

Vascularis Ehlers-Danlos szindróma genetikai és nemlineáris optikai vizsgálata

Genetic analysis and nonlinear optical imaging of vascular Ehlers-Danlos syndrome

KISS NORBERT DR.^{1,2}, BOZSÁNYI SZABOLCS^{1,2}, FÉSŰS LUCA DR.^{1,2},
HALUSZKA DÓRA DR.^{1,2}, LŐRINCZ KENDE DR.¹, KUROLI ENIKŐ DR.¹,
HÁRSING JUDIT DR.¹, MÁYER BALÁZS DR.¹, KÁRPÁTI SAROLTA DR.¹,
FEKETE GYÖRGY DR.³, SZIPÓCS RÓBERT DR.^{2,4}, WIKONKÁL NORBERT DR.¹,
MEDVE CZ MÁRTA DR.¹

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai
Klinika, Budapest¹,

Magyar Tudományos Akadémia Wigner Fizikai Kutatóközpont Szilárdtest-fizikai és Optikai
Intézet, Budapest²,

Semmelweis Egyetem, II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika, Budapest³

R&D Ultrafast Lasers Kft., Budapest⁴

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők a ritka, örökletes kötőszöveti betegségek közé tartozó, multidiszciplináris jelentőségű vascularis Ehlers-Danlos szindrómára vonatkozó korszerű ismereteket foglalják össze. A szindróma vezető tünetei - az ízületi hiper mobilitás, a bőr hiperextenzibilitás és az általános szöveti fragilitás - elsősorban az életminőséget rontják, azonban szövődményei súlyos, fatális kimenetelű komplikációkhoz vezethetnek. A szerzők a genotípus-fenotípus korreláció vizsgálata során klinikai, valamint a nemlineáris optikai képalkotás szolgáltatotta adatok elemzése mellett molekuláris genetikai vizsgálatokat végeztek. A bőrgyógyászati gyakorlatban a vascularis Ehlers-Danlos szindróma által érintett betegek azonosítása a gondozás feladatainak meghatározását és ezáltal a szövődmények megelőzését szolgálja.

Kulcsszavak:
**Ehlers-Danlos szindróma –
nemlineáris mikroszkópia
– kollagén szerkezet**

SUMMARY

The authors summarize the recent understanding of a rare, hereditary connective tissue disorder with multidisciplinary significance, vascular Ehlers-Danlos syndrome. Leading symptoms of the disease – articular hypermobility, skin hyperextensibility and general tissue fragility – mainly impair quality of life, however they can lead to severe, fatal complications. During genotype-phenotype correlation analysis the authors conducted extensive clinical examination, nonlinear optical imaging and molecular genetic tests. The identification of patients affected by Ehlers-Danlos syndrome in dermatology practice serves the determination of tasks in medical care and thus, the prevention of complications.

Key words:
**Ehlers-Danlos syndrome –
nonlinear microscopy
– collagen structure**

Az Ehlers-Danlos szindróma (EDS) jellemzőit mutató betegekről már *Hippokratész* is említést tett „A levegőről, a vizokről és a helyekről” című művében, a szindróma első pontos leírására azonban csak a XX. század elején került sor *Edward Ehlers* és *Henri-Alexandre Danlos* által (1). Az EDS örökletes kötőszöveti betegségek heterogén csoportja, mely-

re ízületi hiper mobilitás, bőr hiperextenzibilitás és általános szöveti fragilitás jellemző számos egyéb eltérés mellett. Gyakori szövődményei a különböző mértékű ízületi ficamok, a lassú sebgyógyulás, és az életminőséget talán a leginkább rontó fájdalom (2). Az EDS ún. ritka betegség, amely 5000 emberből egyet érint világszerte (3).

Levelező szerző: Medvecz Márta dr.

e-mail: medvecz.marta@med.semmelweis-univ.hu

Az évek során számos klasszifikáció született a klinikailag és genetikailag igen különböző EDS típusok csoportosítására. Az 1986-ban megjelent „*Berlini Nozológia*” az örökletes kötőszöveti betegségeket kategorizálja, az EDS-en kívül egyebek mellett a Marfan-szindróma és a pseudo-xanthoma elasticum klasszifikációját is tartalmazza. Ez a nozológia 11 különböző EDS altípust különböztet meg (4). Ezt a besorolást az 1997-ben megjelent és közel 20 éven át világszerte széleskörűen alkalmazott *Villefranche Nozológia* követte (3), amely hat klinikai altípust különített el egymástól. Ezek a klasszikus (cEDS), hipermobilis (hEDS), vascularis (vEDS), kyphoscoliosis (kEDS), arthochalias (aEDS) és dermatosparaxis (dEDS) altípusok voltak. A legújabb nemzetközi konszenzuson alapuló EDS klasszifikáció 2017-ben jelent meg, amelyben a korábbi *Villefranche Nozológiát* egészítették ki a klasszikus-szerű (clEDS), cardio-valvularis (cvEDS), a Brittle Cornea szindróma (BCS), a spondylo-displastikus (sEDS), a musculocontracturalis (mcEDS), myopathias (mEDS) és a periodontalis (pEDS) altípussal a legújabb genetikai kutatások eredményei alapján (5-14).

A legtöbb EDS altípus kollagenopátia, így háttérükben valamely kollagén típus szintézisét meghatározó gén mutációja áll, ugyanakkor egyes altípusok háttérében a myomatrix funkcióját vagy a glükózaminoglikán szintézist befolyásoló, valamint a komplement rendszer elemeit alkotó vagy egyéb extra- és intracelluláris folyamatokban résztvevő molekulák génjeinek mutációi állnak (5). Az új nozológiában mindegyik klinikai altípust major és minor kritériumok alapján definiálták, melyek között azonban nagy az átfedés és ezek alapján sokszor az altípusok elkülönítése egymástól nehézséget okoz. (15, 16).

A vascularis típusú Ehlers-Danlos szindróma (vEDS; OMIM 130050) egy viszonylag ritka, autoszomális domi-

nánsan (AD) öröklődő forma. A vEDS diagnózisára gyakran későn, csak egy súlyos szövődményekkel járó artériaruptúra után derül fény (17). A vEDS genetikai hátterét leggyakrabban a *COL3A1* gén (az alpha 1(III) prokollagén láncokat kódolja) valamelyik heterozigóta statusban hordozott mutációja határozza meg, amely, de a betegek kisebb hányadában a *COL1A1* mutáció oki szerepe is igazolható (5). A vEDS fenotípus háttérében így döntően a III. típusú, kisebb részben az I. típusú kollagén szintézisének zavara vagy hibás fehérje keletkezése áll, ezek felelősek a vEDS jellegzetes klinikai tüneteinek kialakulásáért (18). A vEDS major és minor klinikai kritériumai az *1. táblázatban* olvashatók (5).

Az EDS molekuláris genetikai diagnosztikájában elsősorban az új-generációs szekvenálás (next-generation sequencing, NGS) alkalmazandó, amely számos különböző gén párhuzamos szekvenálására ad lehetőséget, mint például a *COL5A1*, *COL5A2*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL3A2*, további, EDS-ban szerepet játszó gének mellett. Ha NGS technikával a klinikai gyanú ellenére nem azonosítható genetikai eltérés, akkor gén kópiaszám variáció analízis végezhető (copy number variation, CNV), amellyel nagyobb deléciókat vagy duplikációkat tudunk vizsgálni. Ezt követheti, illetve kiegészítheti a teljes exom (whole exome sequencing - WES) vagy a teljes genom szekvenálás (whole genome sequencing - WGS). Ha a klinikai fenotípus alapján valamely EDS típus egyértelműen azonosítható, akkor a releváns gént direkt bidirekcionális Sanger-szekvenálással vizsgálják (19).

A nemlineáris optika mikroszkópiai módszerek olyan új, neminvazív képalkotó technikák, melyek jelenleg preklinikai bőrgyógyászati kutatások tárgyát képezik, és megjelenésük a klinikumban a következő évtized során várható. A der-

EDS altípus és rövidítése	Klinikai tünetek		Öröklődés	Érintett fehérje	Genetikai háttér		
	Major kritériumok	Minor kritériumok					
Vascularis EDS (vEDS)	1.	pozitív családi anamnézis: kimutatott <i>COL3A1</i> mutáció	1.	zúzódások traumás behatás nélkül és/vagy szokatlan helyeken (orca, hát)	AD	III. típusú kollagén	<i>COL3A1</i>
	2.	artéria ruptúra korai életkorban	2.	vékony, áttetsző bőr, áttűnő vénákkal		I. típusú kollagén	<i>COL1A1</i>
	3.	spontán colon sigmoideum perforáció diverticulosis vagy más bélbetegség hiányában	3.	karakterisztikus arci megjelenés			
	4.	méh ruptúra a harmadik trimeszterben előzmények (császármetszés és/vagy súlyos gátszakadás) nélkül	4.	spontán pneumothorax			
	5.	carotideo-cavernosus sinus fistula	5.	acrogeria			
		6.	pes equinovarus				
		7.	veleszületett csípőficam				
		8.	kiszületi hypermobilitás				
		9.	ín- és izomruptúra				
		10.	keratoconus				
		11.	gingivasorvadás				
		12.	korai életkorban kialakuló visszértágulat				

1. táblázat

A vaszkuláris típusú EDS major és minor kritériumrendszere, az Ehlers-Danlos szindrómák 2017-es Nemzetközi Klasszifikációja (*Malfait* és mtsai közleménye) alapján (5)
EDS Ehlers-Danlos szindróma; AD autoszomális domináns

matológiában alkalmazható képalkotó modalitások közül a nemlineáris optika a magas szöveti felbontási képességével, kiemelkedő molekuláris szelektivitásával és a jelölésmentesen végezhető, gyors *in vivo* képalkotási módjával emelkedett ki (20). Nemlineáris optikai jelenségek igen magas térbeli és időbeli fotonűrűség esetén jönnek létre, melyet ultrarövid impulzusüzemű, ún. femtoszekundumos lézerekkel állíthatunk elő. A nemlineáris mikroszkópiai módszerek közül a kétfoton abszorpciós fluoreszcencia (two-photon absorption fluorescence, TPF) és a másodharmonikus keltés (second harmonic generation, SHG) a két legszélesebb körben alkalmazott nemlineáris optikai technika. A TPF optikai folyamata során két foton szimultán ér el egy elektront, melyet magasabb energianívóra juttat, ahonnan az relaxálva egy, a két eredeti fotonnál kisebb energiájú foton ad le, amely TPF jelként detektálható. Mivel így feleakkora fényintenzitás is elégséges az adott elektron ingerléséhez a képalkotás során, kétszeres hullámhosszúságú lézertény alkalmazható. Utóbbi az alacsonyabb hordozott energia miatt *in vivo* biztonságosan használható, és további előnye, hogy nagyobb penetrációs készséget jelent a képalkotás szempontjából. A TPF különböző endogén fluorofórok *in vivo* detektálását teszi lehetővé, mint az elasztin, a NADH, melanin és a keratin. Az SHG optikai alapja a TPF-től annyiban különbözik, hogy itt a két gerjesztő foton egy speciális szerkezetű, nagy térbeli rendezettséget mutató nem-centroszimmetrikus molekulával lép kölcsönhatásba. SHG esetén egy a gerjesztő fotonok energiájának összegével megegyező energiájú foton jön létre, így nem történik energiavesztés (21). Ilyen nem-centroszimmetrikus molekulák az emberi szervezetben a kollagén, a miozin és a mikrotubulusok (20). Az SHG technika a bőrben lévő I. és a III. típusú kollagén mennyiségi és minőségi analizisére egyaránt alkalmas módszer. Különböző örökletes eredetű ritka kötőszöveti betegségeket, mint például az osteogenesis imperfectát, a Marfan-szindrómát és a pseudoxanthoma elasticumot már korábban is vizsgálták nemlineáris mikroszkópia segítségével. E kórképek egyes szövettani jellegzetességeinek megjelenítésére a nemlineáris optikai kiválóan alkalmasnak bizonyult (22-24).

Jelen vizsgálatunkban célul tűztük ki, hogy vEDS-ben érintett betegek fenotipizálását, majd genotipizálását követően bőrbioptiás mintáikon hagyományos szövettani, valamint nemlineáris mikroszkópiai vizsgálatokat végezzünk a rendellenes kötőszöveti morfológia vizualizálása érdekében.

Eszközök és módszerek

A vizsgálatba bevont betegek

Jelen vizsgálatba két vEDS-ben érintett beteget vontunk be. 1. betegünk (index beteg III/5) egy 42 éves nő, akinek testmagassága alacsony, súlyos scoliosisa, pes planusa, acrogeriája és jellegzetes facialis diszmorfiaja van, sclerája kék, kisizületei hipermobilisak, bőre vékony, hiperextenzibilis és fragilis, a szubkután erek feltűnően átlátszanak a bőrén. Anamnézisében artéria ruptúra, haemopneumothorax és spontán colon perforáció szerepelnek. A 2. beteg (III/7) egy 40 éves nő, az 1. beteg testvére, vékony, áttetsző, fragilis bőrrel, facialis diszmorfiaival, kék sclerával, acrogeriával, kisizületi hipermobilitással, ala-

csony termettel, scoliosissal, magas szájpaddal és pes planussal. A beteg anamnéziséből perinatális spontán nyelöcsőperforáció, intrapartum méhruptúra és hydronephrossal társuló ureterszűkület, valamint plakkos psoriasis emelhető ki.

Molekuláris genetikai diagnosztika

A molekuláris genetikai vizsgálatokra történő vérvétel mindkét beteg esetén klinikai genetikai tanácsadást követően, tájékozott, írásbeli beleegyező nyilatkozat tétele után történt. Perifériás vér leukocitáiból genomiális DNS izolálása történt. Tekintettel arra, hogy az index beteg fenotípusa vEDS-nek megfeleltethető volt, *COL3A1* (OMIM 120180) teljes gén bidirekcionális Sanger-szekvenálást végeztünk (Centogene AG, Rostock, Németország). A 2. beteg és a család többi tagja esetében genetikai szűrővizsgálat, a *COL3A1* 43. exon célzott Sanger-szekvenálása történt.

Bőrbioptiás mintavétel és szövettani vizsgálat

Bőrbioptiás mintavételt végeztünk 4 mm-es punch késsel az 1. és 2. beteg, valamint két korban és nemben illesztett kontroll személy bőréből. Ezt követően a bőrbioptiás mintákat formalinban fixáltuk és paraffinba ágyasztuk be. A szövettani feldolgozás során az általános szöveti morfológia megítélésére hematoxinin és eozin (H&E) festés, a kollagénrostok vizsgálatára Van Gieson (VG) festés készült. A szövettani leletezést bőrszövetben jártas patológus szakorvosok végezték.

Nemlineáris optikai vizsgálatok

A nemlineáris mikroszkópiai képalkotást egy speciálisan átalakított Axio Examiner LSM 7 MP pásztázó kétfoton mikroszkóppal (Carl Zeiss AG, Németország) végeztük. A mérésekhez egy széles tartományban hangolható Titán-zafir lézert (FemtoRose 100TUN NoTouch, R&D Ultrafast Lasers Kft.) alkalmaztunk, mely 796 nm-es hullámhosszon működött. Az SHG jel elkülönítésére 405/20 nm-es sávzélességű, míg a TPF szignál elkülönítésére egy 525/50 nm-es sávzélességű szűrőt használtunk. A leképezés egy 20X-os nagyítású, víz-immersiós objektívvel történt (W-Plan-POCHROMAT 20x/1,0 DIC (UV) VIS-IR, Carl Zeiss AG, Németország), az egyes látóterek nagysága 420 × 420 μm²-es volt. A nemlineáris optikai képalkotási elrendezésről részletes leírás az alábbi hivatkozásban érhető el: (25).

Eredmények

Fenotípus vizsgálata

A vizsgálatba bevont két vEDS beteg fenotípusának meghatározására az új, módosított nemzetközi kritériumrendszer alapján, a genetikai eredmények figyelembevételével került sor. *1. beteg (III/5): pozitív major kritériumok* (pozitív családi anamnézis: kimutatott *COL3A1* mutáció; artéria ruptúra; spontán colon sigmoideum perforáció diverticulosis vagy más bélbetegség hiányában) és *pozitív minor kritériumok* (zúzódások traumás behatás nélkül és /vagy szokatlan helyeken (orca, hát); vékony áttetsző bőr, áttűnő vénákkal; jellegzetes arcforma (kraniofaciális diszmorfia); spontán pneumothorax; acrogeria; veleszületett csípőficam; kisizületi hipermobilitás; gingivasorvadás) (*1. ábra*)

A 2. beteg (III/7): pozitív major kritériumok (pozitív családi anamnézis: kimutatott *COL3A1* mutáció; méh ruptúra a harmadik trimeszterben előzmények (császármetszés és/vagy súlyos gátszakadás) nélkül) és *pozitív minor kritériumok* (zúzódások traumás behatás nélkül és /vagy szokatlan helyeken (orca, hát); vékony áttetsző bőr, áttűnő vénákkal; jellegzetes arcforma (kraniofaciális diszmorfia); acrogeria; veleszületett csípőficam; kisizületi hipermobilitás; gingivasorvadás)



1. ábra

A vascularis EDS jellegzetes klinikai tünetei (1. beteg III/5). A: kék sclera, B: vékony, áttetsző bőr, melyen jól láthatók az áttűnő vénák. C: acrogeria, és kisízületi hipermobilitás, D: pes planus

Molekuláris genetikai vizsgálat

Az 1. beteg esetében (III/5) a *COL3A1* teljes gén szekvenálás során egy új, korábban a vEDS fenotípus háttérében nem leírt, c.3124_3141dup (p.Ala1042_Gly-1047dup) heterozigóta statusban hordozott variáció igazolódott. A mutáció következménye a 3124-es és a 3141-es bázispár közötti 18 bázispár megkettőződése, így 6 aminosav, köztük két glicin duplikációja prediktálható a tripla hélix régióban (Ala-Pro-Gly-Ala-Pro-Gly) (2. ábra). A legtöbb patogén *COL3A1* variáns egy glicin szubsztitúciót okoz a III. típusú prokollagén tripla helikális régiójának valamely ismétlődő Gly-X-Y szekvenciájában. Ugyanakkor kereteltolódással nem járó inszerciót is már azonosítottak korábban a Gly-X-Y ismétlődő szekvenciában mint patogén variánst (26). ACMG guideline alapján prediktálható volt, hogy az általunk detektált Gly-X-Y ismétlődő szekvenciát érintő variáns patogén mutáció. In silico analízissel ellenőriztük, hogy a mutáció korábban adatbázisokban nem szerepelt (Exome Aggregation Consortium, Exome Sequencing Project, 1000 Genomes

Browser). Az 1. beteg (III/5) fenotípusa és a detektált *COL3A1* variáns alapján megerősítettük a vEDS diagnózisát.

A 2. beteg (III/7) esetén az 1. beteggel megegyező heterozigóta statusban hordozott mutáció (c.3124_3141dup; p.Ala1042_Gly1047dup) volt azonosítható. Ez az eddig ismeretlen mutáció ko-szegregált a vEDS fenotípussal, és a család 3 generációjában volt kimutatható. Az esetek elosztása a családfán vertikális volt az autoszomális domináns öröklődésmentnek megfelelően (3. ábra).

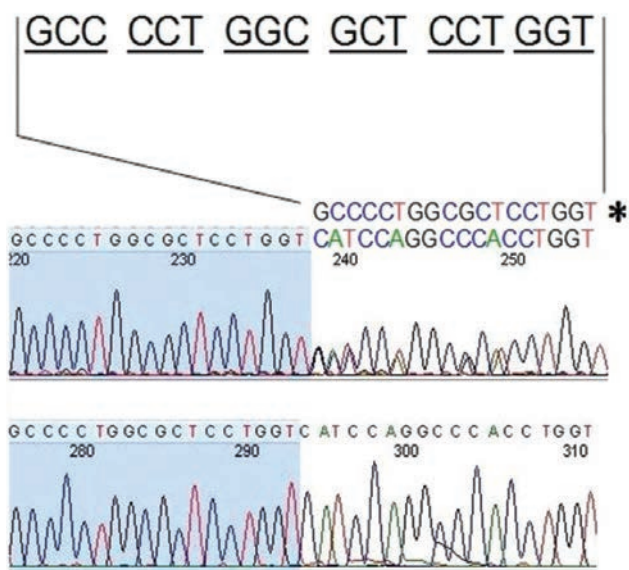
Szövettani vizsgálat

A H&E festett szövettani képeken a vEDS-ben érintett betegek bőrmintái nem voltak érdemben elkülöníthetők az egészséges kontroll bőrmintáktól. A kollagénrostok vizsgálatára készült VG festett metszeteken az egészséges bőrrel összehasonlítva a vEDS-ben szenvedő betegek mintáiban a látóterek egy részében halványabb festődésű és hézagos elhelyezkedésű kollagén rostok ábrázolódtak (4. ábra).

1042

1047

Ala - Pro - Gly - Ala - Pro- Gly



2. ábra

Az index személy (III/5) COL3A1 gén bidirekcionális Sanger-szekvenálása frame shiftet jelzett.

* a c.3124_3141dup (p.Ala1042_Gly-1047dup) heterozigóta variációt tartalmazó allél, alul a kontroll szekvencia látható

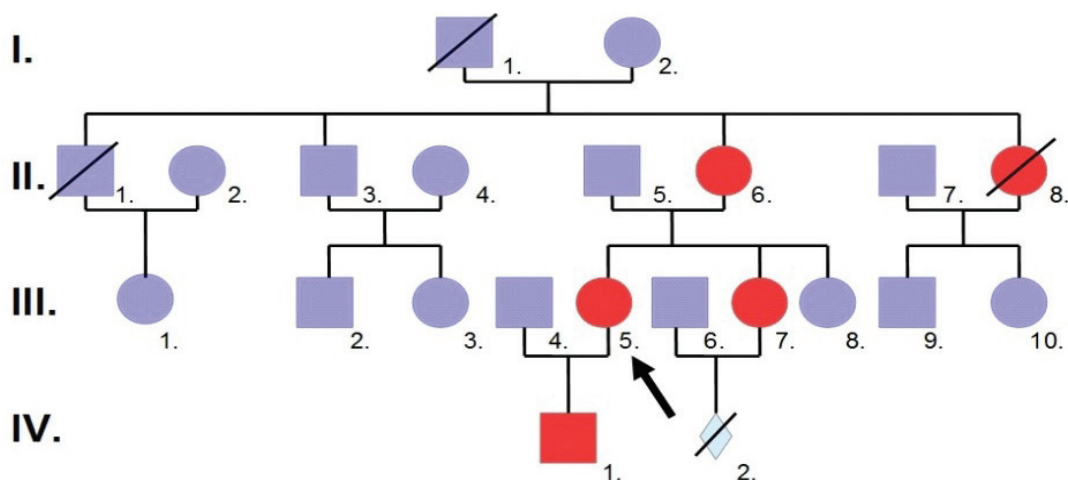
Nemlineáris mikroszkópiai képalkotás

Az egészséges bőrminta SHG jeléhez képest a vEDS betegek dermisének az SHG jel intenzitása szembetűnően alacsonyabb, a kollagénrost szerkezet igen laza és irreguláris megjelenésű, az egyes kollagénrostok vékonyabbnak imponálnak (5. ábra). Ezzel szemben az elasztin szerkezetben nem észlelhető morfológiai és intenzitásbeli különbség a kontroll bőrhöz képest.

Megbeszélés

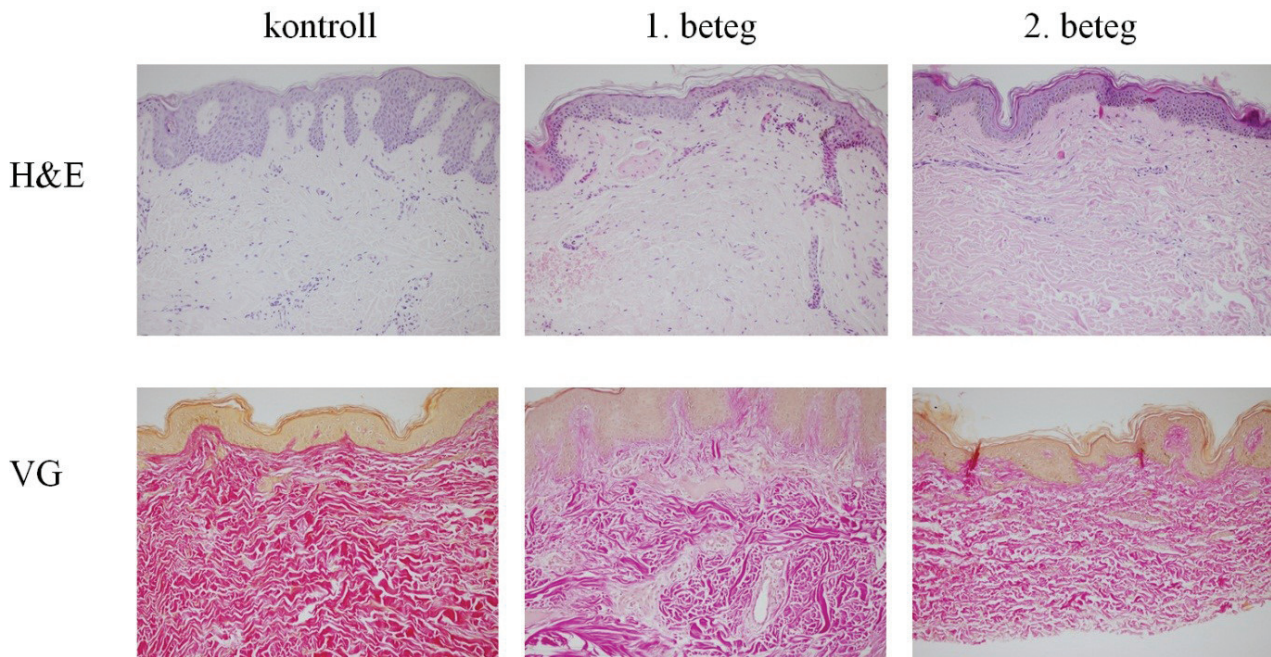
A vEDS az EDS ritka, multidiszciplináris jelentőségű altípusa. A vEDS-ben érintett betegekben gyakran súlyos belszervi szövödmények alakulnak ki, melyek igen magas mortalitással járnak és nehezen kezelhetők (15). A sokszor fiatal életkorban kialakuló, gyakran fatális kimenetelű kardiovaszkuláris történések miatt a betegek átlagos élettartama alacsony (27). A vEDS diagnózisát követően többféle kezelési lehetőség is rendelkezésre áll a betegek rizikójának csökkentésére. Ezek közül kiemelhető a beta-blokkoló terápia, amely a szívfrekvencia és a vérnyomás kontrolljával csökkenti a szív- és érrendszeri szövödmények kialakulását (28).

Az vEDS diagnosztikája jelentős kihívást jelenthet a klinikusok számára és nagy jártasságot igényel, így gyakran hosszú idő alatt születik csak meg a diagnózis. A diagnózis alapvetően a major és minor klinikai tünetek, anamnesztikus adatok meglétéen vagy hiányán alapul. A vEDS diagnózisát támogathatja a hagyományos bőrszövetteni vizsgálat. Az EDS szövettani jellemzőit már az 1970-80-as években publikálták (18, 29, 30), azonban az egyes altípusok közötti eltérő szövettani jellegzetességekről kevés adatot közöltek (29). További diagnosztikus lehetőséget jelent az elektronmikroszkópos képalkotás és a kollagén elektroforézis. Történetek erőfeszítések különböző laboratóriumi tesztek kifejlesztése irányában is, mint a vizeletben lévő kollagén bomlástermékek arányának meghatározása, melyek alkalmazásáról azonban csekély evidencia áll rendelkezésre, és nem terjedtek el (2, 14, 31, 32). A bőrszövetteni vizsgálaton kívül a különböző diagnosztikai módszerek a korlátozott hozzáférhetőségük és magas költségük miatt jelenleg még nem terjedtek el a klinikai gyakorlatban. Ugyanakkor ezen vizsgálatok mindegyikéhez bőrbioopszia vétele szükséges. A bemutatott nemlineáris mikroszkópia azonban a hagyományos szövettani vizsgálathoz hasonló felbontású képalkotást lehetővé tévő, *in vivo* is alkalmazható modalitás, bőrbioopsziás mintavételi igény nélkül. Ráadásul, molekuláris selektivitása révén részletesebb képet alkothatunk a kötősző-



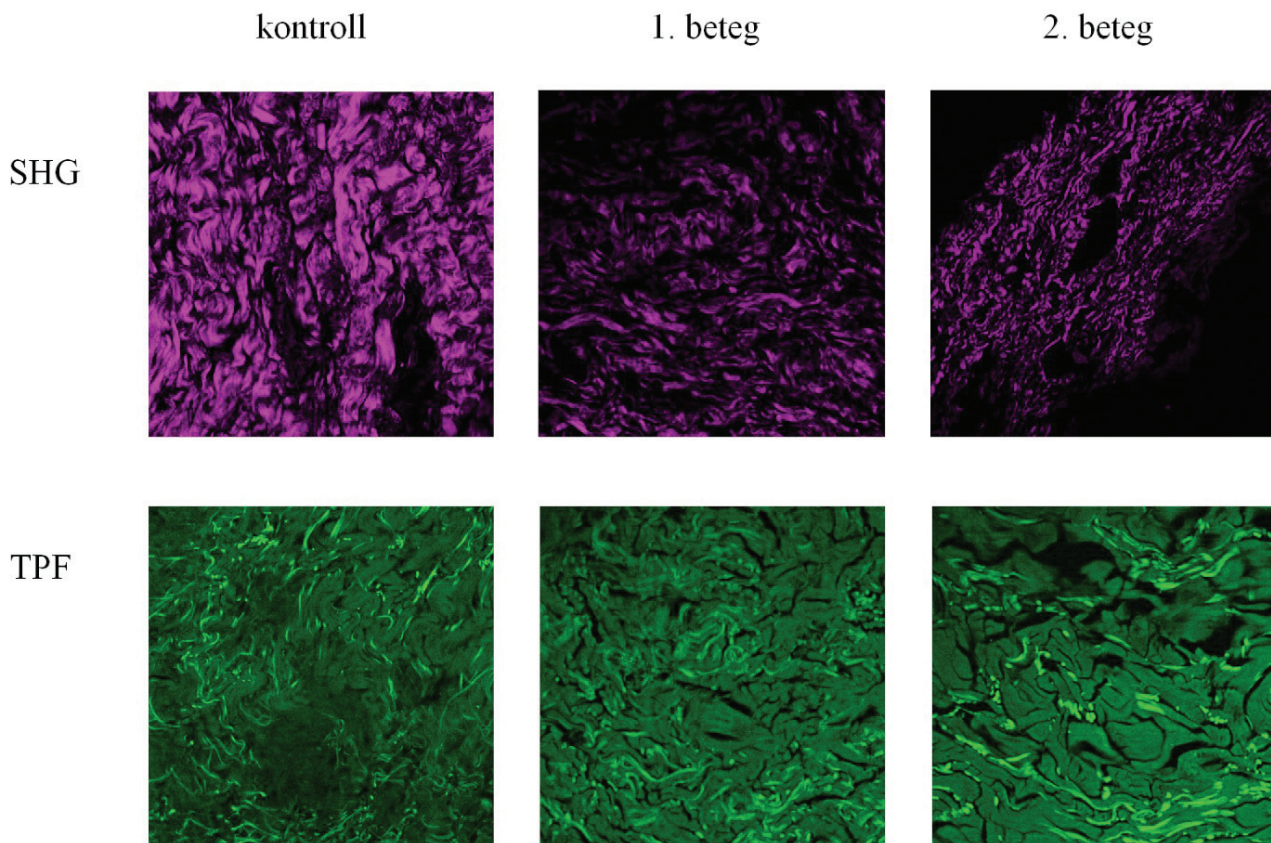
3. ábra

A két vizsgált beteg (index személy: III/5. és III/7.) családfája, melyen pirossal jelöltük a vEDS tekintetében érintett családtagokat. A fenotípus a család 3 egymást követő generációjában jelent meg, és jól mutatja az autoszomális domináns öröklésmentet



4. ábra

A vizsgált vEDS-ban szenvedő betegek és egy korban és nemben illesztett kontroll személy bőrszövetteni metszeteinek jellemző látóterei (HE, VG 200x)



5. ábra

Egészséges bőr és vEDS-ben szenvedő betegek bőrének nemlineáris mikroszkópiai képei.

SHG: second harmonic generation (másodharmonikus keltés) kollagénrostokból származó jele.

TPF: two photon absorption fluorescence (kétfoton abszorpciós fluoreszcencia) jel, mely jelet a dermisben főként az elasztin adja. Az egyes képkockák nagyított látótereket mutatnak $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ -es méretben

veti rostok morfológiájáról, mint a hagyományos szövettani vizsgálattal, melyet eredményeink is mutatnak. Így a jövőben, mint új neminvazív képpalkotó modalitás segítheti a vEDS diagnózisának felállítását. További kutatások tárgyát képezheti, hogy egyéb nemlineáris mikroszkópiai módszerek alkalmasak-e egyes EDS altípusok elkülönítésére, valamint a beteg gondozása során bőrstátuszuk monitorozására.

IRODALOM

1. Parapia L. A., Jackson C.: Ehlers-Danlos syndrome—a historical review. *Br J Haematol.* (2008) *141*(1), 32–5.
2. Carlesimo M., Cortesi G., Gamba A. és mtsai.: Ehlers–Danlos syndrome: case report and an electron microscopy study. *Rheumatol Int.* (2012) *32*(6), 1507–10.
3. Beighton P., Paepe A. D., Steinmann B. és mtsai.: Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. *Am J Med Genet.* (1998) *77*(1), 31–7.
4. Beighton P., De Paepe A., Danks D. és mtsai.: International nosology of heritable disorders of connective tissue, Berlin, 1986. *Am J Med Genet.* (1988) *29*(3), 581–94.
5. Malfait F., Francomano C., Byers P. és mtsai.: The 2017 international classification of the Ehlers–Danlos syndromes. *Proc. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics, 2017*, 175:8–26: Wiley Online Library
6. Baumann M., Giunta C., Krabichler B. és mtsai.: Mutations in FKBP14 cause a variant of Ehlers-Danlos syndrome with progressive kyphoscoliosis, myopathy, and hearing loss. *Am J Hum Genet.* (2012) *90*(2), 201–16.
7. Micheal S., Khan M. I., Islam F. és mtsai.: Identification of Mutations in the PRDM5 Gene in Brittle Cornea Syndrome. *Cornea.* (2016) *35*(6), 853–9.
8. Al-Owain M., Al-Dosari M. S., Sunker A. és mtsai.: Identification of a novel ZNF469 mutation in a large family with Ehlers-Danlos phenotype. *Gene.* (2012) *511*(2), 447–50.
9. Fukada T., Civic N., Furuichi T. és mtsai.: The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. *PLoS one.* (2008) *3*(11), e3642.
10. Miyake N., Kosho T., Mizumoto S. és mtsai.: Loss-of-function mutations of CHST14 in a new type of Ehlers-Danlos syndrome. *Hum Mutat.* (2010) *31*(8), 966–74.
11. Muller T., Mizumoto S., Suresh I. és mtsai.: Loss of dermatan sulfate epimerase (DSE) function results in musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome. *Hum Mol Genet.* (2013) *22*(18), 3761–72.
12. Faiyaz-Ul-Haque M., Zaidi S. H., Al-Ali M. és mtsai.: A novel missense mutation in the galactosyltransferase-I (B4GALT7) gene in a family exhibiting facioskeletal anomalies and Ehlers-Danlos syndrome resembling the progeroid type. *Am J Med Genet. Part A.* (2004) *128a*(1), 39–45.
13. Malfait F., Karimnejad A., Van Damme T. és mtsai.: Defective initiation of glycosaminoglycan synthesis due to B3GALT6 mutations causes a pleiotropic Ehlers-Danlos-syndrome-like connective tissue disorder. *Am J Hum Genet.* (2013) *92*(6), 935–45.
14. Burch G. H., Gong Y., Liu W. és mtsai.: Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers–Danlos syndrome. *Nat Genet.* (1997) *17*(1), 104.
15. D’Hondt S., Van Damme T., Malfait F.: Vascular phenotypes in nonvascular subtypes of the Ehlers–Danlos syndrome: a systematic review. *Genet Med.* (2018) *20*(6), 562–73.
16. Ralovich F. V., Kiss N., Horvath K. és mtsai.: [Up-to-date classification and multidisciplinary symptoms of Ehlers-Danlos syndromes]. *Orv Hetil.* (2019) *160*(16), 603–12.
17. Pepin M., Schwarze U., Superti-Furga A. és mtsai.: Clinical and genetic features of Ehlers–Danlos syndrome type IV, the vascular type. *N Engl J Med.* (2000) *342*(10), 673–80.
18. Pope F. M., Martin G. R., Lichtenstein J. R. és mtsai.: Patients with Ehlers-Danlos syndrome type IV lack type III collagen. *Proc Natl Acad Sci.* (1975) *72*(4), 1314–6.
19. Weerakkody R. A., Vandrovцова J., Kanonidou C. és mtsai.: Targeted next-generation sequencing makes new molecular diagnoses and expands genotype–phenotype relationship in Ehlers–Danlos syndrome. *Genet Med* (2016) *18*(11), 1119.
20. Kiss N., Haluszka D., Lőrincz K. és mtsai.: Quantitative Analysis on Ex Vivo Nonlinear Microscopy Images of Basal Cell Carcinoma Samples in Comparison to Healthy Skin. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2018 Jul 6; 1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29981012>
21. Chen X., Nadiarynkh O., Plotnikov S. és mtsai.: Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nat Protoc.* (2012) *7*(4), 654.
22. Cui J. Z., Tehrani A. Y., Jett K. A. és mtsai.: Quantification of aortic and cutaneous elastin and collagen morphology in Marfan syndrome by multiphoton microscopy. *J Struct Biol.* (2014) *187*(3), 242–53.
23. LaComb R., Nadiarynkh O., Campagnola P. J.: Quantitative second harmonic generation imaging of the diseased state osteogenesis imperfecta: experiment and simulation. *Biophys J.* (2008) *94*(11), 4504–14.
24. Murata T., Honda T., Miyachi Y. és mtsai.: Morphological character of pseudoxanthoma elasticum observed by multiphoton microscopy. *J Dermatol Sci.* (2013) *72*(2), 199–201.
25. Haluszka D., Lőrincz K., Kiss N. és mtsai.: Diet-induced obesity skin changes monitored by in vivo SHG and ex vivo CARS microscopy. *Biomed Opt Express.* (2016) *7*(11), 4480–9.
26. Yang J. H., Lee S. T., Kim J. A. és mtsai.: Genetic analysis of three Korean patients with clinical features of Ehlers-Danlos syndrome type IV. *J Korean Med Sci.* (2007) *22*(4), 698–705.
27. Pepin M., Schwarze U., Superti-Furga A. és mtsai.: Clinical and genetic features of Ehlers-Danlos syndrome type IV, the vascular type. *N Engl J Med.* (2000) *342*(10), 673–80.
28. Ong K. T., Perdu J., De Backer J. és mtsai.: Effect of celiprolol on prevention of cardiovascular events in vascular Ehlers-Danlos syndrome: a prospective randomised, open, blinded-endpoints trial. *Lancet (London, England).* (2010) *376*(9751), 1476–84.
29. Pierard G., Pierard-Franchimont C., Lapière C. M.: Histopathological Aid at the Diagnosis of the Ehlers-Danlos Syndrome, Gravis and Mitis Types. (1983) *22*(5), 300–4.
30. Sulica V. I., Cooper P. H., Pope F. M. és mtsai.: Cutaneous histologic features in Ehlers-Danlos syndrome: study of 21 patients. *Arch Dermatol.* (1979) *115*(1), 40–2.
31. Kiss N., Haluszka D., Lorincz K. és mtsai.: Ex vivo nonlinear microscopy imaging of Ehlers-Danlos syndrome-affected skin. *Archives of dermatological research.* (2018) *310*(5), 463–73.
32. Steinmann B., Eyre D. R., Shao P.: Urinary pyridinoline cross-links in Ehlers-Danlos syndrome type VI. *Am J Hum Genet.* (1995) *57*(6), 1505.

Érkezett: 2019. 05. 09.

Közlésre elfogadva: 2019. 05. 14.