

) )

**RIZIKÓ TÉNYEZŐK A VÉNÁS THROMBOEMBOLIÁS  
MEGBETEGEDÉSEK KIALAKULÁSÁBAN**  
(KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A FIBRINOLITIKUS RENDSZER SZEREPÉRE, VALAMINT  
A VELESZÜLETETT PROTEIN C HIÁNY VÉRALVADÁSI ÉS GENETIKAI  
DIAGNOSZTIKÁJÁRA)

PHD TÉZISEK

Dr. Dávid Marianna

I.sz. Belgyógyászati Klinika

Témavezető: Prof. Dr. Losonczy Hajna

I.sz. Belgyógyászati Klinika

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2001.

## 1. BEVEZETÉS

### 1.1. VÉNÁS THROMBOEMBÓLIÁS MEGBETEGÉDESEKRE VONATKOZÓ INCIDENCIA ADATOK

A thromboembóliás megbetegedések világszerte vezetnek a mortalitási statisztikákat. Epidemiológiai adatok szentli a mélyvénás thrombosis éves gyakorisága az átlag populációban kb. 150/100.000, az életkor előrehaladtával növekszik. A pulmonális embólia tünetekkel járó, de nem felírt formájának gyakorisága 20/100.000 lakos évente, a halálos kimenelű, boncolással diagnosztizált formáé 50/100.000 lakos. A pulmonális embólia ma is a kórházi betegek vezető haláloka. A krónikus végtelenség incidenciája 3 évvel a mélyvénás thrombosisi követően 35-69%, míg 5-10 év múlva 49-100% (a thrombosis kiterjedésétől függően).

Magyarországon évente több százezeren szenvednek a thrombosis következményeit és hazai irodalmi adatok alapján a thromboembóliás megbetegedésekből származó halálozás 20/100.000 lakos. A vénás betegségek mortalitása hazánkban az utóbbi két évtizedben gyakorlatilag megduplázódott.

### 1.2. A THROMBOPHILIA FOGALMA ÉS ÖRÖKLŐDÉSE A MONOGÉNIS FORMÁTÓL A MULTIGÉNISIG

Korábban a thrombophilia fogalma alatt vérszülletet thrombosis készséget értettek és az először felismert inhibitor defektusok (antithrombin-, protein C és protein S hiány, dysfibrinogenaemiák) okozta fokozott thrombosis készség leírására alkalmazták. Ezek az örökölt veitváradási rendelkezések önmagukban, szerzett rizikó tényezők jelenléte nélküli is hajlamosítanak thromboembóliás megbetegedések kialakulására és ismétlődésére. Klinikai jellemzőik a fiatal életkorban fellépő, ismétlődő, szokatlan lokalizációban jelentkező, gyakran családi halmozódást mutató elsősorban vénás thromboembóliák. Egeberg és mások munkái alapján gondolkodásunk az irányba terelődött, hogy a thrombophilia egy gént érintő, un. monogénis megbetegedés, autoszom domináns módon örökölődik, inkomplett penetranciával. Ezt az elképzelést 15-20 évvel később tovább támogatják azok a közlemények, melyek leírták a protein C és a protein S hiányt, valamint az ezekkel járó fokozott vénás thromboembólia rizikót.

A familiáris thrombophilák monogénis örökődése először 1965 táján kérdőjeleződött meg, amikor kiderült, hogy hereditler protein C hiány esetén a heterozigóta családtagok egy része egész életében tünetmentes marad (ez autoszóm domináns örökítés esetén nem lenne lehetséges). Mintha valamilyen egyéb tényező (fizikó faktor vagy másik genetikai zavar) jelentke is szükséges lenne a betegség manifesztálódásához. Két kérdés merült fel: az egyik, hogy a vérszülletet protein C hiány valóban fokozott thrombosis készséggel jár-e, a másik, hogy protein C hiányos családoknál egyéb genetikai rizikó faktor szerepel-e a thromboembóliás megbetegedések kialakulásában. Az első kérdés megválaszolására nem okozott nagyobb problémát. Meghatározták a protein C hiány prevencióját az egészséges populációban, valamint a thrombosison átesett betegekben, és igazolták, hogy a protein C hiány többszörösére fokozza a thromboembólia rizikót. A második kérdés megválaszolására azonban komoly nehézségekbe ütközött. Azokban az időben ugyanis az ismert genetikai rizikó faktorokkal (antithrombin-, protein C-, protein S hiány, dysfibrinogenaemiák) a vérszülletet thrombosis készséggel járó állapotoknak csak kb. 10-15%-a volt megmagyarázható még a thrombophiliasnak minősített családok esetében is, ezért kombinált defektus igazolni igen ritkán lehetett. 1983-ban jelentős változás következett be az aktivált protein C rezisztencia – egy gyakori, enyhébb rizikó tényező - feltételezésével és genetikai hátterének igazolásával. Hamarosan ismerté vált, hogy a vérszülletet protein C hiányban szenvedő betegek kb. 20%-a rendelkezik az V-s faktor un. Leiden mutációjával, melyet az aktivált protein C rezisztenciában szenvedő betegek mintegy 90-95%-ában lehetett igazolni. Ezáltal számos vizsgálat látott napvilágot, melyek már felvesítették a hereditler thrombophilia több génen keresztül, un. multigénis örökítésének lehetőségét.

Az utóbbi időben a thrombophilia fogalma kiszélesedett és a veleszületett ritkó tényezőknél kívüli a szerzett thrombosis készség fokozódások is beletartoznak. A thrombophilia fogalma alatt manapság (tágabb értelemben) a haemostasis azon örökítőit vagy szerzett rendellenességeit értjük, melyek thromboembóliás megbetegedések kialakulására hajlamosítanak.

### 1.3. A THROMBOEMBÓLIÁS MEGBETEGÉDESEK LÉTREJÖTTÉBEN SZEREPELT JÁTSZÓ PATOFIZIOLÓGIAI TÉNYEZŐK

A legfontosabb patofiziológiai tényezőket, melyek szerepet játszanak a thromboembóliás megbetegedések kialakulásában Virchow már 1856-ban közölte. Ezek az **érfal rendellenességei**, a vér áramlási tulajdonságainak (stasis), valamint összetevőinek (véralvadási zavar) megváltozása. Az egyes komponensek jelentősége azonban attól függően eltérő, hogy a thrombózis esemény a vénákban, az artériákban vagy a kiserekben jön létre. A fenti változásokban szerepet játszó kockázati tényezőket szerzett és veleszületettek lehetnek, valamint olyanok, melyek veleszületett és szerzett módon egyaránt kialakulhatnak.

### 1.4. SZERZETT KOCKÁZATI TÉNYEZŐK A VÉNÁS THROMBOEMBÓLIÁS MEGBETEGÉDESEK KIALAKULÁSÁBAN

- rosszindulatú daganatos betegségek (kompresszió, cancer procoagulans A termelés)
- szívelégtelenség (véna stasis)
- nephrosis szindróma (AT-III kiürülés a proteinuria részeként)
- varicosis (véna stasis)
- antitromboplasztikus (lupus antikoagulans, komplex haemostasis zavar)
- műtét (nagy hasi: VTE: 30%, elektív ortopédiai: MVT: 50-60%, PE: 2-30%)
- immobilizáció (gipsz rögzítés, agyi esemény következtében, posztoperatív állapot, stb.)
- terhesség (ritkó fokozódás: 4-7x, szabad protein S, antitrombin és aktivált protein C szint csökkentés, véna stasis)
- posztpartum időszak (ritkó fokozódás: további 2-3x)
- fogamzásgátlók (ösztrógen tartalom, ritkó fokozódás 2-8x)
- hormonpótló terápia (nőgyógyászatban és a prostata carcinoma terápia során)
- hyperviscositas szindrómával járó állapotok pl. polycythaemia vera, myeloma multiplex
- traumák (érfal károsodás, procoagulans anyag kiáramlás)
- obesitas (véna stasis)
- idős kor (véna stasis, véralvadás aktiváció)
- korábbi thromboembóliás megbetegedések

### 1.5. KOCKÁZATI TÉNYEZŐK, MELYEK VELESZÜLETETT ÉS SZERZETT MÓDON EGYARÁNT KIALAKULHATNAK

- hyperhomociszteinemia
- magas FVIII szint
- csökkent fibrinolitikus aktivitás

### A FIBRINOLITIKUS RENDSZER MŰKÖDÉSE ÉS A THROMBOEMBÓLIÁS MEGBETEGÉDESEK

Isacson 1972-ben hívta fel a figyelmet először a fibrinolitikus rendszer zavarára idiopathiás véna thrombosisok kapcsán. Véna okklúziós tesztet követően csökkent fibrinolitikus aktivitást észleltek thromboembóliában szenvedő betegek mintegy 30-50%-ában. Harbom és munkatársai

csökkent fibrinolitikus aktivitást igazoltak visszatérő idiopathiás thrombosisokban szenvedő betegek 86%-ánál, miközben szekunder melyvéna thrombosisok kapcsán csak 29%-ban fordult elő. Mindezek alapján arra következtetésre jutottak, hogy a csökkent fibrinolitikus aktivitásnak etiológiai szerepe lehet az ún. idiopathiás véna thrombosis kialakulásában. A későbbi vizsgálatok során a hypofibrinolízis hátterében először csökkent aktivált (t-PA), majd emelkedett inhibitor szinteket (PAI-1) igazoltak.

A globális fibrinolitikus tesztet alapján az a leggyakorszerűbb, hogy a fibrinolízis aktivációja és inhibitorja közötti egyensúly a legfontosabb tényező a fibrinolitikus kapacitás meghatározásában. Epidemiológiai vizsgálatok során felmerült a genetikai predispozíció lehetősége is:

1. PAI-1: a PAI-1 gén promotor régiójában ritk le egy specifikus inzerció/deleció polymorfizmus, melyben az egyik allel szekvencia 4 guanin, a másik 5 guanin tartalmaz. In vivo vizsgálatok alapján a 4 guanin tartalmú allelre homozigóta egyéneknél magasabb plazma PAI-1 koncentrációk észlelhetők. Egy fiatal férfiakon végzett vizsgálat során a 4G allel jelenléte 2x-s ritkó fokozódást jelentett coronaria thrombosis mellett, míg egy középkorú férfiakon végzett nagy vizsgálat nem talált összefüggést. Tehát a thrombosis ritkó mellett az eredmények ma még nem egyértelműek.

2. t-PA: összefüggést igazoltak a t-PA gén egy Alu-repeat-jében észlelhető inzerció/deleció polymorfizmus és a thromboembóliás megbetegedések között, ez az összefüggés azonban nem nyert bizonyítást az ECAT studyban.

Az euglobulin lízis idő mérése a human plazma globális fibrinolitikus aktivitásának meghatározására szolgál. A plazmából pH 5,3-nál kissapódó euglobulin frakció tartalmazza a fibrinolitikus enzimrendszert komponenseit a fibrinogénnel együtt, a gátló anyagok egy részének kivételével. Az euglobulin frakció feloldása és thrombinnal való megávasztása után az átvadék oldódási idejét regisztráljuk. Ebben a vizsgálati rendszerben az extrinsic plazminogén aktivációnak tulajdonítanak jelentőséget. Antit-PA antitestek alkalmazása megnyújta az euglobulin lízis időt.

Irodalmi adatok alapján nem igazolható összefüggés a t-PA antigén koncentrációja és az euglobulin lízis idő között, viszont szoros összefüggést találtak az euglobulin lízis idő és a PAI-1 antigén szintek, valamint az euglobulin lízis idő és a t-PA aktivitás között. Úgy tűnik, hogy a plazma euglobulin frakciójában a t-PA aktivitás meghatározásában a PAI-1 szinteknek jelentőségük van. Azonban, hogy pontosan mely aktivátor rendszerek érhettek még az euglobulin lízis idő kialakításában, az további vizsgálatokat igénylő probléma.

### 1.6. VELESZÜLETETT KOCKÁZATI TÉNYEZŐK A VÉNÁS THROMBOEMBÓLIÁS MEGBETEGÉDESEK KIALAKULÁSÁBAN

A hereditér thrombophilia genetikailag meghatározott hajlam elsősortban véna thromboembóliás megbetegedések kialakulására. Olyan primer hyperkoagulabilitás, mely az ismert, szerzett ritkó tényezőket jelentéle nélküli önmagában is képes thromboembóliás megbetegedéseket létrehozni, és jellemzi az ismétlődések fokozott kockázata is.

Manapság az alábbi veleszületett kockázati tényezők ismertek:

- antitrombinopathiák
- protein C hiány
- protein S hiány
- FV:Q506 (FV Leiden mutáció)
- FII G20210A allel jelenléte
- dysfibrinogenaemiák egyes típusai

Véletlenül történő, melyek ritkó szerepe nem egyértelműen bizonyított:  
thrombomodulin defektus, heparin kofaktor II hiány, plazminogén deficiencia, magas hiszidin-rich-  
glikoprotein szint, magas PAI-1 szint, PLA<sup>2</sup> allel jelenléte

**A HEREDITER PROTEIN C HIÁNY**

A hereditier protein C hiány autoszómálisan öröklődő megbetegedés, melynek heterozigóta formája mintegy 5-10-szeresére fokozza a vérs trombembólia rizikót. A ritkó jelenlétben nő egy másik inhibitor defektus, vagy környezeti rizikó tényező egyidejű jelenléte esetén. Thrombophilias betegben a protein C hiány prevalenciája 2-9%, fiatal betegek visszatérő vénás trombózisban esetén elérheti a 10-15%-ot. A heterozigóta protein C hiány prevalenciája az állagpopulációban relatíve magasabb: 0.1-0.3%, közülük a többség nem rendelkezik pozitív családi anamnézissel. Mivel a plazma protein C koncentrációját illetően átfeles figyelhető meg a normális egyének és a heterozigóta protein C hiányos betegek eredményei között, úgy tűnik, hogy a plazma protein C koncentrációja nem elsődleges meghatározója a megbetegedésnek. Gyakran mérhetetlen, vagy igen alacsony protein C koncentrációk mellett és a heterozigóta állapotok egy részében sem találunk klinikai tüneteket. Mindezek a körülmények dominánsnak hit örökletesmenet mellett felvetik a recesszíven öröklődő protein C hiány lehetőségét is.

Fenotípust illetően kétféle állapot különböztethető el:

**I-s típus:** gyakorlatban, a protein C aktivitás C molekulák csökkent stabilitása okoz.

**II-s típus:** a protein C biológiai aktivitásának csökkenése jellemzi (mind az anticoagulans aktivitást - koagulációs módszer, mind a szinleitikus szubsztárai miatt proteáz aktivítást illetően - amidolitikus módszer), megartott antigén koncentrációk mellett, abnormálisan működő protein C molekula szinleizációdása révén.

A protein C cDNK-1 és gént Foster klónozza és szekvenálta az 1980-as évek közepén. A gén a 2-s kromoszómán helyezkedik el q13-q14-es pozícióban, 11.6 kb hosszúságú, 9 exont és 8 intront tartalmaz, melyek közül az első exon nem kódol át. A protein C génje nagy homokógiát mutat más K vitamin dependens szerin proteázok génjével, mint a FII, FVII, FIX, FX és mai ismereteink szerint ennek az az oka, hogy ezek a gének egy közös géndóbtól fejlődtek ki.

Reitman és mial az 1995-ben megjelent protein C géntre vonatkozó mutációs adatbázisban a protein C genben előforduló abnormálisok egész sorát írták le. A 334 beteg 160 félé genetikai eseményt tartalmazó adatbázisban legnagyobb számban a missense mutációk (69%) fordulnak elő, melyek I-s típusú protein C hiányt okoztak és heterozigóta állapottal jártak.

Az adatbázisi áttekinve kiderült, hogy genetikai abnormálisok egész sora figyelhető meg a protein C gen mind a 9 exonjában, így protein C hiányos, thrombophiliasban szenvedő betegekben a teljes protein C gén genetikai vizsgálata indokolt. Nagyszámú beteg vizsgálata esetén a direkt szekvenálás rendkívül költség és időigényes procedúra. A szűrő módszerek elterjedése lehetővé tette, hogy a mutációt valamely génszakaszra lokalizáljuk és később a figyelmezt a mutáns génszakaszra irányítva végezzük el a szükséges szekvenálást. A polimeráz láncreakció (PCR) és a denaturáló grádiens gélelektroforézis (DGGE) kombinációját 1994-ben Gandrille és munkatársai alkalmazták először a protein C genben előforduló mutációk szűrésére. A módszer az alacsony guanin-citozin tartalmú exonok vizsgálatára alkalmas. Japán szerzők néhány éve PCR és egyláncú konformációs polimorfizmus vizsgálat (SSCP) kombinációját javasolták a protein C genben előforduló mutációk szűrésére.

A hereditier protein C hiány genetikai vizsgálatáról szóló adatok elsősorban a nyugati országokból és Japánból származnak. Magyarországon elsőként közlünk mutáció szűréssel és verifikálással kapcsolatos adatokat csökkent protein C anticoagulans aktivitással rendelkező betegekben.

**2. CÉLKITŰZÉSEK**

**2.1. A FIBRINOLITIKUS RENDSZER MŰKÖDÉSÉVEL KAPCSOLATOS VIZSGÁLATAINK CÉLKITŰZÉSEI**

1. Az euglobulin lizis idő (ELI), valamint a t-PA és a PAI-1 aktivitások, a t-PA és a PAI-1 antigén szintek között összefüggés vizsgálata 27 egészséges önkéntesben annak megállapítására, hogy mely aktivátor vagy inhibitor rendszer játszik szerepet az euglobulin lizis idő meghatározásában.
2. Okklúziós tesztet követően mért euglobulin lizis idő eredmények alapján az önkéntesek responder státuszának megállapítása majd a fibrinolízis vizsgálatok (t-PA és PAI-1 aktivitások, t-PA és PAI-1 antigén szintek, plazminogén, anipazmin) értékelése a responder csoportokat figyelembe véve.
3. A fibrinolitikus aktivitás (ELI, t-PA és PAI-1 aktivitások, t-PA és PAI-1 antigén szintek) longitudinális változásának vizsgálata 4 egymást követő héten ismételt mérések segítségével 12 egészséges önkéntesben.

4. A responder státusz változásának vizsgálata a fibrinolízis 4 hetes longitudinális elemzése során egészséges önkéntesekben, vagyis annak meghatározása, hogy a jfi és a rosszul reagáló státusz a követési idő alatt mindvégig változatlan marad, vagy mutató elérést bizonyos önkéntesek esetében.

5. Fibrinolízis vizsgálatok (euglobulin lizis idő, t-PA és PAI-1 aktivitás okklúziós tesztet megelőzően és azt követően) végzése hereditier antithrombopathias betegben annak megállapítására, hogy a fibrinolitikus rendszer zavara milyen szereppel bír ezen betegek thrombembóliás megbetegedéseinek kialakulásában.

6. Hemorrolgiái: (plazma és teljes vér viszkozitás; erythrocyta aggregáció), vetravadási és genetikai vizsgálatok (protein C, protein S aktivitás, lupus anticoagulans, FV Leiden mutáció, FII 20210A allel jelenléte, MTHFR C677T mutáció) végzése hereditier antithrombopathias betegben annak megállapítására, hogy egyéb szerzett és veleszületett rizikó tényezők milyen szerepet játszanak ezen betegek thrombembóliás megbetegedéseinek kialakulásában.

**2.2. A CSÖKKENT PROTEIN C AKTIVITÁSSAL RENDELKEZŐ BETEGEKEN VÉGZETT VERALVADÁSI ÉS GENETIKAI VIZSGÁLATAINK CÉLKITŰZÉSEI**

1. Célunk volt vizsgálni, hogy csökkent protein C aktivitással rendelkező betegeknek és családtagjaiknak (34 család 47 tagjánál) milyen gyakorisággal észlelhetők genetikai defektusok a protein C genben.
2. Mely genetikai defektusok fordulnak elő gyakrabban hazánkban a hereditier protein C hiányos betegek között ?
3. Milyen egyéb inhibitor defektusok észlelhetők az alacsony protein C aktivitással és a protein C genben mutációval rendelkező betegekben ?
4. A genetikai defektus meghatározása-e a klinikai kép alakulását ?
5. Van-e összefüggés a protein C aktivitások alakulása és a FV:Q506 jelenléte között ?

6. Mi a jelentősége a genetikai vizsgálatoknak hereditier protein C hiányban?

7. A protein C genben mutációval nem rendelkező, alacsony protein C aktivitású betegek vérváradási és egyéb genetikai vizsgáihi eredményeinek értékelése.

8. Alkalmassak-e az iodolomban ajánlott szűrő módszerek (denaturáló gradiens gélelektroforézis - DGGE, egyláncú konformációs polimorfizmus vizsgálat - SSCP) a protein C genben előforduló mutációk szűrésére?

9. Új, eddig nem közölt genetikai eltérések leírása magyar protein C hiányban szenvedő betegekben.

### 3. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. A FIBRINOLITIKUS RENDSZER VIZSGÁLATA

##### 3.1.1. ÖNKÉNTESK, BETEGEK

A korrelációs vizsgálatokba, valamint a raszporder státusz megállapítását célzó vizsgálatokba 27, a fibrinolitikus longitudinális változásának vizsgálatába 12 egészséges önkéntest vontunk be.

Mindkét vizsgálatba bevont önkéntesek írásbeli beleegyezést nyújtottak, a vizsgálatokat az POTE Etikai Bizottságának engedélyével folytattuk a 90-es évek elején.

Az antithrombinopáthiás betegekben végzett fibrinolitikus, hemoreológiai- és részletes vérváradási, valamint genetikai vizsgálatok 11 veleszületett antithrombin defektusban szenvedő betegnél történtek.

##### 3.1.2. VÉRMINTÁK

A vérvételeket cubitalis vénából végeztük 3,8%-os trinátrium citrátot tartalmazó csövekbe (1:9 arányban) reggel 8 óra és 9.30 között 12 óras éhezéssel és 30 perces nyugalmi periódussal követően. A t-PA és PAI-1 aktivitás és antigén szint meghatározáshoz szükséges vérvételek Stabilye csövekbe történtek (MONOVETTE, CHROMOGENIX), melyek a thrombocytá PAI-1 kármentes megakadályozására alacsony pH-t biztosítanak, citrátot, teophyllint, adenint tartalmaznak. A vérvételek, valamint a plazma elkészítés és feldolgozás fibrinolitikus vizsgálatokhoz a Leiden Fibrinolytic Workshop ajánlásainak megfelelően történt.

#### 3.1.3. VÉRALVADÁSI LABORATÓRIUMI MÓDSZEREK:

Egészséges önkénteseken és antithrombinopáthiás betegekben végzett fibrinolitikus vizsgálatok: Az euglobulin lizis idő mérése Kowalski módszere szerint történt, a t-PA aktivitást COATEST BIA t-PA, a PAI-1 aktivitást COATEST PAI reagensekkel (CHROMOGENIX), a t-PA és PAI-1 antigén szinteket ELISA módszerrel, COALIZA t-PA és COALIZA PAI-1 reagensekkel (CHROMOGENIX) Dynatech ELISA Readeren mértük. A plazminogént és az antiplazmin COATEST Plazminogén és Antiplazmin reagensekkel (KABI), a D-dimert Latex D-dimer (KORDIA), a fibrinogént Thromborel S (BEHRING) reagensekkel mértük.

Az antithrombinopáthiás betegekben végzett egyéb vérváradási és hemoreológiai vizsgálatok: Az antithrombin aktivitás meghatározáshoz IL Antithrombin-4, az antithrombin antigén meghatározáshoz anti-human antithrombin III poliklonális antitestet (DAKO) használtunk (rakéta elektroforézis módszer Laurell szerint), az antithrombin III fenéje abnormalitás vizsgálatára kéldimenzós keresztjezt

immunoelktroforézist végeztünk. A protein C aktivitás és protein S aktivitás mérés IL ProC1at illetve IL Protein S reagensekkel történt. A teljes vér és plazma viszkozitás meghatározások a POTE I. sz. Sebészeti Klinika akkor még működő Hemoreológiai Laboratóriumával együttműködésben történtek HEVIMET 40 kapilláris viszkoziméteren. Az erythrocyta aggregáció meghatározásokat MYRENNE MA-1 aggregométeren végezték ugyanott.

Vénás okklúziós teszt: Az euglobulin lizis időt, a t-PA és a PAI-1 aktivitásokat vénás okklúziós tesztet követően is meghatároztuk. Az első vérvételt követően vényomásmérő mandzsettát helyeztünk a felkarra és 20 percet fejtünk a szisztolés- diasztolés középnyomásra. Ezt követően a vérvételt ugyanaból a végtagból megismételtük.

Protokoll a fibrinolitikus longitudinális vizsgálatához: Euglobulin lizis idő, t-PA és PAI-1 aktivitás meghatározások történtek vénás okklúziós tesztet megelőzően és azt követően az 1., a 7., a 14., a 21. és a 28. napon. t-PA és PAI-1 antigén szintek mérésére az 1. és a 28. napon került sor, vagyis 4 héten keresztül követjük a fibrinolitikus aktivitás alakulását egészséges önkéntesekben.

Genetikai vizsgálatok: Az antithrombinopáthiás betegekben elvégeztük a FV: Q506 (Leiden mutáció), FII 20210A allel jelenlétére és az MTHFR C677T pontmutációra vonatkozó vizsgálatokat. A vizsgálatok fagyasztott vérmintákból évekkkel a fibrinolitikus vizsgálatokat követően történtek. A defektusok többsége a 1990-es évek elején még nem volt ismert.

Statisztikai elemzések: Az adatokat átlag ± standard deviáció (SD) formájában adtuk meg. Spearman féle korrelációs koefficiens számítások történtek bizonyos adatok közötti összefüggések meghatározása céljából. 95%-os konfidencia intervallumokat számítottunk. A szignifikancia számítások kétnemű t-próba segítségével történtek. A becsült relatív rizikóra vonatkozó számításokhoz  $\chi^2$  próbát alkalmaztunk.

#### 3.2. BETEGEK, VALAMINT VÉRALVADÁSI ÉS GENETIKAI MÓDSZEREK A HEREDITER PROTEIN C HIÁNY DIAGNOSZTIKÁJÁBAN

##### 3.2.1. BETEGEK

Az elmúlt 4 évben 300 vénás thromboembóliában szenvedő betegnél történtek klinikánkon részletes vérváradási, immunológiai és genetikai vizsgálatok hereditier thrombophilía irányában. Az elvégzett vizsgálatok alapján az alábbi veleszületett és szerzett thrombositikussággal járó állapotokat azonosítottuk:

<u>Antithrombinopáthia:</u>			
I. típus	6 beteg	Összesen:	(7.6%)
II. típus	13 beteg		
<u>Protein C hiány:</u>			
I. típus	15 beteg	Összesen:	(8.6%)
II. típus	11 beteg		
<u>Protein S hiány:</u>			
I+III. típus	24 beteg	Összesen:	(11.6%)
II. típus	11 beteg		
<u>APC rezisztencia:</u>			
	89 beteg		(29.8%)
<u>Lupus anticoagulans:</u>			
	11 beteg		(3.6%)

<b>Hyperhomocisztémiemia:</b>	57 beteg	(19%)
<b>FV.G506 (Leiden mutáció)</b>		<b>Allélfrekvencia:</b>
Homozigóta:	13 beteg	8,6%
Heterozigóta:	68 beteg	(22,6%)
<b>Összesen:</b>	81 beteg	(APC rezisztensek 91%-a)
<b>FII 20210A allél</b>		<b>Allélfrekvencia:</b>
Homozigóta:	0 beteg	6,6%
Heterozigóta:	20 beteg	
<b>Összesen:</b>	20 beteg	
<b>MTHFR C67T mutáció</b>		<b>Allélfrekvencia:</b>
Homozigóta:	39 beteg	26%
Heterozigóta:	132 beteg	(44%)
<b>Összesen:</b>	171 beteg	44%

A betegek 43%-nál recidivált a thromboembóliás megbetegedés, szignifikáns különbség volt észlelhető a hereditár thrombophilával rendelkező és nem rendelkező betegek recidíva kétsége között ( $p=0,0042$ ). Ugyancsak szignifikáns különbséget igazoltunk a kumánin kezelésben részesülő és nem részesülő betegek recidíva aránya között ( $p<0,0001$ ).

Kromikus vértás elégtelenség szignifikánsan nagyobb számban alakult ki thrombophilias betegekben ( $p = 0,001$ ), a thrombophilia okozta relatív rizikó náruk: 2,16 volt (95%-os konfidencia intervallum: 1,36- 3,43). Ulcus cruris ugyancsak szignifikánsan gyakrabban volt észlelhető veleszületett thrombosiskészséggel rendelkezőknél ( $p= 0,0016$ ), a thrombophilia okozta relatív rizikó 5,1-nek bizonyult (95%-os konfidencia intervallum: 1,66- 15,6).

A thrombophilia frányában vizsgált betegek közül 26 család 38 családtagjánál (300 betegből 8,6%-ban) mértünk ismételt vizsgálati alacsonyabb protein C anticoagulans aktivitást. Prof. Sas Géza jóvoltából módunk nyílt Budapestben, az Országos Hematológiai és Immunológiai Intézetben gondozott, thrombophilia irányú vizsgálatok során alacsony protein C anticoagulans aktivitással rendelkező 8 család 9 tagjának vizsgálatát is elvégezni. Összesen tehát 34 család 47 tagjánál, 39 thromboembólián átesett betegben és 8 egészséges családtagon történtek részletes vérérvadási és genetikai vizsgálatok.

### 3.2.2. VÉRÁLVADÁSI LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATOK ÉS PLAZMA HOMOCISZTEIN SZINT MEGHATÁROZÁS PROTEIN C HIÁNYOS BETEGEKBEN

A vérérvadási vizsgálatok 1:9 arányú 3,8%-os trinitium citráttal akvárdagságotlított vérből történtek. A Protein C anticoagulans aktivitásának meghatározását IL (Instrumentation Laboratories) ProCiot reagenssel végeztük, a protein C antigén szintek meghatározását anti- human protein C polyclonális antitesttel (DAKO) Laurell féle rakéta elektrofórezis módszerrel (185). Az AT-III aktivitás meghatározásához IL Antithrombin, az antithrombin antigén szintek méréséhez anti- human antithrombin polyclonális antitesttel (DAKO) végzett Laurell féle rakéta elektrofórezis módszert alkalmaztuk, a protein S aktivitás meghatározásához IL Protein S, a prothrombin aktivitás/INR és a fibrinogén meghatározásához STAGO Neoplastine reagens, a plazminogén és az aniliplaszmin szintek meghatározásához IL Plasminogen, IL Alpha-2-antiplasmin reagenssel, az APC hányados meghatározásához Behring APC resistance kit-et, a lupusz anticoagulans meghatározásához STAGO APTT-LA reagenset használtunk. Valamennyi nem citált metódika a rutin vérérvadási módszerek közé tartozik.

A tartós orális anticoagulans kezelésben részesülő betegeknél a kumánin leállítását követően kis molekulatömegű heparin prophylaxist alkalmaztunk 2 héten keresztül. A vérértékek 30 perces nyugalmi állapotot követően, minden esetben normális P-TRINR értékek mellett történtek.

A plazma homocisztein szint meghatározások a PTE, AOK, Közponi Klinikai Kémiai Intézetben történtek Ilix homocisztein immunoassay módszerrel Ilix Analyser segítségével.

### 3.2.3. GENETIKAI VIZSGÁLATOK PROTEIN C HIÁNYOS BETEGEKBEN

#### GENOMIKUS DNS IZOLÁLÁS

A genetikai vizsgálatok a Fachhochschule Jena Biologia Tanszékével kollaborációban történtek. A betegek perifériás vértének tehervérseljtéből Chelex 100 segítségével, módosított Walsh módszerrel genomikus DNS-t izoláltunk.

#### POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ

A protein C gén vizsgálatokhoz a PCR reakcióhoz használt primernek a 9c. exon részre kifejlesztett reverz primer kivételével meggyeztek a Gandille és munkatársai által közöltékkel. A 9c. exon részre tervezett reverz primer szekvenciája a következő volt: TGT GCT TGT TAC ATG TCC CTT. A DGGE-t megelőzően végzett PCR reakció sajátossága, hogy a primerpárok egyikének 5' végéhez egy guanin-citozin tartalmú oligonert kapcsolunk, ez az ún. G-C clamp. A guaninban-citozinban gazdag szekvencia arteficiálisan képes létrehozni egy magas olvadáspontú domént és ezzel az általunk vizsgált genszakasz egy alacsonyabb stabilitású doménben helyezni. Ez azért fontos, mert a vizsgálandó genszakasznak az első olvadó doménben kell elhelyezkedni ahhoz, hogy a denaturáló graduens gtelektrofórezis során biztosan egyfánnyá váljon és ezáltal alkalmas legyen az értékelésre. A 9s. exont, a protein C gén leghosszabb kódoló genszakaszát 3, a 3-s. exont 2. átfedő szegmensekben amplifikáltuk.

A heteroduplex képződés fokozása érdekében az amplifikálást követően egy speciális denaturáló-renaturáló hőprogramot alkalmaztunk, elősegítve ezzel a DNS kettős szálak denaturációját majd renaturációját, mely fokozott heteroduplex képződéssel jár heterozigóta állapotokban.

#### DENAURÁLÓ GRÁDIENS GÉLELEKTROFÓREZIS (DGGE)

Valamennyi amplifikátumot, melyet előzőleg denaturáló-renaturáló hőprogramnak tettünk ki 4M ureát és 30% formamidot, mint denaturáló ágenseket tartalmazó 6,5%-os poliakrilamid gélben futtatjuk 300V feszültséggel MOPS pufferben. Egy bizonyos urea koncentrációtól bekövetkezik a részleges olvadás, melynek során a guanin-citozinban gazdag szakasz (G-C clamp) még összerakja a DNS-t, tehát kétfázisú, miközben a vizsgálandó genszakasz egyfánnyá válik. Ez a koncentráció különözőzik heteroduplex és homoduplex képződés esetén. A részleges olvadás az elektrofórezis mobilitás diámai csökketéséhez vezet és ezáltal éles csík jelenik meg az elektrofórezis során.

#### EGYLANCÚ KONFORMÁCIÓS POLIMORFIZMUS (SSCP) VIZSGÁLAT

A magas G-C tartalmú exonok esetében (exon 4 és 5), valamint a 6, 8 és 9c exonész esetében az SSCP analízis bizonyult a legeredményesebbnek. Az egylanccú DNS szájak komplex struktúrákat képeznek, sajátos alakzatot vesznek fel, s ez befolyásolja elektrofóretikus mobilitásukat. Egyetlen bázis cseréje megváltoztatja ezt a konformációt, valamint ezzel együtt a DNS elektrofóretikus mobilitását, s így lehetővé teszi mutációk identifikálását.

#### DNS SZEKVENÁLÁS

A DGGE vagy SSCP analízis során aberráns migrációt mutató amplifikált genszakaszokat ABI PRISM 310-es szekvenáló autonoma segítségével, dideoxy módszerrel szekvenáltuk.

#### FV.0506 LEIDEN MUTÁCIÓ VIZSGÁLATA

Genomikus DNS izolálás történt Chelex 100 segítségével, majd PCR reakciókat végeztünk. Ezt követően a termékeket *Msp*-1 restrikciós endonukleázzal emésztettük és 1%-os agaróz gélben futattuk.

#### FII G20210A ALLEL VIZSGÁLATA

És6 lépésben genomikus DNS izolálás történt Chelex 100 segítségével módosított Walsh módszer szerint, majd a mutáns allelt tartalmazó génszakaszt ampifikáltuk PCR segítségével és SSCP vizsgálatot végeztünk a genetikai eltérés detektálására.

#### AZ MTHFR C677T PONTMUTÁCIÓ GENETIKAI VIZSGÁLATA

A melien-tetrahidrofolát redukáz (MTHFR) enzim géntípusát előforduló pontmutáció (C677T) vizsgálata genomikus DNS izolálást követően PCR módszerrel történt. Majd az ampifikátumot *Hinf* I restrikciós endonukleázzal emésztettük és 3%-os agaróz gélben futattuk.

#### 4. EREDMÉNYEK

#### 4.1. A FIBRINOLITIKUS RENDSZER VIZSGÁLATA SORÁN NYERT EREDMÉNYEK

##### 4.1.1. ÖSSZEFGGÉS AZ EUGLOBULIN LÍZIS IDŐ VALAMINT A t-PA AKTIVITÁS, A PAI-1 AKTIVITÁS, A t-PA ANTIGÉN ÉS A PAI-1 ANTIGÉN SZINTEK KÖZÖTT

Erős negatív korrelációt igazoltunk egészséges önkéntesekben az euglobulin lízis idő (ELI) és a t-PA aktivitások között ( $r = -0.70, p < 0.001, Y = -0.0017x + 1.15$ ). Gyengébb pozitív korreláció igazolható az ELI és a PAI-1 aktivitás között ( $r = 0.55, p < 0.05, Y = 0.05x - 2.1$ ). Vizsgálataink nem igazoltak korrelációt az ELI és a t-PA antigén, valamint az ELI és a PAI-1 antigén szintek között.

##### 4.1.2. A RESPONDER STATUSZ VIZSGÁLATA, JÓL ÉS ROSSZUL VÁLASZLÓ ÖNKÉNTESEK

Megfigyeltük, hogy a 20 perces vénás okklúzió követően mért euglobulin lízis idő alapján az egészséges önkéntesek 2 csoportra voltak oszthatók. A rosszul válaszoló csoportban az okklúziós tesztet követően az ELI 100 percen túli volt, a jól válaszoló csoportban 100 perc alatt. Nem volt különbség a 2 csoport között az önkéntesek életkorát, t-PA antigén szintjét, plazminogén, antipazminin és fibrinogén szintjét illetően. Szignifikáns különbséget észleltünk az önkéntesek euglobulin lízis idejét ( $p < 0.001$ ) és t-PA aktivitását illetően ( $p = 0.05$ ) a jól és rosszul reagáló csoportok között. Szignifikáns különbség a PAI-1 aktivitásokat illetően a jól és a rosszul reagáló csoport között.

Az ELI szempontjából elsősorban az okklúziós tesztet követően mért értékekben észlelhető a szignifikancia a két csoport eredményei között, a jól reagálókra mértük a szignifikánsan rövidebb euglobulin lízis időt. A t-PA aktivitást illetően ugyancsak mind okklúziós tesztet megelőzően, mind azt követően különbség volt észlelhető, a jól reagálókra szignifikánsan magasabb t-PA aktivitást mértünk.

A jelenség megvártaztait a PAI-1 antigén szintek mérésekor tudtuk megadni. A rosszul válaszoló csoportban szignifikánsan magasabb PAI-1 antigén szinteket detektáltunk ( $p = 0.01$ ), mely felelős lehet a rosszul reagáló alacsonyabb szabad t-PA aktivitásért.

##### 4.1.3. A FIBRINOLITIKUS AKTIVITÁS LONGITUDINÁLIS VIZSGÁLATÁNAK EREDMÉNYEI

Nem észleltünk statisztikailag szignifikáns változást az euglobulin lízis időt, a t-PA aktivitást és a PAI-1 aktivitást illetően a 4 hetes periódusban az egészséges önkéntesekben. A PAI-1 aktivitásban tapasztalható volt ugyan fluktuáció, de a változások a normál értéken belül maradtak.

##### 4.1.4. A JÓL ÉS A ROSSZUL REAGÁLÓ STATUSZ VÁLTOZÁSA

Az 1. néhen 6 önkéntes tartozott a jól reagáló, 6 a rosszul reagáló csoportba. A vizsgált hetek során kiderült, hogy vannak önkéntesek, akik mindig a jól reagáló (4 fő), akik mindig a rosszul reagáló

(4 fő) csoportba tartoztak és voltak olyanok, akik változtatták a responder státuszukat (4 fő). Tehát az önkéntesek 2/3-a mutatót konstansan reagáló státusz. Utóbbinak jelentősége lehet fibrinolitikus vizsgálatok tervezésekor, szükséges tehát a responder státusz rendszeres ellenőrzése.

##### 4.1.5. A FIBRINOLÍZIS VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI HEREDITER ANTITHTROMBINOPATHIÁS BETEGEKEN

A fibrinolitikus rendszer vizsgálata során 6/11 családnál észleltünk csökkenést az okklúziós teszt eköti fibrinolitikus aktivitásban euglobulin lízis idő módszer alkalmazásával. Okklúziós tesztet követően pedig 7/11 családnál. A t-PA aktivitás okklúziós teszt utáni értéke 1 esetben bizonyult alacsonyabbnak, PAI-1 aktivitás emelkedés viszont 6/11 család esetében volt észlelhető. Vagyis a vizsgált családok több, mint felénél a veleszületett inhibitor defektus mellett a fibrinolitikus rendszer működésének zavara megfigyelhető volt.

##### 4.1.6. ÖSSZEFGGÉS A HEREDITER ANTITHTROMBINOPATHIÁK ÉS A HEMOREOLÓGIAI PARAMÉTEREK ALAKULÁSA KÖZÖTT

A teljes vér viszkozitás 4/11 családnál, a plazma viszkozitás 6/11 családnál volt emelkedett, a vörösvérsejt aggregációt 1 esetben észleltük fokozottnak. A feltűnően gyakran plazma viszkozitás emelkedés minden esetben a keresztveztet immunoelektroforézis módszerrel káros fehérjével rendelkezéssel fordult elő.

##### 4.1.7. EGÉB VELESZÜLETETT ÉS SZERZETT RIZIKÓ TÉNYEZŐK, VALAMINT A HEREDITER ANTITHTROMBINOPATHIA KAPCSOLATA

A vizsgált rizikó tényezők közül 3 beteg rendelkezett az FV Leiden mutáció heterozigóta formájával, 4 beteg a melien-tetrahidrofolát redukáz enzim géntípusát előforduló C677T pontmutációra bizonyított heterozigótának. FII 20210A allel jelenlétét vizsgálataink egyetlen antitrombinopathiás betegnél sem igazolták. A protein C és S aktivitások, a lupusz antikoaguláns megnehatározás eredménye valamilyen betegnél normális vagy negatív volt.

#### 4.2. A VELESZÜLETETT PROTEIN C HIÁNYOS BETEGEK VÉRÁLVADÁSI ÉS GENETIKAI VIZSGÁLATA SORÁN NYERT EREDMÉNYEK

##### 4.2.1. A PROTEIN C GÉNBEN MUTÁCIÓVAL RENDELKEZŐ BETEGEK VÉRÁLVADÁSI VIZSGÁLATÁNAK EREDMÉNYEI

A mutációval rendelkező 15 család 25 családtagja közül 21 I-s típusú protein C hiányban szenvedett (csökkent protein C aktivitás és antigén szintek), 4 családtagnál igazoltunk II-s típusú protein C hiányt (normális antigén szintek mellett csökkent protein C aktivitás), 3 családnál magasabb fibrinogén szinteket észleltünk, antitrombinopathia I. típus: 1 család 2 tagjánál II. típus: 2 család 3 tagjánál volt detektálható, APC rezisztencia 5 család (a mutáns családok 33,3%-a) 10 tagjánál igazolható. Közülük 1 beteg homozigóta, 9 beteg heterozigóta volt a vizsgált mutációra.

##### 4.2.2. A PROTEIN C GÉNBEN VÉGZETT MUTÁCIÓ SZÜRÉS EREDMÉNYEI

A mutációkat SSCP esetében a migrációban észlelhető különbség alapján, DGGE esetében a heteroduplex képződés okozta abnormális elektroforézis mobilitás alapján detektáltuk.

15 család 25 tagjánál (a vizsgált családok 43%-ánál) igazoltuk a fenti szűrőmódszerekkel mutáció jelenlétét, 8 esetben SSCP, 17 esetben DGGE segítségével.

##### 4.2.3. A DNS SZEKVENÁLÁS EREDMÉNYEI

Vizsgálatainkkal 23 esetben 9 téle missense mutáció (közülük három új mutáció), 1 esetben nonsense mutáció és 1 esetben ritka frameshift deleció igazolható. Valamennyi mutációval rendelkező beteg és családtag heterozigótának bizonyult a vizsgált mutációt illetően.

Két különböző missense mutációt igazoltak vizsgálataink két család esetében a protein C gen 3-s exonjában, melyek közül az egyik új, eddig nem közölt mutáció (1493 A – G, 35 Asp – Gly, PROTEIN C PÉCS 2). Ez a mutáció a PROC gen G1a doménjában foglal helyet, közeli ahhoz a helyhez, mely összetartja a G1a domént az EGF- szerű doménnal. A genetikai elérés 1-s típusú protein C hiányt okozott. A 3-s exon másik missense mutációja (1432 C – T, 15 Arg – Trp) szerepel az 1995-ben kiadott protein C mutációkat tartalmazó adatbázisban.

Egy probandnál a 7-s exon nonsense mutációját (157 Arg-Stop codon képződés) igazoltuk, mely 1-s típusú protein C hiányt és a protein C thrombin általi aktivációjának zavarát okozta. Egy új missense mutáció is igazoltunk a 7-s exonban (6231 G – A, 173 Gly – Glu, PROTEIN C PÉCS 3), mely 11-s típusú protein C hiányt okozott. Ez a mutáció igen közel helyezkedik el az aktivációs haslási helyhez (Arg 169 – Leu 170), ahol a thrombin hatására a fehérje nehezláncáról egy dodekapeptid hasad le.

Hat különböző missense mutáció és egy frameshift deleció igazolódott a 9-s exonban 20 családban esetében a protein C genben, tehát magyar betegekben ez volt a mutációk által leggyakrabban érintett exon. 11-s típusú protein C hiányt okozó új mutációt sikerült igazolni egy családban (8476 C – T, 254 Thr – Ile, PROTEIN C PÉCS). A mutáció a katalitikus domént érinti, igen közel van a katalitikus triád egyik tagjához (Asp257), nem látható meg a protein C genben előforduló mutációk 1995-ben közölt adatbázisában és az azóta közölt irodalomban sem, és cs-szerepét mutat a családban előforduló thrombembóliás megbetegedésekkel. Az új mutációt PROTEIN C PÉCS-nek neveztük el. A többi igazolt missense mutáció megtalálható az 1995-ben közölt mutációs adatbázisban.

Ritka frameshift deleciót igazoltunk egy betegnél a 9-s exonban (8796-8801 del G, 364Met Trp, 378 Stop). A beteg heterozigótának bizonyult a vizsgált defektusra, melyet a mutációs adatbázis ugyan említt egy esetben, de kizárólag személyes kommunikáció alapján tudtunk hivalkozás nélkül. Fenotípusi jellemző 1-s típusú protein C hiányt okozott, jelentősen csökkent protein C aktivitás és antígeno szintekkel.

#### 4.2.4. A PROTEIN C GENBEN MÚTÁCIÓVAL NEM RENDELKEZŐ BETEGEK EREDMÉNYEI

A vizsgált 34 protein C hiányos családból 19 család 22 tagjánál nem igazolódott mutáció a protein C genben ismételt alacsony protein C antikoaguláns aktivitások mellett, de verifikáltunk egyéb genetikai illetve vérváradási eltéréseket. 11 család esetében (a mutációra negatív családok 58%-ában) a protein C aktivitás ismételt halatreszinek bizonyult (60-70% között). 1 családnál észleltünk alacsony protein S aktivitást, 9 családnál alacsony APC rezisztenciát igazoltak vizsgálataink. Valamennyi APC rezisztens családnál (a mutációra negatív családok 47%-ánál) igazolódott az V-s faktor Leiden mutációja. 3 esetben homozigóta, 6 esetben heterozigóta formában. Egy 6 heles csecsemőnél a máj éretlen szekréciós kapacitása és homozigóta FV:Q506 Leiden mutáció jelenléte igazolódott. Lupus antikoaguláns 2 családban volt detektálható, mindkét esetben FV:Q506 mutációval kombinálódva. 2 családban igazoltunk prothrombin gén mutációt (G20210A allel jelenléte). 1 esetben protein S hiánytal, 1 esetben FV:Q506 mutációval kombinálódva.

8 család esetében (a mutációra negatív családok 23%-ában) semmiféle genetikai elérés nem igazolódott az ismételt szignifikánsan alacsony protein C aktivitások hátterében sem szűrt módszerekkel, sem szekvenálással. Ez megfelel az irodalmi adatoknak (kb. 20%).

#### 4.2.5. ÖSSZEÜGGÉS A PROTEIN C AKTIVITÁS ÉS A FV:Q506 (LEIDEN MUTÁCIÓ) ELŐFORDULÁSA KÖZÖTT

Az 300 venás thrombembólián átesett beteg adatai felidőzozva megfigyelhető volt, hogy a FV:Q506 (Leiden mutáció) jelenlétekor csökken a protein C aktivitás, heterozigóta esetekben kb. 20%-kal, homozigóta esetekben kb. 30%-kal. Homozigóta FV:Q506 (Leiden mutáció) fennállta esetén a protein C aktivitás csökkenés szignifikáns ( $p < 0,001$ ), mind a Leiden mutációt nem hordozók protein C aktivitásához, mind a mutáció heterozigóta formájával rendelkezőkhöz viszonyítva.

### 5. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

#### 5.1. A FIBRINOLITIKUS RENDSZER VIZSGÁLATA SORÁN NYERT EREDMÉNYEINK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Erős negatív korrelációt igazoltunk az euglobulin lizis idő (ELI) és a t-PA aktivitás között, valamint gyengébb pozitív korrelációt az ELI és a PAI-1 aktivitás között egészséges önkéntesekben. Nem igazolódott korreláció az ELI és a t-PA antígeno, valamint az ELI és a PAI-1 antígeno szintek között. Megállapítottuk tehát, hogy a t-PA az az aktivátor, mely szerepet játszik a plazma euglobulin frakciójának feloldódásában, vagyis az euglobulin lizis idő az extrinzik fibrinolizist reprezentálja, elsősorban a humán plazma t-PA aktivitását.

2. A vénás okklúziós tesztet követően mért euglobulin lizis idők alapján az egészséges önkéntesek jól és rosszul reagáló csoportra voltak oszthatók.

Szignifikáns különbség volt észlelhető az euglobulin lizis időket és a t-PA aktivitásokat illetően a két csoport eredményei között. A jól reagáló csoportban szignifikánsan rövidebb euglobulin lizis időt és magasabb t-PA aktivitásokat mértünk. Ennek hátterében az a tény állhat, hogy a rosszul reagálók csoportjában több férfi önkéntes volt és ismert, hogy a férfiak fibrinolitikus kapacitása csökkent a nőkhöz viszonyítva. Ennek oka az alacsonyabb t-PA aktivitásban, magasabb PAI-1 aktivitásban, magasabb t-PA és PAI-1 antígeno szintekben keresendő. A nembei különbségen kívül lehetséges magyarázat, hogy a rosszul reagáló csoportban szignifikánsan magasabb PAI-1 antígeno szinteket mértünk. Vagyis a PAI-1 antígeno szint fontos szerepet játszik a t-PA aktivitás meghatározásában elsősorban a t-PA/PAI-1 komplexek létrejöte révén.

3. Az irodalomban elsőként közöttünk a fibrinolitikus longitúdinalis vizsgálata során nyert eredményeket. Megállapítottuk, hogy az ELI, a t-PA és a PAI-1 aktivitásokon, valamint a t-PA és a PAI-1 antígeno szinteken nem volt szignifikáns változás a vizsgált 4 hetes periódusban. De ezek mögött a relatíve konstans átlagértékek mögött a normál egyének mutathatnak jelentős különbségeket fibrinolitikus aktivitásaikat illetően. A jól és rosszul reagálók csoportját kialakítva a posztokklúziós eredmények maradtak inkább konstansnak, az okklúziós teszt ekötiek már mutattak változásokat, elsősorban a t-PA aktivitást és a PAI-1 aktivitásokat illetően.

4. A rezponder státusz a betegek többségénél (2/3-ánál) 4 hetes longitúdinalis analízis során konstans maradt. A rosszul reagáló státusz klinikai jelentőségének meghatározása egészséges önkéntesekben további követést igényel, 2 évvel a vizsgálatot követően végzett felmérés során az önkénteseknél thrombembóliás megbetegedés nem fordult elő.

5. Az antithrombinopatiás betegekben végzett fibrinolitikus vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy a betegek több, mint felénél társult abnormalitásként a fibrinolitikus rendszer zavara is észlelhető volt, és ez fokozta a betegek thrombembólia rizikóját. Ezeknél a betegeknél az euglobulin lizis idő megnyúlását és emelkedett PAI-1 aktivitást igazoltak vizsgálataink.

6. Az antithrombinopatiás családokon végzett hemoreológiai vizsgálatok eredményei alapján a betegek 60%-ánál magasabb plazma-, és kb. 40%-ánál magasabb teljes vér viszkozitás volt igazolható. A viszkozitási paraméterek alakulása szerepet játszik az antithrombinopatiás betegek thrombembóliás megbetegedéseinek kifejlődésében. Az erythrocyta aggregációban érdemi változás vizsgálataink nem igazoltak. FV: Q506 (Leiden mutáció) 3 betegnél, MTHFR C677T allel jelenléte 4 betegnél igazolódott. Protein C és S hiány, FII 20210A illetve lupus antikoaguláns egyidejű jelenléte nem észleltük.



## 5.2. A CSÖKKENT PROTEIN C AKTIVITÁSSAL RENDELKEZŐ BETEGEK VÉRÁLVADÁSI ÉS GENETIKAI VIZSGALATI EREDMÉNYEINEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- 34 alacsony protein C aktivitással rendelkező család 45 tagjánál végeztünk részletes véralvadási és genetikai vizsgálatokat. Közülük 15 családban 25 tagjánál igazoltuk vizsgálatunk mutációt a protein C génben (44%), közülük három új, az irodalomban eddig nem közölt mutációt, melyek PROTEIN C PÉCS, PROTEIN C PÉCS 2 és PROTEIN C PÉCS 3 néven kerültek regisztrálásra. A 23 családban 9 téle missense mutáció, 1-nél nonsense mutáció és 1 esetben ritka frameshift deleció igazolódott. Valamennyi mutációval rendelkező beteg és családtag heterozigótának bizonyult a vizsgált mutációt illetően.
- A leggyakoribb mutáció típus magyar protein C hiányos betegekben a 9-s exon missense mutációja (8604 G – A, 297 Val – Met), mely a katalitikus régióban helyezkedik el. A mutáció szerepét az 1995-ben közölt adatbázisban. Valamennyi betegnél és családtagnál I-s típusú protein C hiányt okozott.
- Egyéb véralvadási és genetikai eltérések a protein C génben mutációval rendelkező családoknál: 15 család 25 családtagja közül 21 fő I-s típusú, 4 fő II-s típusú protein C hiányban szenvedett. 3 családban magasabb fibrinogén szinteket észleltünk, antithrombinopathia I. típus: 1 család 2 tagjánál, II. típus: 2 család 3 tagjánál volt detektálható, APC rezisztencia 5 család 10 tagjánál igazolódott (közülük 1 beteg heterozigóta, 9 beteg heterozigóta volt a FV:Q506 mutációra). Vagyis a protein C génben mutációval rendelkező betegek és családtagok 40%-a rendelkezett a FV Leiden mutációjával, prothrombin gén mutáció nem volt igazolható.
- Irodalmi adatok, a protein C géne vonatkozó mutációs adatbázis és saját vizsgálatunk alapján megállapíthatjuk, hogy veleszületett protein C hiány esetében az igazolt missense mutációk egyértelmű összefüggése a kialakult fenotípussal, vagy a klinikai képpel nem igazolható. Ugyanazon mutációk egyik családban I-s, másikban II-s típusú protein C hiányt hozhatnak létre. A sipó kodoni letehető mutációk és deleciók azonban legtöbb esetben I-s típusú protein C hiányt okoznak és súlyosabb klinikai képpel járnak. Indokolt tehát az adatbázis bővítése, hogy a probléma további kikutatására lehetőség nyíljon.
- Eredményeink alapján FV:Q506 (Leiden mutáció) jelenlétekor csökken a protein C aktivitás (heterozigóta esetben kb 20%-kal, homozigóta esetben kb 30%-kal). A Leiden mutációra homozigóta állapot statisztikailag szignifikáns csökkenést okozott thromboembolián átesett betegek protein C aktivitásában.
- A genetikai vizsgálatok jelentőségét a normálisnál alacsonyabb protein C aktivitással rendelkező betegekben az adja, hogy segítségével lehetünk azonosítottak a mutációval rendelkező betegek, akiknél a veleszületett protein C hiány diagnosztika egyértelműen megérthető. Ők már az első thromboembolias eseményüket követően tartós, akár élethosszig tartó anticoaguláns kezelésre szorulnak. Ugyancsak indokolt a borderline protein C aktivitással rendelkező (60 – 70% közötti) betegek genetikai vizsgálata is, hiszen közülük is kerülnek ki mutációt hordozó betegek. A határesetű protein C aktivitással rendelkező betegek jelentős része azonban nem rendelkezik veleszületett protein C hiánnyal, így nem szorul tartós anticoaguláns kezelésre. A véralvadási módszerek nem mindig nyújtanak elegendő segítséget a betegség biztos diagnózisához (ismeret tény, hogy átfelel figyelhető meg a normális egyének és a heterozigóta protein C hiányos betegek protein C antigén szintje között).

7. A vizsgált 34 protein C hiányos családból 19 család 22 tagjánál nem igazolódott mutáció a protein C génben ismételten alacsony protein C anticoaguláns aktivitások mellett. A mutációra negatív családok csaknem 60%-ában a protein C aktivitás ismételen határozatnak bizonyult (60-70% között). A mutációra negatív családok 47%-ánál APC rezisztenciát igazoltunk, egyéb véralvadási vizsgálati eredmények negatívak voltak. Valamennyi APC rezisztens családban igazolódott az V-s faktor Leiden mutációja, 3 esetben homozigóta, 6 esetben heterozigóta formában.

8 család esetében (a vizsgált családok 23%-ában) semmilyen genetikai eltérés nem igazolódott az ismételten szignifikánsan alacsony protein C aktivitások és antigén szintek hátterében sem szűrt módszerekkel, sem szekvenálással. Ez megfelel az irodalmi adatoknak (kb. 20%). Primeren az exonok (átrfodó génszakaszok) és az exon-intron junctionok vizsgálatára alkalmasak, de az irodalmi álláspontnak megfelelően nem kerül sor a nem átrfodó génszakaszok (intronok) genetikai vizsgálatára. Nagyobb jelentőséggel bírhatnak a protein C géntől távoli eső, de a gén expresszióját befolyásoló reguláló szekvenciák, vagy transzkripciós faktorok (HNF1, HNF3, HNF6, PCE1 stb.), utóbbiak az átrfodás stimulálásában vagy gátlásában vesznek részt, és mutációk jelenléte nélkül is képesek befolyásolni a protein C fehérje koncentrációját.

8. Az általunk alkalmazott szűrő módszerek (PCR+ DGGE, PCR+ SSCP) saját vizsgálatunk és irodalmi adatok alapján alkalmazhatók a protein C génben előforduló mutációk igazolására. A protein C gen 1-s exonjára vonatkozó szűrő módszer a gen 1-s exonját és a promotor régiót is vizsgálja, így a promotor régiót érintő mutációk is verifikálhatók segítségével. A szűrő módszerrel azonosítás esetén egyetlen esetben sem tudtunk DNS szekvenálással mutációt igazolni a protein C génben, s ez módszereink megbízhatóságát jelzi. Fontos, hogy a szűrő módszerek jelentősen csökkentik a szekvenálás számát, így idő és költségkímélő eljárásoknak tarthatók.

9. Három új, korábban az irodalomban nem közölt mutációt írtunk le a protein C génben:  
 PROTEIN C Pécs (9-s exon, 8476 C – T, 254 Thr – Ile),  
 PROTEIN C Pécs 2 (3-s exon, 1493 A – G, 35 Asp – Gly),  
 PROTEIN C Pécs 3 (7-s exon, 6231 G – A, 173 Gly – Glu)  
 Igazoltunk még egy ritka frameshift deleciót (8796-8801 del G, 364Met – Trp, 378 Stop), melyet a protein C géne vonatkozó mutációs adatbázis kizárólag személyes kommunikáció alapján és nem irodalmi hivatkozással említi.

Mintegy 40 éve ismert, hogy a vénás thrombosis örökítő megbetegedés lehet. Azóta a koagulációs és a fibrinolitikus rendszer számos új komponense vált ismertté és vizsgálat tárgyává ritkó tényező iránban. Jelenleg 6 abnormális elfogadott, mint egyértelmű genetikai ritkó tényező, ezek az antithrombin, protein C, protein S deficienciák, a dysfibrinogénemia, a FV:Q506 (Leiden) mutáció és a 20210A álléi jelenléte a prothrombin génben. Korábban feltételezték, hogy a familiáris thrombosisokat egy domináns gén defekusa okozza. Napjainkban a hereditier thrombophiliiá multigénes örökítősségi megbetegedésnek tekintjük, ahol más, eddig ismeretlen gének is fontos szerepet játszanak, befolyásolva ezzel a megbetegedés penetranciáját. Jelenleg a legfontosabb feladat új ritkó faktorok megismerése, mivel a thrombophilias családok 30-40%-ánál egyik ma ismert ritkó tényező sem lehet igazolni. Ezekben a családokban nagy valószínűséggel ma még ismeretlen ritkó faktorok jelenléte okozta a thromboembolias megbetegedéseket.

A témával kapcsolatos közlemények és absztraktok jegyzéke:

Folyóirat közlemények:

1. Losonczy, H., Nagy, I., Dávid, M.: Effects of various doses of SP 54 on fibrinolytic activity in patients with thrombotic diseases. *Folia Haematol. (Leipzig)*, 1988, 115, 388-393.
2. Losonczy, H., Dávid, M., Nagy, I.: Effect of pentosan polysulfate on activated partial thromboplastin time, thrombin time, euglobulin clot lysis and on tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor activities in patients with thromboembolic disease. *Semin. Thrombos. Hemostas.*, 1991, 17, 394-398.
3. Dávid, M., Losonczy, H.: Correlation between ECLT, t-PA and PAI-1 activity and antigen levels in healthy volunteers. *Fibrinolysis* 1994, 8, Suppl. 2, 31-33.
4. Losonczy, H., Dávid, M., Alizadeh, H., Scholz, M.: Longitudinal analysis of fibrinolysis in healthy volunteers. *Perfusion* 1994, 7, Suppl. 2, 19-24.
5. Dávid, M., Losonczy, H., Nagy, I.: Genetic analysis of fibrinolysis in healthy volunteers. *Orvosi Hetilap*, 1999, 140, (3), 125-132.
6. Nagy, Ágnes, Melegh Béla, Dávid, M., Alizadeh Hussain, Kocsis, Mária, Vidra Tímea, Molnár Lenke, Szomor Árpád, Losonczy, H.: Genetikai vizsgálatok szerepe veralváadási betegségek diagnosztikájában. *Magyar Belorvosi Archivum*, 1999, 52, 67-72.
7. Dávid, M.: A heveny tüdőembólia antikoaguláns kezelése nem frakcionált és kis molekulatömegű heparinnal. *Hepain indukálta thrombocytopenia. Medicina Thoracalis* 2000, 53, 41-46.
8. Dávid, M., Losonczy, H., Sas, G., Nagy, Á., Kulcsér, G., Meyer, M.: Identification of mutations in 15 Hungarian families with hereditary protein C deficiency. *British Journal of Haematology* 2000, 111, 129-135.
9. Kuslós, T., Szabó, I., Dávid, M.: Fragminnal szerzett tapasztalataink arthroplasticán átesett orvopediatriai betegek prolongált prophylaxisában. *Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet, Plasztikai Sebészet* 2001, 44, 1, 28-38.
10. Dávid, M.: Vele született és szerzett thrombosis készség, diagnosztikai és terápiai kérdések. *Transzfúzió* 2001, 34, 6, 35-49.

Könyvtelések:

1. Losonczy, H., Nagy, I., Dávid, M.: SP 54 loading test. Its significance in the indication and control of long term SP 54 therapy. In: *Thrombosis and Haemorrhagic disorders*. Eds.: H. Sinzinger, H. Vranzner. Medicus Verlag, 1989, pp. 336-431.
  2. Dávid, M., Losonczy, H., Nagy, I.: 250 és 500 mg orálisan alkalmazott Natrium-Pentosanpolysulfate (PPS) hatása a haemostasis egyes paramétereire. In: *PPS Symposium*. Ed.: Kollár L. 1991, pp. 9-22.
  3. Dávid, M., Losonczy, H.: The examination of the fibrinolytic system in healthy volunteers. *Trends in Haemostasis* 1995, Eds. H. Losonczy, M. Dávid, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1995, pp. 39-46.
  4. Losonczy, H., M. Dávid, Alizadeh, H.: 'Good' and 'bad' responders to stimulation of fibrinolysis in healthy volunteers. *Trends in Haemostasis* 1995, Eds: H. Losonczy, M. Dávid, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1995, pp. 28-38.
  5. Nagy, Á., Losonczy, H., Dávid, M., Melegh, B., Schröder, W., Hermann, F.H.: Prevalence of Factor V(G1691A) Mutation in South-West Hungarian Thrombophilia Patients. In: *Molekulárgenetik Hereditärer Hämostasederekte*. Ed: F.H. Hermann, Pabst, 1996, pp. 117-124.
  6. Nagy, Á., Schröder, W., Dávid, M., Molnár, L., Hussain, A., Hermann, F.H., Losonczy, H.: Homozygous Form of Leiden Mutation Combined with Type II Inversion in two Hemophilic Patients. In: *Molekulare (DNA) Diagnostik Hereditärer Hämostasederekte*. Ed: F.H. Hermann 5. Greifswalder Hämophilie - Tagung 1998, pp. 54-57.
  7. Losonczy, H., Nagy, Á., Dávid, M., Bathányi, I., Szócs, A., Ötkényi, M., Meyer, M.: Clinical Features of 26 Thrombophilia Patients with Heterozygous FV:Q506 Mutation. In: *Molekulare (DNA) Diagnostik Hereditärer Hämostasederekte*. Ed: F.H. Hermann 5. Greifswalder Hämophilie - Tagung 1998, pp. 175-184.
- Könyvszerkesztés:
1. *Trends in Haemostasis* 1995. Eds: H. Losonczy, M. Dávid Akadémiai Kiadó, Budapest, 1995.

Műhely absztraktok levezéke:

1. Losonczy, H., Nagy, I., Dávid, M.: Effect of 250 and 500 mg pentosan polysulfate on t-PA and PAI-1 activity. Abstract. Thrombos. Haemostas. 1991. 65. 1133.
2. Losonczy, H., Dávid, M., Nagy, I., Menyhai, G.: Treatment of chronic venous insufficiency (CVI) with the combination of coumarin and pentosan polysulfate (PPS). Thrombos. Haemostas. 1993. 69. 1056.
3. Losonczy, H., Dávid, M., Batyány, I., Horváth, L.: Successful treatment of an anticoagulant caused abdominal vein thrombosis with combination of coumarin and sodium pentosan polysulfate (PPS). Thrombos. Haemostas. 1993. 69. 1216.
4. Losonczy, H., Dávid, M., Batyány, I., Horváth, L.: Abdominal vein thrombosis caused by pill in a young patient with later manifesting myelo-proliferative disease (Therapeutical problems). Magyar Belorv. Arch. Suppl. 1993. Vol. 46. 50.
5. Losonczy, H., Dávid, M., Alizadeh, H., Scholz, M.E.: "Good" and "bad" responders to stimulation of fibrinolysis in healthy volunteers. Thromb Haemost 1995. (Suppl) 73:1147.
6. Dávid, M., Nagy, A., Losonczy, H.: Coagulation and genetic analysis of a family with inherited resistance to activated protein C. Abstr. Haemostasis 1996. 26/3. 490.
7. Losonczy, H., Nagy, A., Dávid, M., Odegaard, O.R.: Activated Protein C Resistant Cases Combined with Protein S Deficiency. Haemostasis 1996. 26/3. 495.
9. Nagy, A., Dávid, M., Melegh, B., Losonczy, H.: FV:Q506 (Leiden) mutáció előfordulása thrombophilias betegségeknél. Magyar Belorv. Arch. 1997. Suppl. 50. 1. 33.
10. dr. Nagy Agnes, dr. Dávid Marianna, dr. Melegh Béla, dr. Losonczy Hajna: Hematológiai betegségek genetikai diagnosztikája. Magyar Belorv. Arch., 1997. Suppl. 50. 2. 108.
11. Dávid Marianna, Michael Meyer, Losonczy Hajna: A hereditár Protein C hiány genetikai diagnosztikája. Magyar Belorv. Arch. 1997. Suppl. 50. 2. 109.
12. Losonczy, H., Nagy, A., Dávid, M., Kecskés, M., Vidra, T., Nagy, I.: Inherited coagulation inhibitor defects in Hungarian Thrombophilia Patients. Haemostasis 15th International Congress on Thrombosis, Antalya, Turkey, 1998. 244.

13. Nagy, A., Melegh, B., Dávid, M., Kecskés, M., Vidra, T., Losonczy, H.: Prevalence of factor V(G1,961) mutation in Hungarian population and in venous thrombophiliacs. Haemostasis. 15th International Congress on Thrombosis, Antalya, Turkey, 1998. 400.
14. Dávid, M., Losonczy, H., Nagy, A., Kutscher, G., Meyer, M.: Mutation screening in Hungarian subjects with low protein C activity. Haemostasis. 15th International Congress on Thrombosis, Antalya, Turkey, 1998. 432.
15. Nagy Agnes, Dávid Marianna, Melegh Béla, Alizadeh Hussain, Losonczy Hajna: Leiden-mutáció prevalenciája magyar populációkban egészséges egyéneknél és vénás betegségeknél. Magyar Belgyógyász Társaság XXXVII. Nagygyűlése, Budapest, 1998. Magyar Belorvosi Archivum, 1998. S3. 279.
16. Meyer, M., Dávid, M., Kutscher, G., Eberl, W., Vogel, G., Losonczy, H.: Mutation spectra in German and Hungarian Protein C deficient patients with venous thrombosis. Thromb. Haemostas 1999. Aug. Suppl. S2358.

Előadások egyéb absztraktokkai:

1. Losonczy, H., Nagy, I., Dávid, M.: Die Wirkung verschiedener Dosen von SP 54 auf die Fibrinolytische Aktivität bei Patienten mit thrombotischen Erkrankungen. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Hematologie und Onkologie 1987. Würzburg, No. 376.
2. Losonczy, H., Nagy, I., Dávid, M.: SP 54 terhelés és kezeltés fibrinolysis csökkentéssel járó thromboembóliákban. XII. Hematológiai Napok Budapest 1988. Abstr. vol. p.80.
3. Losonczy, H., Nagy, I., Dávid, M.: Pentosan polysulfate (SP 54) in the primary and secondary prevention of thromboembolic diseases. V. Czechoslovak-Hungarian Symposium of the Hematologic and Transfusologic Societies. Banská Bystrica, 1990. Abstr. vol. p.17.
4. Losonczy, H., Dávid, M., Nagy, I.: Effect of Pentosan Polysulfate on the t-PA and PAI levels in patients with thromboembolic disease. Chicago Satellite Symposia of the Xth International Congress on Fibrinolysis. 1990. Abstract Book p. 98.
5. Losonczy, H., Dávid, M., Alizadeh, H.: Longitudinal analysis of fibrinolytic activity in healthy volunteers. 9th Meeting of the Danubian League Against Thrombosis and Haemorrhagic Disorders. Abstracts. Series Coagulation Eds.: F. Komalik, Z. Vorlová, H. Vinazer. 1994. p.39.

6. Nagy, A., Schröder, W., Dávid, M., Mochár, L., Hermann, F.H., Losonczy, H.: Bleeding symptoms in two patients with haemophilia A carrying type II inversion and homozygous form of Leiden mutation. 29. Hamophile-Symposium 1998 in Hamburg, S72.
7. Dávid, M., Losonczy, H., Sas, G., Nagy, A., Kulcsner, G., Meyer, M.: A hereditár Protein C hiányról 35 magyar család genetikai vizsgálata alapján. (referátum) A Magyar Thrombosis és Haemostasis Társaság V. Kongresszusa, 1999. (Absztraktok) MTHHT Program 8.
8. Losonczy, H., Nagy, A., Dávid, M.: Velestíeltet thrombophilák Dél-Dunánál. A Magyar Thrombosis és Haemostasis Társaság V. Kongresszusa, 1999. (Absztraktok) MTHHT Program 15.
9. Nagy, A., Dávid, M., Losonczy, H.: Kombinált defektusok jelentősége thromboembolias megbetegedésekben. A Magyar Thrombosis és Haemostasis Társaság V. Kongresszusa, 1999. (Absztraktok) MTHHT Program 16.
10. Alizadeh Hussain, Nagy Agnes, Molnár Lenke, Dávid Martanna, Szomor Árpád, Vidra Tímea, Losonczy Hajna: Kurrainecrosis és heparin okozta Quinke-ödemra egy esetünk kapcsán. A Magyar Belgyógyász Társaság Dunántúli Szekciójának XLVI. Vándorgyűlése, Zalaegerszeg (Absztraktok), 1999. Magyar Belorvosi Archivum, suppl. 1, 1999, S49.
11. Dávid, M., Losonczy, H., Sas, G., Nagy, A., Kulcsner, G., Meyer, M.: Genomic analysis of hereditary protein C deficiency in 35 Hungarian families. Thrombophilia and Haemophilia. Clinical and Genetical Aspects. International Symposium, Pécs, 1999. S21.
12. Losonczy, H., Nagy, A., Dávid, M., Kecskés, M., Vidra, T., Szomor, A.: Inherited Thrombophilias in Hungarian Patients. Thrombophilia and Haemophilia. Clinical and Genetical Aspects. International Symposium, Pécs, 1999. S23.
13. Losonczy, H., Nagy, A., Dávid, M., Kecskés, M., Vidra, T., Szomor, A.: Inherited Thrombophilias in Hungarian Patients. XVth Meeting of the International Society of Haematology, 1999. Durban. Suppl. TH 4.
14. Dávid, M., Losonczy, H., Nagy, A., Kulcsner, G., Meyer, M.: Screening methods in the genetic analysis of Hungarian subjects with hereditary protein C deficiency. XVth Meeting of the International Society of Haematology, 1999. Durban. Suppl. TH 16.