

VÁLASZ**Dr. Tordai Attila egyetemi tanár, MTA doktora opponensi véleményére**

Tisztelettel köszönöm **Dr. Tordai Attila** opponensi munkáját, munkám méltatását és javító szándékú véleményét.

Tartalmi észrevételére és kérdéseire vonatkozóan a válaszaim az alábbiak:

- a. Az MTA doktori pályázathoz a saját publikációim listáját több változatban, a publikációkat teljes terjedelmükben leadtam, a követelmény szerint, így egyáltalán nem gondoltam arra, hogy a bírálatra leadott doktori műbe kell tenni ezeket. A műben szerepeltetett hivatkozásokat EndNote publikációs lista szerkesztő program alkalmazásával tettem a szövegbe, amely nem teszi lehetővé azt, hogy külön listából kerüljön be egy szöveg hivatkozásaiba a saját publikáció. A „bekeverés” olyan értelemben szándékos volt, hogy minden saját munkát az irodalom 2010-es állása szerinti alapokra helyeztem és az értékelésnél elsősorban a ránk való hivatkozásokat használtam.
- b. A trombocita aggregációs vizsgálatokhoz 200 G/L-es trombocitaszámú trombocita dús plazma alkalmazása azért fontos, mert így biztosítható, hogy az aggregáló anyagok egy trombocitára vonatkoztatott mennyisége állandó legyen az aggregációs elegyben. A trombocita 2000 g-vel történő 10 perces centrifugálása, P-szelektin mérés szerint, nem okozott változást az aktivációs állapotban. A megfelelően gyors és kíméletes trombocitaszám állítást az aggregációs vizsgálatok nagyon fontos előkészítő lépése a legtöbb nemzetközi laboratóriumban.
- c. A „Biotechnológia” cím utólag olvasva inkább a tervemet, mint a tartalmat tükrözi, valóban szerencsésebb lett volna egy szűkebb cím megfogalmazása.
- d. A von Willebrand fehérje ellenes antitest kétféle megjelölése elírás, 1C1E7-ről van csak szó.
- e. A von Willebrand betegség hátterében álló genetikai tényezők vizsgálatára hazánkban, dr. Bodó Imre munkássága révén, évek óta van lehetőség. (Akkoriban, amikor ezek a vizsgálatok készültek, még nem volt tudomásunk a hazai lehetőségről. Pedig Bodó Imre munkacsoportjának, nemzetközi együttműködésben, a VWB genetikai alapjait meghatározó publikációi vannak.) A 28-as exonon lévő génhibák vizsgálatára közel egy éve van lehetőség a Debreceni Egyetem Klinikai Kutató Központjában. Ezek a leggyakoribb hibák a 2-es típusú VWB altípusaiban, amelyek ismerete a kezelés szempontjából is fontos. A fenotipusos kivizsgálás és a genetikai vizsgálatok viszonya lehet anyagi kérdés, mert az igen nagy VWF gén (52 exon) szekvenálása drága. Család tanulmányok szerint, Sadler EJ (New concepts in vonwillebrand disease, Annu. Rev. Med. 2005; 56:173–91) 2005-ös összefoglaló cikke nyomán, a VWF szint variációja mögött csak 25-32%-ban mutatható ki az öröklődés. A populáció VWF szintje nagyon széles tartományban változik, mivel sok tényező befolyásolja - a referencia tartomány meghatározása is igen nehéz, esetenként tetszőleges. Meghatározó a vércsoport, a hormonális státusz, a stressz, a fizikai aktivitás (edzés), gyulladás, terhesség, a kor. Azt is leírták, hogy 1-es típusú VWB VWF szintje stressz hatásra, 4-szeresre is emelkedhet és így már a referencia tartományba kerül. Az ISTH SSC VWF adatbázisa (Sheffield, UK: University of Sheffield, <http://www.vwf.group.shef.ac.uk/index.html>) és Goodeve AC 2010-es összefoglaló cikke szerint (The genetic basis of von Willebrand disease, Blood Reviews 2010; 24: 123–134) az 1-es típusú VWB-ek 70%-ában, a 3-as típusúak 100%-ában és a 2-es típusúak közel 100%-ában mutattak ki mutációt. A feno- és

genotipizálás összefüggő alkalmazását szolgálja a VWB bizonyítékokon alapuló orvoslása útmutató [von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA) (<http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/vwd>)], nyomtatásban (Haemophilia. 2008; 14, 171–232). Ez az útmutató a genetikai vizsgálatokat a legfelsőbb szintű bizonyítéknak tekinti, elsősorban a szülést tervező nőknek ajánlja. Azt is megfogalmazza, hogy a genetikai információval megerősített, 20-50%-os VWF szintek a kezelés szempontjából nagyon fontosak lennének. A VWF szintet biomarkerként lehetne alkalmazni a közepes súlyosságú vérzések kezeléséhez, úgy, mint ahogy az emelkedett koleszterin szintet a kardiovaszkuláris megbetegedések rizikója esetén. Feno- és genotipizálással több ismeretet kell szerezni az olyan esetekről, amelyekben a mutáció azonos de fenotípus alapján nem igazolható VWB és amelyekben a fenotípus alapján azonos a VWB diagnózisa, de nem sikerült mutációt találni.

- f. A polycythemia veraban (PV) szenvedő beteg esettanulmányában történt 2-es típusú Janus kináz (JAK2) V617F vizsgálat. A beteg pozitív volt erre a vizsgálatra és három szintén pozitív kontroll volt kiválasztva a tanulmányhoz. A normál vérlemezke szám melletti vérlemezke eredetű eltérésre áramlási körülmények között végzett teljes vér adhéziós vizsgálatból következtettünk. A kezelő orvos „Myeloproliferatív betegségek mutációs statusa és prognosztika, ezek összefüggése a thrombocyta adhaesioval és Willebrand faktorrall” című, jelenleg is folyó klinikai kutatás keretében küldte a beteg mintáját vizsgálatra, és az adhéziós kép eltért a többi PV-s esettől. (A vizsgálat 130 mL citrátos vért igényel és 2,5 perc -előkészítéssel együtt kb 30 perc- alatt elvégezhető.) Az emelkedett GPIb kifejeződés magyarázata nincs benne a közleményünkben. Viszonylag kevés munka foglalkozik ezzel, szemben a csökkent GPIb számmal. A kérdés azért is nehéz, mert a GPIb nem önmagában, hanem GpIb/IX/V komplexként szintetizálódik, így kerül a trombocita membránra. A VWF receptorként csak aGpIb α rész funkcionál, de funkciója nem teljes a másik két polipeptid nélkül. Mindegyik polipeptidet saját génje kódol, amelyek a leucin-gazdag glikoproteinek családjába tartoznak. A gének átíródását a polipeptidekre specifikus transzkripciós faktorok kontrollálják. A GpIb/IX/V komplex expressziója főleg a megakariocita sejtvonalhoz kötött. Az emelkedett trombocita GPIb szám Ryningen A és munkatársai közleménye szerint (Reticulated platelets are increased in chronic myeloproliferative disorders, pure erythrocytosis, reactive thrombocytosis and prior to hematopoietic reconstitution after intensive chemotherapy, Platelets 2006; 17:296–302) magyarázható lehet azzal, hogy a retikulált trombociták száma növekedett PV-ben. Ezek a fiatal trombociták több mRNS-t is tartalmaznak, amelyek között a GPIb mRNS is több lehet. Ismert, hogy az újonnan képződő trombociták képesek a főbb membrán proteinek és egyes α -granulum proteinek *de novo* szintézisére (Kieffer N és munkatársai, Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. Eur J Biochem. 1987; 164:189-95). Mi más PV-s beteg esetében nem tapasztaltuk a GPIb nagyobb számát. Több olyan polimorfizmus ismert, amelyek a trombocita membrán GPIb számának növekedését eredményezik (Baker RI és munkatársai, Platelet glycoprotein Ibalph Kozak polymorphism is associated with an increased risk of ischemic stroke. Blood. 2001; 98:36-40, Yonal I és munkatársai, The impact of platelet membrane glycoprotein Ib alpha and Ia/IIa polymorphisms on the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. Thromb Res. 2012 Apr;129:486-91). Mi nem végeztünk ezekre vizsgálatokat.

A formai kérdéseket és észrevételeket köszönöm, tanácsát megfogadom.

- I. Az ábrák méretét növelem, ha még lehet javítani. A 2. táblázat aláírása hiányos, helyesen: „Az endotél sejt szekretórikus és expressziós molekulái az ér fiziológiája szempontjából”
- II. Ha pótolható a fő- és alfejezetek számozása, akkor javítom.
- III. Sajnálom, hogy nem sikerült egységesre az értekezés nyelvezete. A magyar írásmód az orvosi kifejezések esetén helytelen, de egyre több magyar nyelvű közleményben találok vele, ezért próbáltam alkalmazni. A következtlen alkalmazás teljesen rossz. Lehetőség szerint javítom a műben, a továbbiakban pedig jobban koncentrálok az ilyen hibák elkerülésére.
- IV. Segítségem nem volt a mű szerkesztéséhez. Talán azért, mert nem fejeztem ki ezt az igényemet. Sajnálom, hogy a szövegellenőrzés sem volt hatékony.

Ismételten köszönöm Dr. Tordai Attila opponensi munkáját, építő véleményét.

Debrecen, 2012-10-25.

Hársfalvi Jolán