

Válasz Hársfalvi Jolánnak a  
VELESZÜLETETT ÉS SZERZETT RIKA HEMOSZTÁZIS BETEGSÉGEK  
PATOGENETIKÁJÁNAK VIZSGÁLATA, DIAGNOSZTIKÁJÁNAK ÉS TERÁPIÁJÁNAK  
FEJLESZTÉSE

c. disszertációjáról alkotott opponensi bírálatára

Először is hálásan köszönöm az időt és energiát, amit professzor asszony a hosszú disszertáció áttanulmányozására és kritikai elemzésére fordított! Másodszer köszönöm az elismerő szavakat, amelyekkel a dolgozatban összefoglalt kutatást értékelté. A bírálatban megfogalmazott kritikai megjegyzésekre és kérdésekre az alábbiakban szeretnék válaszolni:

1. **A kritikai megjegyzések [(1)-(5)]** első része a bevezetés és a módszerek fejezetek pontosítására illetve irodalmi alapjaira vonatkozik. Természetesen egyetértek Bírálónak az irodalmi jegyzék teljesebbé tételét célzó megjegyzésével. A disszertációban érintett területek irodalma igen-igen gazdag, és a munka nem vállalkozhatott minden egyes – akár lényeges új információt hozó – cikk felsorakoztatására. Például a von Willebrand betegség kezdeti úttörő munkáiból számos kutató kivette a részét, ezekre a munkákra – Inga Marie Nilsson úttörő cikkét is beleértve – Holmberg és Nilsson nagyon szépen megírt összefoglaló cikkével<sup>1</sup> hivatkoztam, nem pedig az egyes (annakidején nyilván fontos mérföldkövet jelentő) munkák idézésével. Hasonlóképpen, tanítómesterem, Evan Sadler nevezetes összefoglalója (*VWF: two sides of a coin*) helyett az ott kifejtett koncepcióra épített klinikai orientációjú összefoglalót<sup>2</sup> idéztem. Az ADAMTS13 fehérje iTTP-ben észlelt konformációjáról szóló, a területet általánosságban érintő nemzetközi kollaborációban született cikk, melyben magyar társszerzők is szerepeltek, azért nem került bele az irodalomjegyzékbe, mert igyekeztem a saját kutatásunkhoz leginkább kapcsolódó cikkekre fókuszálni. Hasonló okból maradt ki a szintén fontos, a Protein Science-ben tavaly a Bíráló munkacsoportja által közölt cikk, amely a VWF fizikai erők hatására létrejövő konformációváltozásáról szól.  
Mindezt magyaráztatnak szántam, továbbra is egyetértve azzal, hogy a minél alaposabb irodalomjegyzék javára szolgál bármely tudományos munkának. Szintén egyetértek azzal a pontosítással, ami a VWF és a FVIII kölcsönhatását illeti (bár a mi munkánkat ez nem érinti), és azzal is, hogy a gyakoribb idézés könnyíti az olvasó feladatát.
2. A BETEGEK ÉS MÓDSZEREK részben az 53. oldalon a VWF CK domén molekuláris szerkezetének 2000-ben közölt matematikai modellezéséhez használt módszereket igyekeztem összefoglalni. Az elmúlt több, mint két évtized a molekuláris szerkezetek megértésének és ezek modellezésének robbanásszerű fejlődését hozta magával, többek között Krausz Ferenc Nobel-díjjal jutalmazott munkája révén is. Így a 25 évvel ezelőtt alkalmazott szoftverek közül már sok nincsen használatban, és egy részüknek a honlapját sem frissítik létrehozóik. Közvetlenül nem hivatkoztam honlapra, és a hivatkozott cikkek háttérét nem ellenőriztem. Mivel klinikusként már hosszú évek óta nem követem közelről a molekuláris modellezés részleteit, így nincsen információm a régi szoftverek fejlesztéseiről vagy megszűnésükről.
3. A CK domén diszulfid szerkezetét taglaló rész meglehetősen összetett, de a megértést segíti a **23. ábra** és az alatta lévő szöveg, egyértelműen szemléltetve, hogy eredményeink alapján két lehetséges módja van a dimer kialakulásának. Az **(A)** modell egyetlen alegységek közötti diszulfid hidat feltételez a két 2773-as cisztein között (Cys<sup>2773</sup>-Cys<sup>2773</sup>). A **(B)** modell szerint (és klinikai alapon ezt a modellt preferáltuk – azóta megérzésünk igazolódott) három alegységek közötti híd tartja össze a dimert, melyeket a két Cys<sup>2771</sup>-Cys<sup>2773</sup>, valamint a Cys<sup>2811</sup>-Cys<sup>2811</sup> közötti diszulfid kötések alkotnak. Az összes többi: alegységen belüli, a szerkezetet stabilizáló diszulfid híd.
4. **Kérdések:** Az **(1)** kérdés a 3WINTERS-IPS vizsgálat során a 3-as típusú VWB-ben szenvedő betegek rögzített vérzései tüneteire vonatkozik. Eredményeinkből nyilvánvaló, hogy a 3-as típusú betegekben az olyan súlyos spontán vérzések mint az ízületi, szájüregi vérzések, nagyobb hematomák, vagy különösen a központi idegrendszeri vérzések sokkal gyakrabban fordultak elő, mint az 1-es típusú betegekben. Természetesen egyetértek Bírálóval, hogy mivel kicsi számokról van szó (pl. a 223 3-as típusú betegből mindössze 10 beteg szenvedett központi idegrendszeri vérzést), a számolt hányadosok statisztikai szórása jelentős. Mindazonáltal, tekintettel a vizsgálat szervezési nehézségeire, hasonló számú beteget felölelő vizsgálat ebben a betegségben nagyon

hosszú ideig nem várható, így az általunk közölt adatok lesznek irányadók a kutatók számára a jövőben.

5. A **(2)** kérdés a 3-as típusú VWB betegek vérékenységeinek patomechanizmusát érinti: ugyanis e betegekben a von Willebrand faktor teljes hiányán túl, illetve éppen emiatt a FVIII szint is igen alacsony<sup>3</sup>. Tehát a fenotípus létrejöttében mindkét faktor hiánya szerepet játszik – pl. a nyálkahártya vérzések nagyobb mértékben a VWF hiánynak, míg a gyakori ízületi vérzések inkább a FVIII deficienciának tulajdonítható. Mindezt a kezeléskor is figyelembe kell venni: rekombináns vagy nagy tisztaságú VWF faktor pótláskor a FVIII szint normalizálásához időre van szükség<sup>4</sup>, ezért akut vérzés vagy akut műtét esetén a FVIII azonnali pótlásáról is gondoskodni kell.
6. A **(3)** kérdés populáció-genetikai problémát vet föl. A hármastípusú VWD genetikai háttere lényegesen különbözik az összes többi eddig vizsgált európai és ázsiai populációtól, amennyiben 25%-os allélfrekvenciával egy olyan mutáció – a delExon1-3 – okozza a betegséget, amely egyetlen más népegyesületben sem fordult elő. Ez a mutáció alapító hatás következménye, amely vizsgálataink alapján több száz évvel ezelőtt következett be. Milyen következtetést lehet levonni egyetlen mutáció viselkedésének megfigyeléséből az érintett populációra? Nyilván óvatosságnak kell lenni a túl messzemenő következtetésekkel. Annyit megállapíthatunk, hogy ez a mutáció heterozigóta formában a túlélést nem befolyásolja, ezért terjedésének biológiai akadályai nem lettek volna. Hogy ez miért nem következett be, annak okát nem ismerjük. Nagyobb történelmi léptékű következtetés levonására egyetlen mutáció viselkedése véleményem szerint nem alkalmas.
7. A **(4)** kérdés a 3-as típusú VWD fenotípusos heterogenitásának okait boncolgatja. Valóban ugyanolyan alacsony VWF szintek esetén is széles határok között változik a betegek vérékenységeinek súlyossága, amit a vérzésmutató (*bleeding score*) segítségével igyekszünk kvantifikálni. E vérzésmutatók a mi betegeink között is igen széles skálán változtak: 10-32. A fenotípusos heterogenitás okaként általában még azonosítatlan genetikai tényezőket szokás feltételezni. Azonban nem genetikailag meghatározott tényezőknek is lehet igen lényeges hatása a vérzések súlyosságára, és itt olyan rheológiai tényezőket, mint pl. a beteg vérszegénysége, kell első helyen említeni. Régi megfigyelés különösen a primer hemosztázis zavarai esetén, hogy apró sorozatos vérzések miatt lassanként vashiány alakul ki, ami vérszegénységet okoz, és a hematokrit csökkenésével párhuzamosan a vérzések egyre súlyosabbak lesznek, amely *circulus viciosus* csak a vérszegénység rendezésével lehet megtörni. A vérzések és a hematokrit összefüggését azonban sem a magyarországi sem a 3WINTERS-IPS nemzetközi adatbázis nem rögzítette elemezhető módon, így a fenti gondolatment logikus, de csak anekdotikus eszmefuttatás marad.
8. Végül az **(5)** kérdés a VWF clearance mechanizmusára vonatkozik, és fölveti, hogy összefüggés lehet a VWF molekula N-terminális végén a D1-D2/D'D3 domainek segítségével az intracelluláris szintézis és kiválasztás során létrejött speciális virág-szerű képződmény, az ún. *dimeric bouquet* és a VWB 1C típusban észlelt fokozott clearance-e között. Bár a két jelenség a VWF szomszédos régióit érinti, a két jelenség között véleményem szerint nincs összefüggés. Sajnos a VWF clearance mechanizmusa még jórészt tisztázatlan, de a következő tények támasztják alá ezt a véleményt: **(a)** a *dimer bouquet* kialakulásához a Golgi és a Weibel-Palade testeken belüli savanyú pH-ra van szükség<sup>5,6</sup>, ezért a keringésbe kerülve a plazma neutrális pH környezetében ezek a harmadlagos szerkezetek már nem észlelhetők. **(b)** A VWF fehérjének a clearance receptorokhoz kötődő epitópjairól és a kötődés módjáról csak közvetett információkkal rendelkezünk. Az 1-es típusú VWB-en belül van egy olyan csoport, amelynek alacsony szintjét részben vagy egészében az egészségesnél gyorsabb clearance okozza – ezt a csoportot szokás 1C altípusnak nevezni. **(c)** Több VWF-en belüli mutációt is összefüggésbe hoztak ezzel a fenotípussal<sup>7</sup>, ezek egy jelentős része valóban a D3 domain területére esik<sup>8,9</sup>, mások azonban ettől a régiótól távol az A1, D4 vagy a CK domainek területén találhatóak. Hogy e mutációk pontosan milyen strukturális változás révén járulnak hozzá a gyorsult clearance-hez, illetve az egymástól távol eső mutációk ugyanazt vagy különböző strukturális eltérést indukálnak-e – mindez a tudomány jelenlegi állása szerint nyitott kérdés. **(d)** Olyan rekombináns VWF fragmensek, melyek csak a D'D3 domainet tartalmazzák, szintén kötődnek a clearance-ért legalábbis részben felelős SR-AI receptorhoz<sup>10</sup>, márpedig e fragmensek nyilván nem képesek a *bouquet* létrehozására. Mindezek alapján a clearance mechanizmusnak véleményem szerint nincs köze az intracelluláris *bouquet* képződéshez.

Zárásul újra megköszönöm az elismerő szavakat, és remélem, hogy a fenti válaszok megfelelően világították meg a fölmerült kérdéseket.

Budapest, 2024. november 25.



Bodó Imre

#### IDÉZETT IRODALOM

1. Holmberg L, Nilsson IM. von Willebrand's disease. *Eur J Haematol.* 1992;48(3):127-141.
2. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost.* 2006;4(10):2103-2114.
3. Mohl A, Boda Z, Jager R, et al. Common large partial VWF gene deletion does not cause alloantibody formation in the Hungarian type 3 von Willebrand disease population. *J Thromb Haemost.* 2011;9(5):945-952.
4. Mazurier C. von Willebrand disease masquerading as haemophilia A. *Thromb Haemost.* 1992;67(4):391-396.
5. Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, Voorberg J, Eikenboom J. Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood.* 2011;117(19):5033-5043.
6. Valentijn KM, Eikenboom J. Weibel-Palade bodies: a window to von Willebrand disease. *J Thromb Haemost.* 2013;11(4):581-592.
7. Haberichter SL, Balistreri M, Christopherson P, et al. Assay of the von Willebrand factor (VWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased VWF survival. *Blood.* 2006;108(10):3344-3351.
8. Lenting PJ, CJ VANS, Denis CV. Clearance mechanisms of von Willebrand factor and factor VIII. *J Thromb Haemost.* 2007;5(7):1353-1360.
9. O'Sullivan JM, Ward S, Lavin M, O'Donnell JS. von Willebrand factor clearance - biological mechanisms and clinical significance. *Br J Haematol.* 2018;183(2):185-195.
10. Wohner N, Muczynski V, Mohamadi A, et al. Macrophage scavenger receptor SR-AI contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Haematologica.* 2018;103(4):728-737.