

VÁLASZ

Dr. Tóth Kálmán egyetemi tanár, MTA doktora opponensi véleményére

Tisztelettel köszönöm Tóth Kálmán professzor úr értékelő, elemző bírálatát.
Válaszaim a kritikai megjegyzésekre vagy kérdésekre vonatkozóan az alábbiak.

A dolgozat nem tartalmazza különállóan a saját scientometriai adataimat, mert ezeket az MTA doktori szabályzata szerint külön mellékletek tartalmazzák. A mű szerkesztésekor azt gondoltam hogy a bírálatok utáni végleges formába kell befűzni ezt a listát. A bírálóknak kiegészítésként, az MTA titkárságon keresztül elküldtem.

A VWB prevalenciája, vagyis a betegek száma adott populációra vonatkozóan, nagyon különböző. Az incidencia vagyis az évente diagnosztizált új esetek aránya, mint öröklött betegség alacsony lenne, azonban VWB esetén ez is igen változó. Ez részben abból ered, hogy betegség megnyilvánulása nagyon különböző mértékű, az enyhe és a súlyos vérzékenység skáláján.

Tünetek	VWB (összes)	VWB 3 típus	Súlyos haemophilia	Normál
Epistaxis	62	77	20	5
Menorrhagia	60*	69*	N.I.	25*
Fogextractios vérzés	52	70	64	5
Ecchymosis	49	N.I.	N.I.	12
Vérzés kisebb vágások-, horzsolásokból	36	N.I.	N.I.	0
Gingiva vérzés	35	N.I.	N.I.	7
Postoperatív vérzés	28	41	36	1
Szülés alatti vérzés	23*	15	N.I.	12*
Gastrointestinalis vérzés	14	20	10	1
Traumás szájüregi és ajakvérzés	12	N.I.	N.I.	1
Petechiák	12	N.I.	N.I.	1
Haemarthros	8	37	86	0
Haematuria	7	1	12	1
Ovarium vérzés	7*	N.I.	N.I.	N.I.
Mandulavérzés	6	N.I.	N.I.	N.I.
Fogzás alatti vérzés	5	N.I.	N.I.	N.I.
Vetélés alatti vérzés	4	N.I.	N.I.	N.I.
Fülvérzés	3	N.I.	N.I.	N.I.
Intramuscularis, mély subcutan és submucosus vérzés	3	52	93	N.I.

* 15 év fölötti nőknél meghatározva
N.I. = nem ismert

Sadler JE, *Thromb Haemost* 2000;84:160-74

Bár Erik von Willebrand 1926-ban leírta, hogy a vérzékenység különbözik a hemofiliától, még ma is gyakran találkozunk hemofiliásnak diagnosztizált VWB-gel. A VWB hátterében a von Willebrand faktor (VWF) molekula hiánya vagy hibája áll. Mivel a koagulációs VIII-as faktor (FVIII) csak a VWF védelmében stabil, a VWF hiánya esetén FVIII hiány is kialakul. Igaz, hogy a VWB 3-as típusa, amelyben a VWF teljesen hiányzik, igen ritka, mégis, speciális laboratóriumi diagnosztika nélkül –amelyet a dolgozat 3. Táblázata, A von Willebrand betegség laboratóriumi tipizálása mutat be-, a VWB gyakran hemofiliaként kerül először felismerésre. A vérzékenység típusa eltérő, amint a fenti táblázat mutatja. A VWB nagyon különböző genetikai háttere is oka a különböző prevalenciának.

A "Trombusképződést gátló anyagok / inhibitorok" című fejezetből indokolatlanul hagytam ki a klinikai gyakorlatban alapvető jelentőségű antithrombotikus hatású szereket és a

thrombociták aggregációját gátló gyógyszereket, amelyeket most pótlók. Hatásmechanizmus szerint csoportokra bontva.

- K-vitamin antagonisták, mint az acenokumarol, clorindione, coumatetralyl, dicumarol, difenadion, ethyl biscoumacetate, phenprocoumon, phenindione, tiocloamarol, warfarin, amelyek a K-vitamin függő, γ -karboxi glutaminsavat tartalmazó alvadási faktorok szintézisét gátolják.
- Heparinok a leggyakrabban használt antitrombotikumok, különböző készítmények nevei: fondaparinux, bivalirudin bemiparin, dalteparin, danaparoid, enoxaparin, heparin, nadroparin, parnaparin, reviparin, sulodexide, tinzaparin. A heparinok az antithrombinhoz kötődve, annak gátló hatását megsokszorozzák. Attól függően, hogy nem frakcionált vagy kis molekulásúlyú heparionok, trombinra vagy FX-re specifikusak.
- Trombocita-aggregáció gátlók, mint a ciklooxygenáz (COX-1) irreverzibilis gátlása útján ható és a tromboxán A_2 képződést gátló acetilszalicilsav és származékai; az ADP receptor antagonisták klopidoegrél, ticlopidine vagy a hasonló hatásmechanizmusú prasugrel; a GPIIb/IIIa-inhibitor abciximab vagy az eptifibatide vagy tirofiban; a prosztaciklin és a prosztaciklin analóg beraprost, iloprost, treprostini; a reverzibilis foszfodiesteráz inhibitor dipyridamole; a tromboxán A_2 receptort és a TxA_2 szintézis gátló pikotamid; a triflusal, amely az acetilszalicilsav deacilált származéka; a foszfodiesteráz 3 gátló cilostazol, mind a trombocita-trombocita kölcsönhatást gátló anyagok.
- Trombolitikus enzimek, mint az alteplase, ancrod, anistreplase, brinase, drotrecogin, α -fibrinolysin, protein C, reteplase, saruplase, streptokinase, tenecteplase, urokinase.
- Direkt thrombin-inhibitorok, mint az argatroban, bivalirudin, dabigatran, desirudin, hirudin, lepirudin, melagatran, ximelagatran.
- Direkt FX inhibitor a rivaroxaban.
- Polidiszperz oligonukleotid a defibrotide, amely a katepszin G gátláson keresztül hat, a dermatan sulfát pedig a heparin kofaktor II aktivitását befolyásolja.

Irodalom: A hematológia alapjai, Medicina, 2011, fordította Tordai Attila. Eredeti kiadás: Hoffbrand, A.V., Moss P.A.H., Pettit, J.E.: Essential Haematology Fifth ed Blackwell Publishing, 2006

A bevezetésből kimaradt a Bernard-Soulier szindróma ismertetése, azonban a "Trombociták és szerepük a trombusképződésben" részben említtem, hogy nagy sebességgradienssel jellemezhető áramlás esetén a trombociták adhezív felszínén való gördülése "függ a von Willebrand faktor (VWF) és trombocita receptora (GPIb) jelenlététől. Ennek a kölcsönhatásnak a jelentőségét igazolja, hogy a von Willebrand betegség (VWB) 3-as típusa (VWF teljes hiánya) és a Bernard-Soulier szindróma (GPIb hiánya) jellegzetes tünetei (pl.: nyálkahártya vérzések) olyan ereket érintenek, amelyekben a nyíróerők nagyok." A dolgozatomban az alapkutatási eredményeket igyekeztem bemutatni. A klinikai témájú közleményeket viszonylag röviden ismertettem, így próbáltam összefüggően bemutatni az alapkutatások, a klinikai kutatások és a gyógyításban közvetlenül hasznosuló eredményeimet.

A módszerek leírása fejezet a hivatkozási irodalommal együtt alkot egészet, azonban a benyújtott közleményeim másolatait valószínű nem kapta meg a bíráló. Összefoglalóan ismertettem a módszereket, ahogy azokat a laboratóriumunkban használjuk. A "Klinikai minták, mintakezelés" részben zavaró az a kezdet, hogy "a vérmintákat egészséges önkéntesektől vettük...", majd ismertetem a kizárási kritériumokat, de utána nem írok arról, hogy a vérvételi eljárás a betegek esetén is azonos volt.

“A plazmákat a feldolgozásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk (nem több mint 6 hónap).” mondatból kimaradt, hogy trombocita szegény plazmák. Az a mondat is kimaradt, hogy a PRP-t a vérvételtől számított két órán belül feldolgoztuk.

A trombocita aggregációs vizsgálatokat mindig reggeli, éhgyomri vérből végeztük, a diurnális variációt kizárva.

“Poolozás”-ra csak trombocita szegény plazmát használtunk (PPP-ként említettem a mondatban), amelyek nem szerepeltek az aggregációs vizsgálatokban.

A sejtenyészetben felhasznált humán köldökvéna sejteket frissen izoláltuk a szülészetről kapott köldökszínórból (etikai engedélyünk van). Az alfejezet végén, a módszertani részletekre való utalás egy korábbi fejezetre vonatkozik, amelyiknek a címe “Trombocita adhézió, aggregáció és aktiváció mérése” lett a korábbi hosszú cím helyett (“Vénás és artériás körülményeket modellező, teljes vért alkalmazó áramlási kamrák vizsgálata”). Sajnálom, hogy ezt nem javítottam a szövegben.

A 2B típusú von Willebrand betegek fenotipizálását a “A VWF analízise, rutin módszerek” című rész tartalmazza. A genotipizálás, amint ezt említem a dolgozatban, nem a mi laboratóriumunkban készült ezért itt csak utalok a közleményre.

Köszönöm professzor úr elismerő szavait az általunk analitikusan vizsgált módszerekre vagy módszerfejlesztésekre vonatkozóan. Ezeket az eredmények részben mutatom be, mivel közlemény formájában megjelentek és az alkalmazott módszerek felsorolásnál nagyobb jelentőségűek.

A hirudin direkt trombin inhibitor a trombus felszíni kiterjedését nem, de több trombocita réteg egymásra tapadását, az aggregációt gátolta HMEC-1 ECM-en, artériás áramlást jellemző sebességgradienssel áramoltatott vér esetén. Ilyen körülmények között HUVEC ECM-en csak trombocita egyréteg képződött, amelyet a hirudin nem befolyásolt.

A kollagénhez kötött VWF morfológiájának eredményét nem értékeltem pontosan. “Ellentétben mások munkájával, azt igazoltunk, hogy a VWF molekulák, az *in vivo* körülményeket megközelítő áramlási feltételeket biztosítva, nem mutatnak áramlási irányba rendeződő fibrilláris struktúrát kollagén felszínen...” mondat helytelen, mert az idézett munkák nem használtak kollagén felszínt.

Az egyszálú DNS-sekkel (aptamerek) $K_i=1-2\text{ nM}$ koncentrációban érhető el antitrombotikus hatás (K_i a trombin affinitást jellemző koncentráció). Összehasonlításképpen, a direkt trombin inhibitorok közül a $K_i=0,23\text{ pM}$ a Lepirudin, $K_i=0,26\text{ pM}$ a Desirudin, $K_i=1,9\text{ nM}$ a Bivalirudin és $K_i=5-38\text{ nM}$ az Argatroban esetében (Lee CJ & Ansell JE. Direct thrombin inhibitors. BJCP 72; 581-592, 2011). A gyógyszerkipróbálás alatt lévő konszenzus aptamer fejlesztése (C15-mer a mi munkánkban) szuboptimális dózishatás miatt le lett állítva (ARC183, Archemix), ezért más paraméterek összehasonlítása még korai.

A dolgozatomban nem szerepel az általam újnak tartott tudományos eredményeim tételes felsorolása, mert ezt külön dokumentumként kellett az MTA honlapra feltölteni. Mellékelem.

Ismételten köszönöm Tóth professzor úr opponensi munkáját, alkotó bírálatát.

Debrecen, 2012-10-11

Hársfalvi Jolán