Kinetic evidence that allosteric activation of antithrombin by heparin is mediated by two sequential conformational changes. *Arch Biochem Biophys* **2010**, *504*, 169-176, doi:10.1016/j.abb.2010.08.021.
 400. Roth, R.; Swanson, R.; Izaguirre, G.; Bock, S.C.; Gettins, P.G.W.; Olson, S.T. Saturation Mutagenesis of the Antithrombin Reactive Center Loop P14 Residue Supports a Three-step Mechanism of Heparin Allosteric Activation Involving Intermediate and Fully Activated States. *J Biol Chem* **2015**, *290*, 28020-28036, doi:10.1074/jbc.M115.678839.
 401. McCoy, A.J.; Pei, X.Y.; Skinner, R.; Abrahams, J.P.; Carrell, R.W. Structure of beta-antithrombin and the effect of glycosylation on antithrombin's heparin affinity and activity. *J Mol Biol* **2003**, *326*, 823-833, doi:10.1016/s0022-2836(02)01382-7.
 402. Jin, L.; Abrahams, J.P.; Skinner, R.; Petitou, M.; Pike, R.N.; Carrell, R.W. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94*, 14683-14688, doi:10.1073/pnas.94.26.14683.
 403. Johnson, D.J.; Huntington, J.A. Crystal structure of antithrombin in a heparin-bound intermediate state. *Biochemistry* **2003**, *42*, 8712-8719, doi:10.1021/bi034524y.
 404. Miao, Y.; Feher, V.A.; McCammon, J.A. Gaussian Accelerated Molecular Dynamics: Unconstrained Enhanced Sampling and Free Energy Calculation. *J Chem Theory Comput* **2015**, *11*, 3584-3595, doi:10.1021/acs.jctc.5b00436.
 405. Johnson, D.J.; Langdown, J.; Li, W.; Luis, S.A.; Baglin, T.P.; Huntington, J.A. Crystal structure of monomeric native antithrombin reveals a novel reactive center loop conformation. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 35478-35486, doi:10.1074/jbc.M607204200.
 406. Huang, J.; Rauscher, S.; Nawrocki, G.; Ran, T.; Feig, M.; de Groot, B.L.; Grubmuller, H.; MacKerell, A.D., Jr. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat Methods* **2017**, *14*, 71-73, doi:10.1038/nmeth.4067.
 407. Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V.G.; Im, W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem* **2008**, *29*, 1859-1865, doi:10.1002/jcc.20945.
 408. Salomon-Ferrer, R.; Gotz, A.W.; Poole, D.; Le Grand, S.; Walker, R.C. Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald. *J Chem Theory Comput* **2013**, *9*, 3878-3888, doi:10.1021/ct400314y.
 409. Roe, D.R.; Cheatham, T.E., 3rd. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Comput* **2013**, *9*, 3084-3095, doi:10.1021/ct400341p.
 410. Bengtsson, B.O.; Thomson, G. Measuring the strength of associations between HLA antigens and diseases. *Tissue Antigens* **1981**, *18*, 356-363, doi:10.1111/j.1399-0039.1981.tb01404.x.

411. Broman, K.W.; Murray, J.C.; Sheffield, V.C.; White, R.L.; Weber, J.L. Comprehensive human genetic maps: individual and sex-specific variation in recombination. *Am J Hum Genet* **1998**, *63*, 861-869, doi:10.1086/302011.
412. Risch, N.; de Leon, D.; Ozelius, L.; Kramer, P.; Almasy, L.; Singer, B.; Fahn, S.; Breakefield, X.; Bressman, S. Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population. *Nat Genet* **1995**, *9*, 152-159, doi:10.1038/ng0295-152.
413. Goldstein, D.B.; Reich, D.E.; Bradman, N.; Usher, S.; Seligsohn, U.; Peretz, H. Age estimates of two common mutations causing factor XI deficiency: recent genetic drift is not necessary for elevated disease incidence among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* **1999**, *64*, 1071-1075, doi:10.1086/302313.
414. Weber, J.L.; Wong, C. Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* **1993**, *2*, 1123-1128, doi:10.1093/hmg/2.8.1123.
415. Rannala, B.; Reeve, J.P. Joint Bayesian estimation of mutation location and age using linkage disequilibrium. *Pac Symp Biocomput* **2003**, 10.1142/9789812776303_0049, 526-534, doi:10.1142/9789812776303_0049.
416. Genin, E.; Tullio-Pelet, A.; Begeot, F.; Lyonnet, S.; Abel, L. Estimating the age of rare disease mutations: the example of Triple-A syndrome. *J Med Genet* **2004**, *41*, 445-449, doi:10.1136/jmg.2003.017962.
417. Ajzner, E.; Muszbek, L. Kinetic spectrophotometric factor XIII activity assays: the subtraction of plasma blank is not omissible [corrected]. *J Thromb Haemost* **2004**, *2*, 2075-2077, doi:10.1111/j.1538-7836.2004.00986.x.
418. Meijer, P. Clinically needed sensitivity for very low levels of Factor XIII: not yet proven for a new functional assay. *Clin Chem Lab Med* **2011**, *49*, 1753-1754, doi:10.1515/CCLM.2011.649.
419. Aroksallasi, A.; Kerenyi, A.; Katona, E.; Bereczky, Z.; Muszbek, L.; Boda, Z.; Schlammadinger, A. The use of recombinant factor XIII in a major bleeding episode of a patient with congenital factor XIII deficiency--the first experience. *Haemophilia* **2015**, *21*, e118-121, doi:10.1111/hae.12591.
420. Yamazaki, T.; Nicolaes, G.A.; Sorensen, K.W.; Dahlback, B. Molecular basis of quantitative factor V deficiency associated with factor V R2 haplotype. *Blood* **2002**, *100*, 2515-2521, doi:10.1182/blood.V100.7.2515.
421. Lunghi, B.; Scanavini, D.; Castoldi, E.; Gemmati, D.; Tognazzo, S.; Redaelli, R.; Ghirarduzzi, A.; Ieran, M.; Pinotti, M.; Bernardi, F. The factor V Glu1608Lys mutation is recurrent in familial thrombophilia. *J Thromb Haemost* **2005**, *3*, 2032-2038, doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01453.x.
422. Traynis, I.; Jones, C.D.; Gibb, C.B.; Acharya, S.S.; Zehnder, J.L. First molecular characterization of a patient with combined factor V and factor VII deficiency. *Thromb Haemost* **2006**, *95*, 1031-1032, doi:10.1160/TH06-03-0177.
423. Castoldi, E.; Lunghi, B.; Mingozzi, F.; Muleo, G.; Redaelli, R.; Mariani, G.; Bernardi, F. A missense mutation (Y1702C) in the coagulation factor V gene is a frequent cause of factor V deficiency in the Italian population. *Haematologica* **2001**, *86*, 629-633.
424. Major, T.; Gindele, R.; Balogh, G.; Bardossy, P.; Bereczky, Z. Founder Effects in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *J Clin Med* **2021**, *10*, doi:10.3390/jcm10081682.
425. Major, T.; Gindele, R.; Szabo, Z.; Joni, N.; Kis, Z.; Bora, L.; Bardossy, P.; Racz, T.; Karosi, T.; Bereczky, Z. [Genetic diagnostics of hereditary hemorrhagic

- telangiectasia (Osler-Weber-Rendu disease)]. *Orv Hetil* **2019**, *160*, 710-719, doi:10.1556/650.2019.31380.
426. McDonald, J.; Bayrak-Toydemir, P.; DeMille, D.; Wooderchak-Donahue, W.; Whitehead, K. Curacao diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia is highly predictive of a pathogenic variant in ENG or ACVRL1 (HHT1 and HHT2). *Genet Med* **2020**, *22*, 1201-1205, doi:10.1038/s41436-020-0775-8.
 427. Hampshire, D.J.; Abuzenadah, A.M.; Cartwright, A.; Al-Shammari, N.S.; Coyle, R.E.; Eckert, M.; Al-Buhairan, A.M.; Messenger, S.L.; Budde, U.; Gursel, T., et al. Identification and characterisation of mutations associated with von Willebrand disease in a Turkish patient cohort. *Thromb Haemost* **2013**, *110*, 264-274, doi:10.1160/TH13-02-0135.
 428. Cote, H.C.; Lord, S.T.; Pratt, K.P. gamma-Chain dysfibrinogenemias: molecular structure-function relationships of naturally occurring mutations in the gamma chain of human fibrinogen. *Blood* **1998**, *92*, 2195-2212.
 429. Lane, D.A.; Southan, C.; Ireland, H.; Thompson, E.; Kehl, M.; Henschen, A. Delayed release of an abnormal fibrinopeptide A from fibrinogen Manchester: effect of the A alpha 16 Arg leads to His substitution upon fibrin monomer polymerization and the immunological crossreactivity of the peptide. *Br J Haematol* **1983**, *53*, 587-597, doi:10.1111/j.1365-2141.1983.tb07310.x.
 430. Chapman, J.; Dogan, A. Fibrinogen alpha amyloidosis: insights from proteomics. *Expert Rev Proteomics* **2019**, *16*, 783-793, doi:10.1080/14789450.2019.1659137.
 431. Ishiguro, K.; Kojima, T.; Kadomatsu, K.; Nakayama, Y.; Takagi, A.; Suzuki, M.; Takeda, N.; Ito, M.; Yamamoto, K.; Matsushita, T., et al. Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. *J Clin Invest* **2000**, *106*, 873-878, doi:10.1172/JCI10489.
 432. Liu, Y.; Kretz, C.A.; Maeder, M.L.; Richter, C.E.; Tsao, P.; Vo, A.H.; Huarng, M.C.; Rode, T.; Hu, Z.; Mehra, R., et al. Targeted mutagenesis of zebrafish antithrombin III triggers disseminated intravascular coagulation and thrombosis, revealing insight into function. *Blood* **2014**, *124*, 142-150, doi:10.1182/blood-2014-03-561027.
 433. Dementiev, A.; Petitou, M.; Herbert, J.M.; Gettins, P.G. The ternary complex of antithrombin-anhydrothrombin-heparin reveals the basis of inhibitor specificity. *Nat Struct Mol Biol* **2004**, *11*, 863-867, doi:10.1038/nsmb810.
 434. de la Morena-Barrio, M.E.; Martinez-Martinez, I.; de Cos, C.; Wypasek, E.; Roldan, V.; Undas, A.; van Scherpenzeel, M.; Lefeber, D.J.; Toderici, M.; Sevivas, T., et al. Hypoglycosylation is a common finding in antithrombin deficiency in the absence of a SERPINC1 gene defect. *J Thromb Haemost* **2016**, *14*, 1549-1560, doi:10.1111/jth.13372.
 435. Orlando, C.; Heylen, O.; Lissens, W.; Jochmans, K. Antithrombin heparin binding site deficiency: A challenging diagnosis of a not so benign thrombophilia. *Thromb Res* **2015**, *135*, 1179-1185, doi:10.1016/j.thromres.2015.03.013.
 436. Puurunen, M.; Salo, P.; Engelbarth, S.; Javela, K.; Perola, M. Type II antithrombin deficiency caused by a founder mutation Pro73Leu in the Finnish population: clinical picture. *J Thromb Haemost* **2013**, *11*, 1844-1849, doi:10.1111/jth.12364.
 437. Girolami, A.; Fabris, F.; Cappellato, G.; Sainati, L.; Boeri, G. Antithrombin III (AT III) Padua2: a "new" congenital abnormality with defective heparin co-

- factor activities but no thrombotic disease. *Blut* **1983**, *47*, 93-103, doi:10.1007/BF02482643.
438. Fitton, H.L.; Skinner, R.; Dafforn, T.R.; Jin, L.; Pike, R.N. The N-terminal segment of antithrombin acts as a steric gate for the binding of heparin. *Protein Sci* **1998**, *7*, 782-788, doi:10.1002/pro.5560070328.
 439. Tanaka, Y.; Ueda, K.; Ozawa, T.; Sakuragawa, N.; Yokota, S.; Sato, R.; Okamura, S.; Morita, M.; Imanaka, T. Intracellular accumulation of antithrombin Morioka (C95R), a novel mutation causing type I antithrombin deficiency. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 51058-51067, doi:10.1074/jbc.M210231200.
 440. Zhou, R.F.; Fu, Q.H.; Wang, W.B.; Xie, S.; Dai, J.; Ding, Q.L.; Wang, X.F.; Wang, H.L.; Wang, Z.Y. Molecular mechanisms of antithrombin deficiency in two Chinese families. One novel and one recurrent point mutation in the antithrombin gene causing venous thrombosis. *Thromb Haemost* **2005**, *94*, 1172-1176, doi:10.1160/TH05-06-0450.
 441. Miao, Y.; Bhattarai, A.; Wang, J. Ligand Gaussian Accelerated Molecular Dynamics (LiGaMD): Characterization of Ligand Binding Thermodynamics and Kinetics. *J Chem Theory Comput* **2020**, *16*, 5526-5547, doi:10.1021/acs.jctc.0c00395.
 442. Kraft, C.; Peter, M.; Hofmann, K. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol* **2010**, *12*, 836-841, doi:10.1038/ncb0910-836.
 443. Lecker, S.H.; Goldberg, A.L.; Mitch, W.E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* **2006**, *17*, 1807-1819, doi:10.1681/ASN.2006010083.

9 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.Ala163Val and p.Ala163Glu 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., Selmeczi, 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., Rácz, 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., Selmeczi, A., Oláh, Z., Ilonczai, P., Pfliegler, G., Marján, E., Nemes, L., Nagy, Á., Losonczy, H., Mitic, G., Kovacs, M., Balogh, G., Komáromi, I., Schlamadinger, 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, Selmeczi, A., Gindele, R., Ilonczai, P., Fekete, A., Komáromi, I., Schlamadinger, 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., Schlamadinger, 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., Erdődi, 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**. (Q1/D1)
IF: 13.265

20, **Bereczky, Z.**, Gindele, R., Fialat, S., Speker, M., Miklós, T., Balogh, L., Mezei, Z., Szabó, Z., Ádány, 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)

**10 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., Kőszegi, 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, Árokszállási, 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.**, Szőke, 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, Kovacs, 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, Frendl, 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, Kovacs, 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 ischaemias stroke Osler-Rendu-Weber kórban. *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., Rácz, T., Karosi, T., **Bereczky, Z.**: A hereditær haemorrhagias teleangiectasia (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., Rácz, 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., Dusse, 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., Rácz, 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., Fiatal, 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., Tanczos, 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., Tanczos, 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., Schlammadinger, 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., Szoboszlay, 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., Rác, 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, Natorka, J., Corral, J., de la Morena-Barrio, ME., Bravo-Pérez, C., Bagoly, Z., **Bereczky, Z.**, Trelinski, J., Witkowski, M., Klajmon, A., Undas, A., Zabczyk, 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.**, Fiatal, 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., **Bereczky, 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., **Bereczky 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)

11 CSOPORTOS (MULTICENTRIKUS) KÖZLEMÉNYBEN SZAKMAI KÖZREMŰKÖDŐ

Pfliegler, 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., **Bereczky, 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., Járai, Z., Joób-Fancsaly, 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., Pécsvárady, Z., Préda, I., Pucsok, 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., Vimpláti, L.

A thromboembolia kockázatának csökkentése és kezelése. *Orv. Hetil.* 150 (52), 2335-2404, **2009**.

12 SZERKESZTETT FELSŐOKTATÁSI TANKÖNYV, SZAKKÖNYV

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

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

13 FELSŐOKTATÁSI TANKÖNYV RÉSZEK

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

Bereczky, 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.

Bereczky, 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.

Bereczky, 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

14 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., Fiatal, 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.

15 TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

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

Tudományos közlemények	Szám		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)		7	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 folyóiratcikkek és a nem ismert lektoráltságú folyóiratban megjelent teljes folyóiratcikkek is		4	2	3
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		4	4	11
Ótalmak (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