

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Sejtaktivációs mechanizmusok és új biomarkerek
vizsgálata akut, illetve krónikus gyulladással járó
kórképekben**



Dr. Nagy Béla

**DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
Laboratóriumi Medicina Intézet**

Debrecen, 2023

1 BEVEZETÉS, TÉMAVÁLASZTÁS

A gyulladás az egyik legősibb és egyben a leggyakrabban kialakuló kórfolyamat, amely számos betegség patofiziológiai alapját képezi. A gyulladás nem más, mint a szervezet válasza valamilyen külső vagy belső stimulus által kiváltott szövetkárosodásra, és célja a szövetkárosodás okának és következményeinek a megszüntetése. A gyulladásos reakciók intracellulárisan, illetve az érintett sejteket körbevevő extracelluláris térben játszódnak le és protektív hatásukat elsősorban a proteolitikus kaskád rendszerek (pl. véralvadás, fibrinolízis, komplement stb.) aktiválásán keresztül biztosítják. Annak ellenére, hogy a gyulladásnak és a szöveti helyreállító folyamatoknak alapvetően jótékony hatásuk van, potenciálisan számos komplikációt és különböző szövődményeket okozhatnak a szervezetben.

A gyulladás időtartama alapján lehet akut, illetve krónikus lefolyású: az előbbi típus kialakulhat egy újonnan jelentkező provokáció eredményeként, úgy, mint egy heveny infekció miatt (pl. szepszisben) vagy egy invazív terápiás beavatkozást (pl. sztentbeültetés) követően, míg az idült formája többek között tartósan fennálló - különösen nem kezelt - metabolikus kórképekben (pl. obezitás, cukorbetegség), vagy más anyagcsere betegségekben (pl. cisztás fibrózis) jelentkezhet. Az inflammatórikus környezetben számos sejttípus, így az erek, valamint a szervek üregrendszerének belső felszínét borító különböző hámsejtek, továbbá a vér alakos elemei is jelentősen érintettek. A kórokozók vagy az általuk expresszált mediátorok, a túlzott mennyiségben felszabaduló citokinek és kemokinek, továbbá a véráramban emelkedett koncentrációban tartósan keringő metabolikus termékek akár direkt módon képesek stimulálni a vérlemezkéket, a vaszkuláris endothelsejteket, valamint a légúti epithelsejteket és sejtaktivációs folyamatokat indukálnak. Mindezen kóros hatások az érintett sejtek és szövetek diszfunkcióját okozzák. Ugyanakkor további fehérje, illetve nukleinsav természetű komponensek termelődéséhez és szekréciójához is vezetnek, amelyek különféle biomarkerként viselkedhetnek.

Az elmúlt két évtizedben jelentős tudományos figyelmet kaptak a különböző sejttípusokban lejátszódó gyulladás indukálta celluláris események. A kutatások egyrészt *in vitro* körülmények között sejtkultúrák és/vagy állatmodellek alkalmazásával, másrészt *ex vivo* betegminták analízise révén történtek különböző pro-inflammatórikus mediátorok és sejtaktiváció függő biomarkerek mérésén keresztül. Kiemelendő, hogy a sejtaktivációs folyamatok részletesebb megismerése nemcsak a gyulladással együtt járó betegségek patofiziológiai hátterének további feltérképezését teszi lehetővé, hanem az eddig még nem ismert terápiás célpontok, illetve új biomarkerek azonosítását is. Ezen vizsgálatok fontosságát

felismerve orvosi laboratóriumi diagnosztikai szakorvosként - a PhD dolgozatom témájának folytatásaként - tovább kutattam i) a vérlemezkékben, ii) az endothelsejtekben, és iii) a bronchiális epithelsejtekben akut vagy krónikus inflammatórikus környezetben lejátszódó sejtaktivációs folyamatok jelátviteli mechanizmusát és RNS szintű szabályozását *in vitro* körülmények között. Így sikerült modellezni az akut gyulladással járó (bakteriális szepszisben, illetve koronária sztentelést követően lejátszódó) celluláris körülményeket, továbbá a krónikus inflammációhoz (magas glükóz, illetve koleszterinszinttel járó metabolikus betegséghez, valamint a cisztás fibrózishoz) társuló sejtdiszfunkciókat. Ezzel párhuzamosan *ex vivo* klinikai betegminták vizsgálata során néhány új biomarker diagnosztikai alkalmasságát is értékeltük.

2 ELŐZMÉNYEK, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A vérlemezke aktiváció (pato)fiziológiai jelentősége

A vérlemezkék a csontvelőben termelődnek a megakaryocyták felszínéről lefűződő előalakok, ún. „proplatelet-ek” formájában, és fragmentálódást követően érik el érett, funkcionális állapotukat a keringésben. A humán érett thrombocyták sejtmaggal nem rendelkeznek, átlagos élettartamuk a keringésben 7-10 nap. Átmérőjük 2-4 μm , a normál vérlemezkeszám 150-400 x 10⁹/L között mérhető. Alapvető funkciójuk a vaszkuláris integritás biztosítása, amely azt jelenti, hogy érfalsérülés esetén az aktiválódott vérlemezkék megakadályozzák a túlzott vérvesztést azáltal, hogy a sérült érfalhoz kitapadva beindítják a primer hemosztázist. A szubendotheliális mátrixból olyan molekulák válnak szabaddá, mint a kollagén vagy a von Willebrand faktor (vWF), amik bejutnak a keringésbe, és különböző felszíni receptorokon keresztül aktiválják a thrombocytákat. Ennek eredményeként előbb thrombocytá adhesió, majd aggregáció következik be, illetve a fehérvérsejtekkel is összekapcsolódnak, amit heterotipikus aggregátumoknak hívnak. Ezen túlmenően az aktivált vérlemezkék felszínén a véralvadási folyamatok lezajlása is propagálódik, ami thrombin képződéshez vezet.

A hemosztázisban és trombózisban betöltött „klasszikus” szerepük mellett a thrombocyták számos immunológiai funkciója is ismertté vált. Különböző mediátorok és citokinek termelésével, továbbá a lymphocytákkal, monocytákkal, neutrophil granulocytákkal és a dendritikus sejtekkel való közvetlen interakciójuk révén a vérlemezkék összehangolják a gyulladást okozó folyamatok lezajlását. A reaktív thrombocyták ezen túlmenően - a bakteriális toxinokkal és kemokinekkel együtt - aktiválják a neutrophileket, ami neutrophil extracelluláris csapdák (NET) képződéséhez vezet a keringésben, illetve a tüdő alveolusaiban. Az aktivált

vérlemezkék képesek bizonyos baktériumokat (pl. *S. aureus*, *E. coli*) a felszínükön akár többféle receptoron keresztül megkötni, aminek eredményeképpen az *E. coli*-eredetű lipopoliszacharid (LPS) vagy a *S. aureus* α -toxinja szignál-dependens fehérjeszintézist tud indukálni a thrombocytákban. Mi több, a thrombin stimulált thrombocyták fagocitálni és így eliminálni is tudják a *S. aureus* baktériumokat.

Jótékony feladatai mellett a vérlemezkék túlzott mértékű aktivációját figyelhetjük meg számos betegségben, így a metabolikus kórképekben, pl. 2-es típusú diabetes mellitusban (DM2) vagy akut fertőzéssel járó súlyos szisztémás gyulladásban. A kóros aktiválódást kiválthatja közvetlenül a hiperglikémia és a hiperinzulinémia DM2-ben, akár nem-diabetesez egészséges személyekben is, továbbá a Gram-pozitív (peptidoglikán) és Gram-negatív baktérium eredetű strukturális komponensek (LPS) szepszisben, illetve a tartósan magas koleszterinszint is. A kóros metabolikus eltérések ráadásul elősegítik az érlemezésedés kifejlődését is, ami trombo-inflammációhoz vezethet a thrombocyták aktív közreműködésével.

A különböző kórképekben kialakult túlzott vérlemezke aktiváció napjainkban már könnyen detektálható többféle szenzitív laboratóriumi biomarker segítségével, amelyek közül az egyik legmegbízhatóbb paraméter az emelkedett sejtfelszíni és a plazmában szolubilis formában mérhető P-selectin (CD62P vagy SELP) receptor. A nyugalmi állapotban keringő vérlemezkéken csak nagyon kis mennyiségben van jelen ez a receptor, ugyanakkor stimuláció hatására percekben belül jelentős mértékben megjelenik a sejtfelszínen, és így részt vesz különféle sejt-sejt interakciók kialakításában. A P-selectin expresszió vizsgálatának így nemcsak diagnosztikai jelentősége van, de patofiziológiai szereppel is bír a trombotikus, gyulladásos és vaszkuláris szövődmények kialakulásában.

A vérlemezkékből aktiválódásuk során eltérő méretű vezikulák válnak ki és számos vérlemezke citoplazmafehérjét és külső membránreceptort hordoznak. Ebből kifolyólag a thrombocyta-eredetű mikropartikulák CD62P és CD63 pozitívak. Sőt, a PS-pozitív vérlemezkékből PS-pozitív mikropartikulák kerülnek a keringésbe, amiknek akár 50-100-szor nagyobb prokoaguláns aktivitásuk van, mint az aktiválódott vérlemezkéknek. Emellett a mikropartikulák érzékeny thrombocyta aktiváció-függő biomarkerek is, ezért több tanulmányunkban is megmértük a mennyiségüket a plazmában. Érdekességük még, hogy a számuk és a tartalmuk nagyban függ a thrombocytát ért stimulus természetétől. A vérben cirkuláló mikropartikulák mind a thrombocytákkal, mind a leukocytákkal közvetlen interakcióba lépnek, és jelentősen súlyosbítják a gyulladásos folyamatokat.

A vérlemezkék felszínén nagyszámban expresszálódnak különböző receptorok. A 7-traszmembrán receptorok közé tartozó ADP-receptorok közül a P2Y₁₂ receptort szeretném itt

kiemelni. Amíg a P2Y1 receptor az intracelluláris Ca^{2+} mobilizációért, a vérlemezke alakváltozásért és az aggregáció iniciálásáért felelős, addig a szekretált ADP a P2Y12 receptoron és a hozzá kapcsolt G_i fehérjén keresztül segíti elő az ADP vagy más agonisták által indukált thrombocytá aggregáció kiteljesedését. Emellett a P2Y12 receptor működése stabilizálja a már létrejött vérlemezke aggregátumot, és egyben fokozza a δ -granulum szekréciót, amit P2Y12-deficiens egerekben külön is igazoltak. Kutatásaink során a P2Y12 receptor mediált kóros vérlemezke aktiváció folyamatát vizsgáltuk egy hiperkoleszterinémias egérmodellben, amelynek eredményei később kerülnek bemutatásra.

A PKC fehérjecsald tagjai fontos jelátviteli integrátorai a vérlemezke aktivációnak számos thrombocytá funkció változás szabályozásán keresztül. A PKC izoenzimek három alcsoportba sorolhatók aktiválhatóságuk alapján: i) az ún. „klasszikus” formák (PKC α és PKC β) mind a Ca^{2+} , mind a DAG által képesek aktiválódni akár a G-protein mediált útvonalakon (PLC β), akár a GPVI receptoron keresztül (PLC γ) érkezik a stimuláció, és elsősorban a szekréción keresztül fokozzák a thrombocytá aktivációt; ii) az új vagy „novel” PKC izoenzimek közé tartozó PKC δ , PKC θ , PKC η és PKC ϵ (az utóbbi humánban nem, csak egérben expresszálódik) kizárólag a DAG-ra érzékeny, és meglehetősen eltérő hatásuk vannak a különböző szignálútvonalakon keresztül, míg végül iii) az „atípusos” formák (PKC ζ és PKC ι/λ) aktiválódásukhoz sem Ca^{2+} -t, sem DAG-t nem igényelnek, hanem teljesen más mechanizmusok révén, pl. PI3K-mediáltá útvonalon keresztül funkcionálnak. A „novel” PKC izoenzimek közül a PKC θ , PKC δ és PKC η thrombocytá funkcióban betöltött szerepét vizsgáltam egy külföldi tanulmányút során, amelyek közül a PKC θ -val kapott eredményeimet fogom a későbbiekben részletezni.

2.2 Kóros vérlemezke aktiváció kialakulása metabolikus kórképekben

DM2-ben a hiperglikémia, az inzulinrezisztencia és az idő előrehaladtával csökkenő inzulinszint miatt akár alacsonyabb koncentrációjú agonista hatására is bekövetkezhet a thrombocytá aggregáció, ami megnövekedett TXA_2 szintézishez vezet. A kóros glikémiás állapotra jellemző még a vérlemezkékben kimutatható nagyobb ic. Ca^{2+} mobilizáció, a fokozott tirozin kináz foszforiláció, kevesebb NO és több reaktív oxigényök (ROS) termelődése és a felszíni glikoproteinek nem enzimátikus glikációja. A magas Ca^{2+} koncentráció számos thrombocytá aktivációs mechanizmust indukál, többek között bizonyos PKC izoenzimek funkcióját. A ROS termékek felszaporodása vérlemezkefehérje nitrációhoz vezet, ami inaktíválja a szarkoendoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz enzimét, és ez még magasabb ic. Ca^{2+} szintet okoz fokozott calpain aktivációval, ami felelős számos thrombocytá fehérje

proteolíziséért. A thrombocytá aktivációjától függő gyulladáshoz vezető mediátorok, pl. CD40 ligand (CD40L), P-selectin, CD63 és a nemrégiben leírásra került LIGHT protein fokozott expressziója még több heterotipikus aggregátum és mikropartikula termelődését segíti elő, ami jól érzékelteti a trombo-inflammáció kialakulásának a veszélyét. Ráadásul a nem fiziológias metabolikus környezetben a vérlemezék RNS expressziója is jelentősen megváltozik, ami szintén hozzájárulhat a kóros vérlemezke reaktivitáshoz.

Jóval korábbi elméletek már felvetették, hogy a vérlemezke funkció diabeteses eltérései már csontvelői szinten kialakulnak, mivel eleve olyan thrombocyták termelődnek, amelyek a keringésbe kerülésükkor rögtön nagyobb aktiváltsági szintet mutatnak. A DM2 betegekben magasabb megakaryocytá ploidotást találtak, ami sokkal több retikulált thrombocytá termelődéséhez vezethet. A keringő vérlemezékhez képest nagyobb méretű és több messenger/hírvivő RNS-t (mRNS) tartalmazó fiatal, retikulált vérlemezék több TXA₂-t képesek kibocsátani.

A DM2 kialakulását megelőző obezitás is már együtt járhat kóros vérlemezke aktivációval. Ilyenkor a még relatíve alacsony szintű gyulladás a fokozott lipid peroxidációval TXA₂-dependens thrombocytá aktivációt indukálhat. Ugyanakkor érdemi testsúlycsökkenést követően jelentősen mérséklődtek a thrombocytá aktivációs markerek (pl. CD40L) szintje. Az adipokinek közül a rezisztin tölt be fontos szerepet a gyulladáshoz vezető folyamatok, az endothélium és a thrombocytá diszfunkció, valamint az oxidatív stressz összehangolt lejátékozásában. A rezisztin szintje ugyanis jelentősen megnő obezitásban, elősegíti az inzulin rezisztencia súlyosbodását, ráadásul képes direkt módon stimulálni az endothelsejteket.

A koleszterin magas koncentrációban önmagában is képes közvetlenül vérlemezke aktivációt indukálni, ezért hiperkoleszterinémiában a kóros thrombocytá funkciót tartják az egyik legfontosabb tényezőjének az atherosclerosis és a trombotikus komplikációk kialakulásában. Familiáris hiperkoleszterinémiában a homozigóta betegek az extrém magas koleszterinszint mellett még inkább ki vannak téve az artériás típusú trombózis veszélyének. A fokozott thrombocytá aktiválhatóság egyik magyarázataként a vérlemezke membránban megváltozott koleszterin tartalom áll, ami még több TXA₂ termelődéshez vezethet. Amikor a magas koleszterinszintet sikerült effektíven csökkenteni magas denzitású lipoprotein (HDL) segítségével, jelentősen mérséklődött a thrombocytá aktiváció mértéke a membrán koleszterintartalmának csökkentése által. A „klasszikus” thrombocytá agonisták által indukált útvonalak közül felmerült a P2Y₁₂ receptor által mediált folyamatok involváltsága, mert ennek a receptornak a megfelelő működéshez ún. „lipid tutajra” van szüksége a vérlemezke membránban.

2.3 Szepsziszhez társuló fokozott thrombocyta funkció

A szepszisz egy életet veszélyeztető klinikai állapot, amelyben a szervezet általában egy fertőzésre kontrollálatlan szisztémás válaszreakciót fejt ki. A szepszisznél még súlyosabb a szeptikus sokk, amely komplex metabolikus és celluláris rendellenességekkel is együtt jár. A szepszisz patofiziológiai alapját a túlzott mértékű gyulladás és az ezzel összefüggő sejtaktivációs, illetve rendellenes immunológiai folyamatok jelentik. Az előbbi eltérés többek között a koagulációs kaskád indukciójához és a fibrinolízis gátlásához vezethet, aminek még súlyosabb következménye az ún. disszeminált intravaszkuláris koagulopáthia (DIC). Ebben a hiperinflammatorikus környezetben óhatatlanul jelentős mértékű endothelsejt károsodás és vérlemezke aktiváció is bekövetkezik, amit tovább fokozhat a thrombocyták patogénnel vagy a kórokozó valamilyen alkotórészével való interakciója. A szepsziszhez gyakran társuló csökkent thrombocytaszám és kóros vérlemezke funkció tovább ronthatja a szepszisz kimenetelét. A fentiek eredményeképpen akár rövid időn belül bekövetkezhet sokszervi elégtelenség, ami a beteg korai halálához vezethet.

A thrombocyták aktiválódása központi szerepet játszik a szepszisz indukálta különböző celluláris folyamatok párhuzamos lejátszódásában. A reaktív vérlemezkék ugyanis összehangolják a hemosztatikus, a proinflammatorikus, a patogén elleni immunológiai és a szöveti helyreállító folyamatokat. Az aktivált vérlemezkék és az általuk kibocsátott mediátorok ilyen körülmények között direkt, illetve indirekt módon a fertőzés eliminálásában és az immunsejtek funkciójának regulációjában, sőt a későbbi fázisban a szöveti „remodelling”-ben is részt vesznek. A szepszisz kezdeti fázisában a reaktív vérlemezkékből nagyszámban mikropartikulák is lefüződnek, amelyek egyrészt többféle speciális feladatot képesek ellátni, pl. a sejtek közötti RNS transzfer biztosítása, de jelentősen hozzájárulhat a fokozott thrombin generációhoz és a sokszervi elégtelenség kialakulásához. Ugyanakkor az idő előrehaladtával, különösen szeptikus sokkban - már nagyon súlyos thrombocytopenia jelenlétében - jelentősen lecsökkenhet a vérlemezke-eredetű vezikulák száma.

A fenti klinikai tények ellenére a szepszises thrombocyta funkcióra vonatkozóan némileg ellentmondásos *in vitro* adatok váltak ismertté. Egyik oldalról a vérlemezkék fokozott felszíni P-selectin receptor expresszióját mutatták ki magas szolubilis P-selectin plazmaszinttel. Ezen eredmények a thrombocyták túlzott aktiváltsági állapotát jelezték, amit mások magas trombospondin szinttel, illetve thrombocyta funkciós teszttel (VerifyNow assay) emelkedettnek talált thrombocyta reaktivitási index értékkel is alátámasztottak már a betegség korai szakaszában. A másik oldalról viszont hiporeaktív thrombocytákról számoltak be szepsziszben csökkent *ex vivo* aggregációs képességgel, ami a vérlemezkeaktiváció időbeni „kimerülését”

jelezhetette. A szepszis első fázisában tehát a vérlemezkék fokozott aktivációs állapota nem kérdéses, amihez több thrombocytá receptor (pl. CD62P, CD63, CD31 stb.) magasabb expressziója, valamint fokozott sejtfelszíni fibrinogén köt(őd)és és emelkedett szolubilis GPVI szint is társult.

Szepszisben a kórokozók inváziójára első vonalban a veleszületett immunrendszer sejtjei, így a monocyták/macrophagok, a granulocyták és a természetes ölüsejtek (NK-sejtek) reagálnak, de a veleszületett immunrendszer részét képezik maguk a vaszkuláris endothelsejtek is. Ezeknek a sejteknek a felszínén ún. mintázatfelismerő receptorok (Toll-szerű receptorok, TLR) expresszálódnak. Ezekhez kötődnek a kórokozók különböző komponensei (patogén-asszociált molekuláris mintázat, PAMP), valamint az elhalt sejtekből felszabaduló molekulák (sérülés-asszociált molekuláris mintázat, DAMP), és mindez intracelluláris szignálútvonalak aktiválódásához vezet. Számos funkcionális TLR, pl. TLR4 a vérlemezkéken, sőt a megakaryocytákon is expresszálódik. A vérlemezkék TLR4-dependens aktiválódása, az érfalhoz való kitapadása és így a keringésből való kikerülése akár súlyos thrombocytopeniához vezethet, amihez az aktivált vérlemezkék neutrophilek általi szekvesztrálódása is hozzájárult *in vivo*. Ennek ellenére meglehetősen ellentmondásos *in vitro* eredmények születtek korábban, amikor különböző kísérleti kondíciók között, eltérő koncentrációjú LPS-sel aktiválták a thrombocytákat leukocyták jelenlétében vagy hiányában. Így nem volt egyértelmű, hogy az LPS képes-e direkt módon aktiválni a vérlemezkéket, vagy csak más receptor (pl. PAR) agonisták aktiváló hatását tudja felerősíteni. A TLR4-mediált megakaryocytá funkció eltérésekről és annak thrombocytákban észlelhető következményeiről ráadásul még alig állt információ rendelkezésre. Ezért is tartottuk fontosnak, hogy a TLR4-függő thrombocytá és megakaryocytá funkciókat részletesebben megvizsgáljuk. Megjegyzendő, hogy a Gram-pozitív bakteriális fertőzés a TLR2-n keresztül képes volt modulálni nemcsak a vérlemezke aktivációt, hanem a thrombopoiesist és a megakaryocyták érését is. Ezen előzetes adatok is azt igazolják, hogy a vérlemezkék mellett maguk a megakaryocyták is aktívan részt vesznek a szepsziszhez társuló gyulladási folyamatok és következményeik kialakításában.

2.4 A vérlemezkék RNS tartalma és transzlációs képessége

A keringő vérlemezkék bár sejttaggal nem rendelkeznek, mégis nagyszámban hordoznak meglehetősen stabil kódoló és nem-kódoló RNS molekulákat, amik a megakaryocytákból jutnak be a lefűződésük során, mivel a thrombocyták nem képesek RNS-t szintetizálni. A thrombocytá RNS-tartalom jelentős része a fiatal, thiazol-narancs pozitív és egyben reaktívabb retikulált vérlemezkékben található meg. Számítások szerint egy vérlemezke átlagosan össz RNS

tartalma 2,2 femtogramm, de a retikulált formákban akár 20-40-szeres mennyiségben is jelen lehet. A leukocytákban kb. 1000-szer több RNS található, ugyanakkor a magas vérlemezkeszám miatt a thrombocyta-eredetű RNS egy jelentős részét teszi ki a vér alakos elemeiben fellelhető teljes RNS állománynak. Az érett mRNS-ekből, amelyek poly-A véggel rendelkeznek és intront általában nem tartalmaznak, kb. 8000-9000 fehérje-kódoló transzkript áll rendelkezésre újgenerációs szekvenálási (NGS) adatok alapján. Az 1990-es évek elején az elsők között sikerült igazolni a GPIIb/IIIa (α Ib β 3) receptor két alegységét kódoló transzkriptet (*ITGB3* és *ITGA2B*). A legmagasabb expressziót mutató „általános” transzkriptek szintje jól konzervált, ami döntően egységes az egyének között, míg a kisebb mértékben kifejeződő transzkriptek mutatják általában a legnagyobb expressziós eltéréseket.

A vérlemezékben a kódoló RNS-ek mellett nagy mennyiségben vannak jelen nem kódoló RNS-ek is, továbbá olyan megakaryocita-eredetű sejtalkotók (pl. riboszóma, endoplazmatikus retikulum, translációs faktorok stb.) és enzimek (pl. Dicer, Ago2 stb.), amik lehetővé teszik bizonyos stimulusok hatására a *de novo* fehérjeszintézist. A vérlemezék mRNS tartalma döntően érett formákat foglal magába, mivel a pre-mRNS-ek processzálása döntően a megakaryocytákban játszódik le. Ugyanakkor erős vérlemezke agonisták (pl. thrombin) hatására a pre-mRNS „splicing” is le tud játszódni a thrombocytákban, ami interleukin-1 β (IL-1 β), szöveti faktor (TF) és IL-18 *de novo* szintézishez vezethet.

Ezen eredményekből az következik, hogy sejtaktiválódást követően képes a vérlemezke proteom is jelentősen megváltozni, hogy a thrombocyták ily módon (is) reagáljanak az őket ért stimulusokra. Nemrégiben igazolták, hogy a thrombocyta *SELP* gén mRNS-e funkcionálisan aktív, és a sejt felszíni P-selectin receptor expressziót képes befolyásolni. Mindezek alapján került vizsgálataink középpontjába az egyik legfontosabb felszíni receptor, a P-selectin (*SELP*) kifejeződésének analízise, hogy vajon kóros metabolikus, illetve szeptikus környezetben képes-e a vérlemezke *de novo* fokozni a *SELP* expressziót - akár megváltozott miRNS szintek révén - ami együtt járhat nagyobb thrombocytafehérje mennyiséggel is.

2.5 Thrombocyta aktivációval összefüggésbe hozott miRNS-ek és cél mRNS-ek

A thrombocyták nem-kódoló RNS-ei közé tartoznak az érett miRNS-ek, de riboszómális RNS-ek, transzfer RNS-ek, pszeudogének, és hosszú nem kódoló RNS-ek egyaránt jelen vannak, amelyek szintén a megakaryocytákból kerülnek a vérlemezékbe. Mivel a vérlemezékben nincs transzkripció, úgy tűnik, hogy a nem-kódoló RNS-ek, különösen a miRNS-ek működésének jóval nagyobb szerep jut ebben a sejt típusban, mint a maggal rendelkező sejtekben. Az mRNS-ekhez képest csak jóval később, 2009-ben igazolták a thrombocyta

miRNS-ek jelenlétét, és relatíve nagyobb is a miRNS/össz RNS arány a vérlemezkékben, mint a fehérvérsejtekben. Több, mint 500 miRNS-t azonosítottak már, közülük a let-7 család adja a teljes miRNS állomány kb. felét. Ezek a miRNS-ek nemcsak a vérlemezke aktivációt elősegítő, de az azt megakadályozó fehérjék expresszióját is befolyásolhatják, így kontrollálva a thrombocytá aktivációs folyamatokat és a vérrögzépződést. Következésképpen a miRNS szintek megváltozása jelentősen befolyásolhatja a thrombocytá reaktivitás mértékét.

A legnagyobb mennyiségben megtalálható miRNS-ek közé tartozik a miR-223, miR-126, miR-26b, let-7, miR-140, és a miR-24. Ezek a miRNS-ek a vérlemezkékben meglévő formák közel 80%-át alkotják, így feltehetően ezeknek lehet jelentősebb szerepe a thrombocytá funkció szabályozásában. A nem aktivált vérlemezkékben a miRNS-t tartalmazó RISC komplex megakadályozza az aktiváció-függő fehérjék szintézisét, a Dicer1 enzim aktív működése pedig további érett miRNS-eket eredményez, így ez az egyensúly fenntartható. A Dicer1 közvetett hatását a vérlemezke aktivációban az erre az enzimre deficiens egerekben is igazolták, amikor a vad típusú állatokhoz képest jelentősen nőtt az α IIb β 3 integrin expressziója és ezáltal a thrombocyták *in vivo* és *in vitro* funkciója is fokozottabb lett.

Néhány miRNS és cél mRNS közötti direkt funkcionális kapcsolatot már igazoltak humán vérlemezkékben. Elsőként egy kanadai kutatócsoport erősítette meg, hogy a miR-223 szabályozza a P2Y₁₂ receptor expresszióját. A miR-223 továbbá a β 1-integrin, a kindlin-3 és a FXIII véralvadási faktor A alegységének (FXIII-A) expressziójának regulációjáért is felelős. Ennek köszönhetően a miR-223-depletált egerekben fokozott vérlemezke aggregációt, több, nagyobb méretű vérrögzépződését és elhúzódó alvadék retrakciót tapasztaltak. A kórosan reaktív thrombocytákban a csökkent miR-96 expresszió a SNARE fehérjék közé tartozó VAMP8 (vezikula-asszociált membrán protein 8) emelkedett mRNS és protein szintjéhez vezetett, ami a vérlemezkek fokozott szekréciójához járult hozzá. A megnőtt miR-126 az ADAM9 (diszintegrin és metalloproteináz 9) fehérje expresszióját képes gátolni, így a vérlemezkek I. típusú kollagénhez való adhéziója csökken. Predikciós programok (pl. www.targetscan.org) alapján a miR-26b és a *SELP* mRNS között erős a komplementaritás, de funkcionális kapcsolatukról korábban nem állt kísérletes adat rendelkezésre. Ezért megvizsgáltuk a thrombocytá miR-26b szerepét ebben a vonatkozásban az általunk beállított különböző gyulladási körülmények között *in vitro*.

2.6 Vezikulákban történő miRNS transzfer és funkcionális hatásai

A thrombocytá mikropartikula által szállított miR-223 az egyik legszélesebb körben vizsgált vezikuláris miRNS, aminek „transzfekciója” hozzájárul a szív- és érrendszeri betegségekben az

endothélium diszfunkcióhoz, továbbá két gén (*FBXW7*, *EFNA1*) mRNS szintjének modulálásán keresztül az endothelsejt apoptózishoz is. Ezért a mikropartikula miRNS-ek - parakrin hatásuk miatt - fontos terápiás célpontokká válhatnak, ugyanakkor újfajta diagnosztikai markerek is lehetnek a kardiovaszkuláris, valamint a daganatos betegségekben. A miRNS-ek szepszisben betöltött szerepéről a későbbiekben még lesz szó.

2.7 Vérlemezke miRNS expresszió változások diabetesben és szepszisben

Felfedezésük óta egyre nagyobb érdeklődés irányul a vérlemezékben azonosítható miRNS-ek expressziójának és szerepének vizsgálatára egyes betegségekben, így DM2-ben is. A miRNS-ek érését katalizáló Dicer1 enzim aktivitását a Ca^{2+} -függő calpain 1 és 2 gátolja a diabeteses thrombocytákban, ezáltal számos vérlemezke miRNS (pl. miR-142, miR-143, miR-155) szintje alacsonyabbá válik. A csökkent miR-223 és miR-146a thrombocyta expressziója a diabeteses betegekben szoros összefüggést mutatott a stroke kialakulásának kockázatával. Az alacsony thrombocyta miR-223 szint a P2Y12 receptor expresszió befolyásolásán keresztül ineffektív receptorinhibitor kezelést okozhat, ami magas thrombocyta reaktivitáshoz vezethet és így a kardiovaszkuláris rizikót is növelheti.

Szepszisben elsősorban a keringő miRNS-eket vizsgálták korábban, amiket lehetséges új diagnosztikai markerként analizáltak plazma vagy szérum mintákban. Arról azonban még kevés adat áll rendelkezésre, hogy a „megakaryocyta-vérlemezke-tengely” miRNS profilja hogyan és milyen mértékben változik meg vérmérgezéskor, és ennek eredményeként mely cél mRNS-ek/fehérjék expressziója változik, ami vérlemezke funkció eltérést is okozhat. Egy korábbi szepszises tanulmányban az átfogó miRNS analízis a teljes exoszóma populációban, a szérumban és a vér különböző alakos elemeiben együttesen történt. Tekintettel arra, hogy a fehérvérsejtek és a thrombocyták nagyon eltérő miRNS repertoárral rendelkeznek, ezért további vizsgálatok váltak szükségessé, hogy „tisztított” vérlemezke mintákban is megtörténjen a miRNS-ek analízise szepszisben.

2.8 Endothelsejt károsodás kialakulása és szabályozása szepszisben

Szepszisben a reaktív vérlemezék számos olyan gyulladási mediátort és citokint bocsátanak ki a környezetükbe, amelyek elsősorban az endothelsejtek és a fehérvérsejtek működésére vannak hatással. Az endothelsejtek morfológiai változáson mennek keresztül, és eközben egyrészt már előre szintetizált fehérjék, pl. vWF, P-selectin gyakorlatilag azonnal kikerülnek a felszínükre (I. típusú endothelsejt aktiváció), míg *de novo* fehérjeszintézissel további

receptorokat expresszálnak, pl. ICAM-1 (intercelluláris adhéziós molekula 1), VCAM-1 (vaszkuláris sejtadhéziós molekula 1) és E-selectin, ami akár több órát is igénybe vehet (II. típusú endothelsejt aktiváció). Ezek a receptorok nagyban elősegítik a reaktív thrombocyták és leukocyták kitapadását a gyulladt érfalhoz. A fehérvérsejtek kezdeti kitapadásában, az ún. „rolling” lezajlásában az egyik központi receptor az ICAM-1, ami a leukocyták transzcelluláris diapedesisében is fontos. Korábban igazolták, hogy súlyos gyulladásban az ICAM-1 receptor nagy mennyiségben expresszálódik az endothelsejtek felszínén IL-1-függő mechanizmus révén az aktivált thrombocyták jelenlétében, ugyanakkor proteolitikus hasításra szolubilizálódik. A keringő ICAM-1 ráadásul a szepszis egyik megbízható biomarkereként is használható, amely jól korrelál a betegség súlyosságával és a klinikai kimenetellel.

Az ICAM-1 receptor expresszióját több miRNS is közvetlenül szabályozza. Korábbi eredmények szerint AMI-t követően az aktiválódott vérlemezkék miRNS-eket adnak le, amelyek exoszómákba csomagolva jutnak el az endothelsejtekhez. Ezek közül az egyik a miR-320b, ami jelentős parakrin hatást gyakorolva csökkentette az ICAM-1 expresszió mértékét, ugyanakkor nem vizsgálták szeptikus viszonyok között. Felmerült a kérdés, hogy vajon a vérlemezke-eredetű miR-223 a mikropartikulákon keresztül szepszisben is képes-e befolyásolni az endothelsejtek ICAM-1 expresszióját. Ez a folyamat annak a miRNS-ek által kifejtett ellenregulációs mechanizmusnak lenne a része, amikor a szervezet a túlzott gyulladással és szövetkárosodással együtt járó celluláris elváltozásokat próbálja fékezni és megakadályozni a további destrukciót.

2.9 Koronária sztentelést követő endothelsejt diszfunkció és klinikai következményei

Egy invazív terápiás beavatkozás miatt különböző súlyosságú érfalkárosodás jöhet létre, ami korai és késői klinikai komplikációkkal járhat együtt. Ennek következtében percek-en-órákon belül thrombocytá, majd endothelsejt aktiváció játszódik le. Az endothelsejt diszfunkció mellett a mechanikai behatások az érfal médiumában is sérülést okozhatnak, ami számos citokin, növekedési faktor és proteáz felszabadulásához vezethet. Hosszabb távon mindez simaizomsejt proliferációt, migrációt és az extracelluláris mátrix átépülését eredményezi. Ezen „veszélyek” ellenére az elmúlt 25 évben a kardiológiai centrumokban széles körben alkalmazzák a perkután koronária intervenciót (PCI) azért, hogy az elzáródott koronáriába történő sztentbeültetéssel minél hatékonyabb védelmet biztosítsanak az újabb érelzáródás (in-stent restenosis, ISR), valamint az esetleges vérrögképződés (sztenttrombózis) ellen.

A koronária sztentek két fő típusát különböztetjük meg: a kizárólag „mechanikai jelenlétet” biztosító fémszent („bare metal stent”, BMS) és az ennél korszerűbb, gyógyszerrel bevont sztent („drug eluting stent”, DES). Az utóbbit egyre szélesebb körben alkalmazzák elsősorban olyan kardiológiai betegeknél, amikor a BMS beavatkozást követően ismét sztentelés szükséges újabb okklúzió miatt. Trombotikus komplikációkra fokozottan hajlamosító betegségek esetén már a DES-t választják első vonalban, pl. DM2-ben. Klinikai adatok alapján az everolimussal bevont DES megbízhatónak bizonyult akut miokardiális infarktust (AMI) követően, pitvar fibrillációban és stabil anginában, mivel a lokálisan lassan eluáló gyógyszer jelentősen csökkentette a korai adverz események kialakulásának kockázatát. Ezzel szemben a BMS beültetése után gyorsabb az endothelizáció, emiatt a sztenttrombózis, illetve az ISR kockázata is nagyobb lehet. A DES és a BMS hatékonysága közötti különbségeket számos betegtanulmányban vizsgálták klinikai paraméterekkel, azonban vagy nem vizsgálták közvetlenül a különböző sejtaktivációs markerek szintjét, vagy a sztentek endothelsejtet aktiváló tulajdonságainak összehasonlításakor eltérő eredményeket kaptak. Ezért gondoltuk úgy, hogy további kísérletes adatokra van szükség a kétféle koronáriaszentet endothelsejt funkciót befolyásoló hatásának és az ISR új biomarkerekkel való előrejelzésének analízisének illetően.

2.10 Gyógyszeres koronáriaszentet hatásmechanizmusa a beavatkozás indukálta endothelsejt aktiváció mérséklésében

Az endothelsejt-aktiváció folyamata egy rendkívül összetett szabályozási mechanizmusa alatt áll, amit számos ponton lehet gátolni vagy legalább mérsékelni. A DES jótékony, ISR-t megelőző hatása a lokálisan egyenletesen felszabaduló gyógyszernek köszönhető, aminek közvetlen, endothelsejt funkciót befolyásoló hatásáról kevés információ állt rendelkezésre. Az everolimus egy mTOR inhibitor, amit leggyakrabban immunszuppresszív gyógyszerként alkalmaznak szervátültetésben részesült betegeknél, hogy megelőzzék a beültetett szerv kilökődését. Simaizomsejtekben a sejtciklus G1 fázisának gátlásán keresztül antiproliferatív hatású. Ugyanakkor a fehérvérsejtekre kifejtett gyulladáscsökkentő hatását is igazolták: neutrophil granulocytákban csökkentette az IL-8 termelést és a sejtek TNF- α indukálta endothelsejt-adhézióját is mérsékelte. Az everolimus endothelsejt aktivációt csökkentő hatásának lehetséges transzkripciós és poszttranszkripciós szabályozó mechanizmusait ugyanakkor még korábban nem vizsgálták, ezért *in vitro* ezen celluláris folyamatokat is modelleztük.

Az endothelsejtek génexpresszió finomszabályozásáért felelős miRNS-ek patofiziológiai szerepét vaszkuláris betegségekben, illetve terápiás okokból kialakult érfalsülést követően vizsgálták már. A koronárisztent műtéteket követő neointima képződésben és az ISR kialakulásában is felmerült a megváltozott expressziót mutató miRNS-ek szerepe: a keringő miR-21 szintje jelentősen emelkedett, addig a miR-100, miR-143 és miR-145 expressziója szignifikánsan kisebb volt, amelyek az érfal simaizomsejtjeinek proliferációját és migrációját befolyásolták. Arról viszont kevés információ áll rendelkezésre, hogy mely miRNS-ek vesznek részt a PCI indukálta endothelsejt aktiváció kialakulásában. Az endothelsejt aktivációs markerek (VCAM-1 és E-selectin) kifejeződésének szabályozásában a miR-181b szerepét részben már mások analizálták, amit *in vitro* tovább vizsgáltunk néhány plazma miRNS biomarker szerepének értékelésével együtt.

Az enhanszer RNS-ek (eRNS) a nem-kódoló RNS-ek családjába tartozik. Az eRNS-ek azonosítása RNS szekvenálással történik, míg CHIP szekvenálással az aktív eRNS-eket jelölő markerek (H3K27Ac) és az RNS polimeráz II működése igazolható. Az eRNS-ek a DNS enhanszer régióiról kerülnek átírásra és a gének transzkripcióját szabályozzák. Az aktív eRNS-ek az RNS polimeráz II-vel kapcsolódnak össze, transzkripciós és inicializációs faktorokat „toboroznak” a promóter régióhoz, ezáltal fokozhatják a gének transzkripcióját. A szekvenálási adatok az NCBI GEO adatbázisában elérhetők és meghatározott génekre fókuszálva újra analizálhatók. Ezt vizsgálataink során mi is megtettük korábbi TNF- α -stimulált és kontroll HUVEC sejtek adatainak felhasználásával, hogy értékelni tudjuk a VCAM-1 és E-selectin receptor TNF- α , valamint everolimus mediált transzkripciós szabályozását az általunk kezelt endothelsejt kultúrában.

2.11 Krónikus légúti gyulladás által kiváltott bronchiális epithelsejt diszfunkció cisztás fibrózisban

A krónikusan fennálló gyulladással stimulációknak kitett epithelsejtek vizsgálatára az egyik betegségmodell a cisztás fibrózis (CF). A CF a leggyakoribb életet lerövidítő, autoszomális recesszív öröklődésmentet mutató betegség a kaukázusi populációban. A 7-es kromoszóma hosszú karján található nagy méretű, kb. 200.000 bázispárból álló *CFTR* gén kódolja az 1480 aminosavból felépülő CFTR-csatornát, és a gén két kóros variánsának együttes jelenléte okozza a CF betegséget. A CFTR funkcióját tekintve egy cAMP függő Cl⁻/HCO₃⁻ ioncsatorna, amely a polarizált epithelsejtek apikális membránján helyezkedik el. A szervezet különböző

szöveiteiben expresszálódik, többek között a tüdőben, a verejtékmirigyekben, a hasnyálmirigyben és az ondóvezetékben.

A *CFTR* génnek eddig több, mint 2000 mutációját írták le, és bár nem mindegyikének ismert a klinikai következménye, közülük legalább 1500 bizonyítottan patogén. Az európai, köztük a magyarországi betegpopulációban a leggyakoribb *CFTR* variáns a p.Phe508del (F508del, a régi nomenklatura szerint delta-F508), amelyet hazánkban a betegek kb. 80-85%-a hordozza homozigóta vagy összetett („compound”) heterozigóta formában. Ennek a mutációnak a lényege egy 3 bázispárt érintő deléció a gén 11-es exonjában, amely az aminosavlánc 508-as pozíciójában lévő fenilalanin kieséséhez vezet.

A csökkent *CFTR* funkció a Na^+ , a Cl^- és a HCO_3^- szállítási zavarához vezet az epithelsejtekben, amelynek következtében a külső elválasztású mirigyek epitheliális felszínén, így a légutakban, a gasztrointesztinális és az urogenitális traktusban megváltozik a szekrétrumok minősége, és az érintett szervek funkcionális károsodásához vezet. A kóros Cl^- és víztranszport, valamint a HCO_3^- szekréció zavara mellett a szekrétrumok dehidrációja és csökkenő pH-ja is fontos részét képezi a légúti betegség patomechanizmusának. A savas közegben a légúti váladékban lévő mucinok összecsapzódnak CF-ben, ami a víztartalomtól függetlenül is nagy mértékben rontja a légutak öntisztulási működését.

Meggyőző adatok utalnak arra, hogy a CF-re jellemző fokozott gyulladásos válasz a légutakban nem kizárólag szekunder módon, tehát infekciók hatására alakul ki, hanem szerepet játszanak a defektív *CFTR*-hez köthető proinflammatorikus folyamatok is. Hunter és munkacsoportja korábban kimutatta, hogy a vad típusú *CFTR*-csatorna – eddig még nem pontosan ismert mechanizmussal – gátló hatást fejt ki a bazális és a $\text{TNF-}\alpha$ által indukált $\text{NF-}\kappa\text{B}$ útvonal aktivitására a légúti epithelsejtekben, míg a *CFTR*-csatorna szelektív funkció gátlása jelentősen növelte az $\text{NF-}\kappa\text{B}$ jelátvitel aktivitását. Mindezek alapján a *CFTR* fehérje gyulladáscsökkentő hatásának kifejtéséhez az ép csatornafunkciója látszik szükségesnek. Ennek is köszönhető, hogy az igen hamar jelentkező pulmonális fertőzések hatására a normálisnál intenzívebb gyulladásos válasz alakul ki, amit a neutrophil granulocyták dominanciája és a tüdőkárosodással összefüggő fokozott neutrophil elasztáz (NE) aktivitás jellemez.

Az WFDC („whey acidic protein four-disulfide-core”) proteincsalád kis méretű fehérjéket foglal magában, amelyek különböző, rendszerint protektív funkciót látnak el, úgy, mint antiproteáz, antibakteriális, vagy gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal bírnak. A tüdőben nagy mennyiségben expresszálódnak, így a tüdő homeosztázisának fenntartásában és a proteolitikus hatások elleni védelemben játszhatnak szerepet. Jelenleg 18 WFDC altípus ismert,

amelyek közül az SLPI-t vagy másik néven WFDC4-et az epitheliális sejtek és az aktivált macrophagok termelik, és gyulladáscsökkentő hatást fejt ki a monocytákra, továbbá semlegesíti a NE-t és az IL-8-at, valamint fékezi a neutrophilek beáramlását.

A HE4 (másnéven WFDC2) fehérje expresszióját számos egészséges és malignus szövetben előzetesen kimutatták. A klinikumban elsőként ováriumdaganatban, majd endometrium carcinomában és tüdőtumorban vizsgálták tumormarkerként. A CF-es tüdőbetegség és a fokozott HE4 expresszió potenciális kapcsolatára egy olyan korábbi tanulmány hívta fel a figyelmünket, amelyben immunhisztokémiai festéssel emelkedett epitheliális HE4 expressziót mutattak ki CF-es betegek tüdőbiopsziás mintáiban. Azt viszont nem vizsgálták, hogy a légúti hámban a HE4 fehérje fokozott termelődésének mi a mechanizmusa ebben a betegségben, ezért CF-es bronchiális epithelsejt kultúrában analizáltuk a HE4 expresszió intracelluláris körülményeit *in vitro*.

2.12 Új biomarkerek tesztelése CFTR moduláló kezelésben részesülő cisztás fibrózisos betegekben

A kezelési stratégiák az elmúlt évtizedben olyan gyógyszeres lehetőségek irányába fordultak, amelyek a reziduális CFTR aktivitással járó mutációk egy részénél képesek fokozni a működő CFTR-csatorna mennyiségét a sejtmembránban (korrektorok), vagy javítani a sejt felszínre már expresszált CFTR ioncsatorna funkcióját (potenciátorok). A CFTR potenciátor *ivacaftor* (Kalydeco®) a kloridcsatorna nyitási frekvenciáját fokozza, így eredményesen alkalmazható a III. osztályú, ún. kapumutációt (pl. p.Gly551Asp) hordozó CF-es betegekben. A CFTR korrektorok, mint például a *lumacaftor*, *tezacaftor* vagy *elexacaftor* a csatornafehérje intracelluláris érési folyamatát és a sejt felszínre való kijutását fokozzák. A CF-es betegek többsége által hordozott p.Phe508del mutáció esetén a CFTR defektus molekuláris mechanizmusa összetettebb, amelyben a fehérje érési folyamatai, ritkább csatornanyitás és a fokozott „turnover” is szerepet játszik. Így nem volt igazán meglepetés, hogy sem az *ivacaftor*, sem a korrektorok önmagukban nem voltak kellően hatásosak ezekben a betegekben. Ugyanakkor egy korrektor és egy potenciátor molekula kombinált alkalmazása már hatásosabb kezelési lehetőséget jelentett. A *lumacaftor/ivacaftor* (Orkambi®) vagy a *tezacaftor/ivacaftor* (Symdeco®) a p.Phe508del homozigóta betegekben, míg a legújabb hármas kombináció, a *tezacaftor/elexacaftor/ivacaftor* (Kaftrio®) már a CF-es betegek többségét kitevő p.Phe508del összetett heterozigóta genotípus esetén is hatásosnak bizonyult. A CFTR modulátorok korai, még a kifejezett strukturális hörgő- és tüdőkárosodás bekövetkezte előtt történő bevezetése jelentősen lassítja a tüdőbetegség progresszióját, csökkenti a légúti akut exacerbációk, a kórházi

kezelések és az antibiotikum kezelések gyakoriságát, ráadásul az extrapulmonális következményeket is mérsékli, többek között javítja a betegek tápláltsági állapotát.

A CF-es betegek nyomon követésére mikrobiológiai, radiológiai, légzésfunkciós és laboratóriumi vizsgálatok állnak rendelkezésünkre. A tüdőbetegség előrehaladását egyik legjobban jelző, leggyakrabban hivatkozott paraméter a légúti obstrukció mértékét kifejező FEV₁ („forced expiratory volume in 1 sec”, az elvárt érték %-ában kifejezve), amelyet spirometriával mérnek. A CFTR modulátor kezelések alatt a verejték klorid koncentráció gyors csökkenése igazolja a javuló CFTR funkciót. Elegendő mennyiségű verejtékminta gyűjtése csecsemőkorban azonban újabb technikai nehézséget jelenthet. A verejték klorid koncentráció mérés értékelését ráadásul nehezíti a nagymértékű intra- és interindividuais variabilitás.

Tekintettel arra, hogy a CF-es légúti betegség patomechanizmusának alapvető folyamatait a krónikus légúti gyulladás jelenti, a betegség követésének egyik fontos lehetőségét adhatja a gyulladással mediátorok detektálása vérből vagy a légúti felszínről származó (köpet és/vagy bronchoalveoláris mosófolyadék, BALF) mintákból. Az elmúlt két évtizedben számos klinikai tanulmány jelent meg azzal kapcsolatban, hogy a fenti folyamatokra érzékeny és specifikus biomarkerek mennyire alkalmasak a pulmonális gyulladás korai detektálására és előrejelzésére. A légutakban korábban fokozott pozitívítást mutató HE4 fehérjét viszont munkacsoportunk előtt még nem vizsgálták gyulladással biomarkerként, hogy miként változik a szintje a keringésben, és vajon követi-e a különböző CFTR moduláló gyógyszerek hatását CF-ben.

3 CÉLKITŰZÉSEK

Tudományos munkám célja az volt, hogy nagy betegpopulációkat érintő akut, illetve krónikus gyulladással járó kórképekben megvizsgáljuk a különböző sejtípusokban lejátszódó intracelluláris folyamatokat, amelyek kóros sejtaktivációhoz és akár diszfunkcióhoz vezethetnek, így befolyásolva a betegség lefolyását és kimenetelét. Vizsgálataink középpontjában a vérlemezkék, az endothelsejtek és a légúti epithelsejtek működése állt, amelyek számos gyulladással és metabolikus mediátor által aktiválódhatnak. Ezen sejtes változásokat kívántuk modellezni *in vitro* kísérletsorozattal sejt kultúrát vagy egérmodellt használva, továbbá *ex vivo* betegminták analízisével új biomarkereket értékeltünk.

A következő tudományos kérdésekre kerestem a választ az alábbi vizsgálatok elvégzésével:

1) Hogyan vesz részt a PKC θ izoenzim a thrombocyta aktivációban?

- Vizsgáltuk a PKC θ foszforilációt különböző agonistákkal indukált thrombocyta aktiváció után, továbbá értékeltük a vérlemezke aggregációt, az α IIb β 3 integrin aktivációt és az α - illetve δ -granulum szekréció mértékét a PAR és GPVI receptor aktivációt követően.
- Igazoltuk a PKC θ -nak a szekrécióban és a TXA₂ szintézis regulációjában betöltött szerepét a Syntaxin-4 és az ERK foszforiláción keresztül.
- Egérmodellben értékeltük a thrombocyta PKC θ hiányának hatását az *in vivo* vérrögképződésre FeCl₃-indukálta carotis sérülést követően.

2) Milyen miRNS-függő mechanizmusok modulálják a thrombocyta P2Y12 és P-selectin receptorok expresszióját DM2-ben?

- Értékeltük a vérlemezkék aktiváltsági állapotát DM2-ben és egyben kvantáltuk néhány releváns miRNS (miR-223, miR-26b és miR-140) expresszióját izolált thrombocytákban és plazma mintákban összehasonlítva obez és egészséges kontroll mintákkal.
- Modelleztük a diabeteses csontvelői körülményeket kétféle megakaryocita sejtvonalon, és analizáltuk a hiperglikémia közvetlen hatását a thrombocyta és megakaryocita miRNS-ek és cél mRNS-ek (P2RY12 és SELP) szintjére.
- Igazoltuk a miR-26b és a miR-140, valamint a SELP mRNS közötti direkt funkcionális kapcsolatot, illetve ellenőriztük a kóros miRNS expressziók vonatkozásában a DM2-ben megváltozott Dicer1 szintjének szerepét megakaryocita sejt kultúrában.

3) Milyen mértékben emelkedik a vérlemezék aktiváltsági állapota obezitásban, és a P2Y₁₂ receptor mediált szignálútvonalnak ebben milyen szerepe van?

- Összefüggéseket kerestünk a thrombocyta aktiváció specifikus biomarkerek szintje és az obezitással együtt járó nagyobb carotis intima-média vastagság (IMT), valamint egyéb korai atherosclerosis rizikófaktorok között.
- Normál és kétféle magas zsírtartalmú diétán tartott LDL-receptor hiányos, illetve vad típusú (WT) egerekben értékeltük a különböző thrombocyta agonistákkal indukált vérlemezke aggregáció, az α IIb β 3 integrin aktiváció, és az α -, valamint δ -granulum szekréció eltéréseit.
- Elemeztük a P2Y₁₂ receptor mediált útvonal közvetlen szerepét a kóros vérlemezke reaktivításban a receptor direkt blokkolásán, illetve a TXA₂ szintézis gátlásán keresztül, valamint vizsgáltuk a thrombocyta ERK és Akt foszforiláció változását az eltérő hiperkoleszterinemiás állapotokban.

4) Hogyan tudják a megakaryocyta-thrombocyta eredetű miRNS-ek a kóros vérlemezke aktivációt elősegíteni, míg a túlzott mértékű endothelsejt aktivációt mérsékelni szepszisben?

- Vizsgáltuk a különböző típusú LPS-ek thrombocyta aktiváló hatását *in vitro*, továbbá elvégeztük a szeptikus betegek *ex vivo* vérlemezkéiben a miRNS-profil analízisét összehasonlítva egészséges kontrollok mintáival, és egyben értékeltük az összefüggést a thrombocyta miR-26b expressziója és a betegség súlyossága, valamint a halálozási adatok között.
- Modelleztük a szeptikus csontvelői körülményeket LPS-sel és TNF- α -val kezelt megakaryocyta sejtenyészetekben, és RNS szekvenálással analizáltuk a génexpressziós változásokat, valamint detektáltuk a Dicer1 enzim expressziójának változását a szeptikus vérlemezékben és az LPS-stimulált megakaryocytákban.
- Vizsgáltuk a szepszises plazmamintákból izolált vérlemezke-eredetű mikropartikulák internalizációját az endothelsejt kultúrákba és egyben megfigyeltük, hogy az így bejutott thrombocyta miR-223 hogyan befolyásolta az endothelsejtek ICAM-1 expresszióját és a leukocyta adhéziót *in vitro*.

5) Vajon a gyógyszeres koronárisztent (DES) milyen mértékben okoz sejtaktivációt a fémsztenthez (BMS) viszonyítva, továbbá a felszabaduló everolimus milyen hatásmechanizmus révén képes csökkenteni az endothelsejt aktiváció mértékét?

- Összehasonlítottuk BMS, illetve DES koronária implantációban részesült stabil anginás betegekben a vérlemezke és endothelsejt aktiváció specifikus biomarkerek koncentrációját a párhuzamosan mért keringő miRNS-ekkel, továbbá ellenőriztük, hogy mely paraméterek szintje mutatott szoros összefüggést a 6 hónapon belül kialakult ISR-rel.
- A koronárisztentelés okozta gyulladós folyamatokat kétféle endothelsejtvonalon is modelleztük, valamint vizsgáltuk az E-selectin és a VCAM-1 receptorok expresszióját *in vitro* és értékeltük az everolimus gyulladáscsökkentő hatását az NF- κ B útvonal aktiváción keresztül.
- Vizsgáltuk a *SELE* és *VCAM1* gének expresszióját transzkripciós szinten az enhanszer RNS-ek expresszió változásán keresztül, továbbá meghatároztuk a poszttranszkripciós szabályozásáért felelős miR-181b szintjét endothelsejtekben everolimus jelenlétében és hiányában.

6) A szérum/plazma HE4 vajon alkalmas új diagnosztikai és követéses biomarker tisztás fibrózisban, és milyen intracelluláris folyamat hogyan segíti elő a fokozott HE4 expressziót a CF-es légúti epithelsejtekben?

- Kezelésben még nem részesült CF-es betegpopulációk szérummintáiban megmértük a HE4 koncentrációkat és összevetettük nem CF-es tüdőbetegek és egészséges kontrollok eredményeivel, valamint elemeztük a szérum HE4 korrelációját a tüdőbetegség súlyosságával (FEV₁ %), és egyéb befolyásoló tényezőkkel.
- Kezelés előtti és alatti plazma HE4 szintek mérésével nyomon követtük a CFTR-specifikus *ivacaftor* (Kalydeco®), illetve *lumacaftor/ivacaftor* (Orkambi®) kezelés alatt álló CF-es betegek klinikai állapotát a légzés- és vesefunkció figyelembevételével.
- Megvizsgáltuk a F508del-CFTR-t expresszáló CF-es bronchoepitheliális (CFBE) 41o⁻ sejtekben a HE4 expressziót a wt-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ kontroll sejtekhez képest, továbbá analizáltuk a CFTR-csatorna funkció direkt hatását a HE4 expresszióra, és egyben igazoltuk ebben a folyamatban az NF- κ B jelátviteli útvonal közvetítő szerepét.

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A disszertáció alapjául szolgáló 17 közlemény közül 3 összefoglaló („review”) cikk mellett a 14 eredeti tudományos közleményben számos metodikát alkalmaztunk az *ex vivo* klinikai mintamérések és az *in vitro* sejtkultúrák, valamint állatmodelles kísérletek elvégzése érdekében.

4.1 Betegek és kontrollok beválogatása

A különböző *ex vivo* klinikai vizsgálatokhoz a perifériás vérmintákat főként a Debreceni Egyetem klinikai egységeiből gyűjtöttük össze, de kollaborációs partnereink révén más hazai egyetemokről és kórházakból, valamint külföldi centrumokból is kaptunk mintákat. A DM2-s tanulmányban 28 DM2 és 19 azonos korú és nemű nem diabeteses obez beteg mintáiban vizsgáltuk a vérlemezke aktiváció mértékét és az ezt befolyásoló miRNS szinteket. Az obezitásban történt thrombocytá aktiváció vizsgálatba összesen 154 obez beteg mintáit dolgoztuk fel.

A szepszissel foglalkozó két tanulmányunkba összesen 34 szeptikus beteget válogattunk be. A mintavétel a betegek intenzív osztályra való bekerülésüktől, illetve a szepszis diagnózis felállításától számított 24 órán belül történt, hogy a kombinált gyulladáscsökkentő, antimikrobiális, antikoaguláns, esetenként thrombocytá funkciógátló kezelés még ne tudja érdemben befolyásolni a vizsgált thrombocytá funkciót, és ezen keresztül a vérmezke RNS expressziót. A klinikai SOFA-score („Sequential organ failure assessment”) pontértékét és a 28-napos mortalitási adatokat a kezelőorvosok dokumentálták.

A két eltérő koronárisztent-beültetés hatásának összehasonlításához ugyanolyan típusú BMS (n=28) (Integrity®) vagy everolimus gyógyszerrel bevont DES (n=21) (Xience®) sztentet kapott betegeket válogattunk be.

A három cisztás fibrózis klinikai tanulmányunk közül az elsőbe összesen hat magyarországi CF centrumból 77 gyermekkorú (18 év alatti) CF-es beteget, valamint független kohorszként egy prágai központból összesen 57 cseh felnőtt CF-es beteget válogattunk be. Az *ivacaftor* kezelés hatékonyságát a HE4-en keresztül 60 CF-es beteg mintáinak segítségével értékeltük. A *lumacaftor/ivacaftor* kezelték közül 68 fő mintáját dolgoztuk fel, akik a PROSPECT-tanulmányban szerepeltek. A betegek fagyasztott mintáit a Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics (CFFT) Biorepository biobankból kaptuk további vizsgálatra. Három magyar CF-es betegől és három nem-CF-es recidív bronchitistől szenvedő betegől hörgőnyálkahártya biopsziás mintavétel történt diagnosztikus bronchoscoopia során. Az utóbbi

kontroll csoportban a bronchoscopiára a ziháló epizódok hátterének tisztázása és a centrális légúti szűkület kizárása céljából került sor.

Az életkorban és nemben illesztett egészséges kontrollok mintáit a Debreceni Egyetem különböző intézeteinek önkéntes munkatársai biztosították. A DM2-s tanulmányba 23 kontrollt, az obezitással foglalkozó vizsgálatba 62 főt, a szepszises vizsgálatunk 34 személyt vontunk be. A CF-es betegek kontrolljaként egyrészt nem CF-es tüdőbetegeket vontunk be (n=94), másrészt 117 (enyhe fertőzésben szenvedő) klinikai kontrollt. Minden bevont beteg és kontroll személy írásbeli bejegyző nyilatkozatot töltött ki, hogy részt vesz az adott vizsgálatban.

4.2 Egérmodellek

A PKC $\theta^{-/-}$ és a C57Bl/6 WT egerek, valamint az LDLR $^{-/-}$ és az ahhoz tartozó C57Bl/6 WT egerek a The Jackson Laboratory-ból kerültek beszerzésre. Amíg a PKC $\theta^{-/-}$ és a C57Bl/6 WT egerek normál étrenden voltak felnevelve, addig az LDLR $^{-/-}$ és az ahhoz tartozó kontroll egereket 4 hetes koruk után 8 hétig különböző tápon tenyésztették: i) standard (alacsony zsírtartalmú) másnéven „chow” diétán (4,5% telített zsír, 0,02% koleszterin), vagy ii) „Western” diétán (21,2% telített zsír, 0,2% koleszterin, kolát-mentes), vagy iii) „Paigen” diétán (7,5% kakaóvaj, 15,8% telített zsír, 1,25% koleszterin, 0,5% Na-kolát). Az össz koleszterinszintjük 3 időpontban (6., 8. és 12. héten) lett meghatározva, hogy kövessük a diszlipidémia kialakulását és súlyosságát.

4.3 Mosott thrombocyták izolálása humán és egér vérmintákból

A humán és az egér mosott thrombocyta mintákat vérlemezke aggregációhoz készítettük elő centrifugálással. A humán vérmintákat ACD-t (1:6 arány), míg az altatásban lévő egerekből a teljes vérmintát a vena cava-n keresztül 3,8%-os Na-citrátot (1:10 arány) tartalmazó csövekbe vettük el.

4.4 Vérlemezke aggregáció és δ -granulum szekréció vizsgálat

Lumiaggregométeren az aggregáció mértékét a fénytranszmisszió mérésen keresztül, keveréses körülmények (900 rpm) között 37 °C-on állapítottuk meg, míg a δ -granulum szekréció mértékét a felszabadult ATP mennyiségének (nmoL/10⁸ thrombocyta) lumineszcenciás mérésével határoztuk meg Lumi-chrome reagenst használva.

4.5 Humán thrombocyta minták *in vitro* aktiválása különböző agonistákkal

A PRP mintákból készített LDP mintákat LPS-sel, LBP-vel és szolubilis CD14-gyel együtt, vagy PBS-sel (negatív kontroll) kezeltük 4 órán keresztül 37 °C-on. Pozitív kontrollként TNF- α -val (100 ng/mL) stimulált mintákat használtunk. Centrifugálás után a vérlemezke pellet-et TRI reagenssel lizáltuk. A mintákból RT-qPCR mérésel mRNS szinteket vizsgáltunk. *In vitro* stimuláltuk a thrombocytákat mikropartikula termelés indukálása céljából TRAP-pal 2 órán keresztül 37 °C-on. Centrifugálás után a vérlemezke pellet-et és a felülúszót TRI reagenssel lizáltuk és RT-qPCR mérésel miRNS szintet vizsgáltunk.

4.6 Trombózis *in vivo* vizsgálata egérmodellben

A PKC $\theta^{-/-}$ és WT egereket intraperitoneálisan beadott pentobarbitállal altattuk. A jobb oldali carotis kipreparálása után egy miniatur Doppler áramlási fejet helyeztünk az artéria felszínére és a véráramlást áramlásmérővel követtük. 10%-os FeCl₃ oldattal átitatott Whatman filterpapírt a carotis adventiciális felszínére helyeztük, majd 2 perc után a filter papírt eltávolítottuk, normál sóoldatot cseppentettünk a sérülés helyére, és 30 percig monitoroztuk az áramlást. A teljes érelzáródáshoz szükséges időt (TTO) a carotis sérülés elindításától a keletkezett vérrög okozta komplett okklúzióig (0 mL/min) eltelt idő alapján állapítottuk meg.

4.7 Immunprecipitáció

A mosott humán thrombocytákat az aktiválás és a PKC θ RACK vagy kontroll peptiddel való előkezelés után jéghideg 2x lízis pufferbe vettük fel. A lizált mintákat további 30 percig tartottuk jégen, hogy a lizálás komplettálódjon. A felülúszó leszívása után a Syntaxin-4 specifikus immunprecipitáló antitestet adtuk a mintához és inkubáltuk 1 óráig 4 °C-on. Ezt követően Protein A/G Sepharose gyöngyöket adtunk a mintához egy éjszakán át 4 °C-on. A gyöngyöket másnap mostuk lízis pufferben és a fehérjéket leoldottuk Na-dodecil-szulfát (SDS) mintapufferrel DTT jelenlétében. A mintákat 10 percig főztük és vittük tovább western blot analízisre, amelynek során foszforilált-(P-Thr)-Syntaxin-4 és össz Syntaxin-4 specifikus antitesteket alkalmaztunk.

4.8 Western blot

A humán és egér vérlemezke mintákban detektáltuk a különböző fehérjék (PKC θ , ERK, Akt) foszforiláltsági állapotát és össz mennyiségét. A mosott thrombocyta minták előkészítése után a fehérjéket 10%-os SDS–poliakrilamid gél-elektroforézissel elválasztottuk egymástól, majd polyviniliden-difluorid (PVDF) membránra blottoltuk. A nonspecifikus kötőhelyek lefedése

érdekében TBST-t használtunk 5%-os BSA mellett 60 percig szobahőmérsékleten, majd 4 °C-on inkubáltuk a membránt az elsődleges antitesttel. A mosási ciklusokat követően a membránt alkalikus foszfáttal jelölt másodlagos antitesttel, majd kemilumineszcens szubsztráttal inkubáltuk, és az immunreaktivitást detektáltuk. A szepszises vizsgálat sorozatban a humán thrombocytá Dicer1 és a P-selectin fehérje mennyiségi változását is western blot analízissel vizsgáltuk.

4.9 Vérlemezke-eredetű mikropartikulák izolálása

A PRP-ből centrifugálással PPP-t kaptunk, amiből a mikropartikulákat nagysebességű centrifugálási lépéssel nyertük ki. A két centrifugálás között a mikropartikula „pellet”-et PBS-sel mostuk. A mikropartikulák mennyiségét áramlási citometriával határoztuk meg. A mikropartikula számot az egységnyi idő alatt begyűjtött eseményszámból határoztuk meg az össz thrombocytá számra normalizálva.

4.10 Áramlási citometriai vizsgálatok

A felszíni P-selectin pozitivitást 1%-os PFA/PBS oldattal fixált teljes vérből határoztuk meg majd a vérlemezkek azonosítására FITC-el konjugált CD42a ellenes antitestet használtunk, míg a P-selectin detektálásához a sejteket PE-el konjugált CD62P specifikus antitesttel jelöltük. Kontrollként PE-el konjugált IgG₁ izotípus antitesttel jelölt mintát használtunk. A vérlemezke aktiváció mértékét a dupla pozitív sejtek kiértékelésével, 10.000 esemény begyűjtésével határoztuk meg. Az izolált mikropartikulákat Annexin V-FITC és CD41a-PeCy5 ellenes antitesttel jelöltük. Minden mintából 60 másodpercig gyűjtöttük, majd az FSC-SSC paraméterek alapján történt a kapuzásuk. A mosott egér thrombocytá mintákat az agonista hozzáadása után 15 percig aktiváltuk, majd a felszíni P-selectin receptorra specifikus antitesttel, valamint az aktivált α IIb β 3 receptor ellenes JON/A-PE antitesttel vizsgáltuk. A thrombocyták azonosítása az anti-CD61-PE antitesttel történt.

4.11 Fehérvérsejt-depletált thrombocyták előkészítése és minőségi ellenőrzése

A fehérvérsejtek eltávolításához CD45-ellenes antitesttel bevont mágneses gyöngyöket használtunk. A centrifugálás után nyert thrombocytá „pellet”-et TRI reagenssel lizáltuk, és a minták tisztaságának ellenőrzése áramlási citometriai és RT-qPCR mérésekkel történt.

4.12 Különböző sejtvonalak tenyésztése, differenciálódása és kezelése

A megakaryocita funkciók diabeteses és szeptikus körülmények között történő vizsgálata érdekében a humán megakaryoblastos leukémia sejtvonalat, a MEG-01 sejteket használtuk. A hiperglikémiás körülmények egy korábbi közlemény alapján kerültek kialakításra, amikor a kész médiumot kiegészítettük D-glükóz oldattal (33 mM) belekalkulálva a sejtek fenntartásához szükséges glükóz mennyiséget, és a sejteket 8 órától egészen 4 héten keresztül kezeltük. Negatív (ozmotikus) kontroll mintákban a sejteket D-mannitollal (33 mM) kezeltük. Egy másik kísérlet sorozatunkban a MEG-01 sejteket LPS-sel stimuláltuk LBP (100 ng/mL) és szolubilis CD14 (150 ng/mL) jelenlétében 4-24 órán keresztül a szeptikus milieu modellezése érdekében hasonló körülmények között. A kísérletben pozitív kontrollként a MEG-01 sejteket TNF- α -val (100 ng/mL) kezeltük, míg a negatív kontroll mintákban a sejtekhez PBS-t adtunk. A kezelési idő lejárta után a sejteket TRI reagensben lizáltuk és a miRNS és mRNS szintek meghatározása RT-qPCR módszerrel történt. Hiperglikémiás környezetben a Dicer1 funkciót indirekt módon, calpain inhibitor használva vizsgáltuk glükózzal kezelt és nem kezelt kontroll MEG-01 sejtekben, míg szeptikus milieu-ben a sejtmintákat LPS-sel, LPS-sel és calpeptinnel együtt, majd RT-qPCR módszerrel kvantáltuk a miR-223, illetve a miR-26b expresszióját RT-qPCR-rel. A MEG-01 sejtekkel párhuzamosan a humán krónikus myeloid leukémia eredetű K562 sejteket is tenyésztettük. Ezeket a sejteket első lépésben 7 nap alatt érett megakaryocytákká differenciáltattuk PMA-val (20 ng/mL).

A szepsziszes körülmények között vizsgált endothelsejt funkciók analízise érdekében humán koronária artériás endothelsejteket (HCAEC) tenyésztettünk és szeptikus betegek vagy kontroll személyek plazmájából izolált mikropartikulákkal inkubáltuk 24 óráig. Ezzel párhuzamosan normál vérelemezke mintákból indukált, majd izolált mikropartikulákkal is elvégeztük a HCAEC sejtek inkubációját TNF- α előkezelés után, hogy a szepsziszes körülményeket biztosítsuk. Kontroll mintának a sejteket 24 órán át csak TNF- α -val (100 ng/mL) kezeltük. A kezelés után a sejteket TRI reagensben lizáltuk és az endothelsejtek különböző mikropartikula mintákkal való interakciójának hatását a miR-223 és az ICAM1 mRNS szint meghatározásával igazoltuk RT-qPCR módszerrel.

A koronárisztent indukálta vaszkuláris gyulladáshoz való környezet modellezésére az HCAEC sejteket rekombináns TNF- α -val (100 ng/mL) kezeltük 1-24 órán keresztül. Az everolimust kibocsátó DES endothelsejt aktivációt mérséklő hatásának vizsgálatához az endothelsejtekhez everolimust (0,5 μ M) is adtunk. A sejteket egyszer mostuk steril HBSS oldattal, 750 μ L trizollal lizáltuk, majd RNS-t izoláltunk. Ezzel párhuzamosan HUVEC sejteket is fenntartottunk és ugyanolyan méréseket végeztünk, mint a HCAEC-vel.

A CF-es sejtes körülményeket biztosító F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 410^o sejtek, illetve a vad típusú CFTR-t (wt-CFTR) mutató sejteket 24 óráig kezeltük TNF- α -val vagy PBS-sel, valamint a CFTR modulátorok kombinációjával: *lumacaftor* (3 μ M) és *ivacaftor* (10 μ M) (LUM/IVA) vagy *tezacaftor* (5 μ M) és *ivacaftor* (10 μ M) (TEZ/IVA) együttes adásával. A CFTR-csatorna aktivitást FSK (10 μ M) és IBMX (100 μ M) kombinációjával fokoztuk mindkét sejtvonal esetén, míg a CFTR gátlás céljából CFTR_{inh172}-t (20 μ M) adtunk a wt-CFTR-t expresszáló CFBE sejtekhez. A kontroll mintákhoz DMSO-t adtunk. Az NF- κ B útvonal szerepének *in vitro* vizsgálata céljából BAY 11-7082-vel (5 μ M) vagy DMSO-val (kontroll) kezeltük a 24 órán keresztül TNF- α -val aktivált, vagy nem kezelt kontroll CFBE sejtekben, illetve a LUM/IVA vagy TEZ/IVA kezelés jelenlétében vagy hiányában.

4.13 ELISA mérések

Az egér thrombocytákból felszabaduló TXA₂ szintet, valamint a szérum/plazma mintákból és a sejtek felülcszójából az ICAM-1, a TNF- α , a szolubilis P-selectin, CD40L, E-selectin és PDGF-BB koncentrációkat ELISA kitek segítségével határoztuk meg a gyártó ajánlásai szerint.

4.14 RNS izolálás

Az RNS tisztításhoz előkészített vérelemezek és plazma mintákból a TRI reagens gyártói ajánlásainak megfelelően totál RNS-t izoláltunk. Az RNS minták tisztaságát és koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométerrel ellenőriztük. Az RNS-mintákat -80 °C-on tároltuk további analízis előtt.

4.15 TaqMan OpenArray

A thrombocyta, valamint a keringő miRNS profil meghatározásához véletlenszerűen kiválasztottunk az LDP, illetve a plazma mintákból izolált 3-3 RNS mintát csoportonként és 754-féle miRNS-t elemeztünk ezzel a technológiával a gyártó utasításait betartva. Az adatok normalizálásához az RNU-48-at (LDP), illetve miR-24-et (plazma) használtuk. A legnagyobb változást mutató miRNS-ek expresszióját UPL próba alapú RT-qPCR módszerrel validáltuk.

4.16 Intracelluláris és keringő miRNS expressziók analízise

A különböző sejt minták és plazma minták miRNS expresszió meghatározását miRNS specifikus RT-qPCR módszerrel végeztük. A reakciókban használt primereket a „miRNA Primer Designed Tool” (<http://genomics.dote.hu:8080/mirnadesigntool>) szoftverrel terveztük.

4.17 miRNS mimic és inhibitor transzfektálás sejtkultúrákba

A miR-26b, miR-140 és a SELP mRNS közötti direkt kapcsolatot miRNS mimic-ek használatával igazoltuk MEG-01 sejtekben diabeteses, illetve szeptikus *in vitro* körülmények között. A MEG-01 sejteket ezért vagy magas glükóz tartalmú RPMI médiumban 24 órán keresztül előkezeltük, vagy LPS-sel (100 ng/mL), illetve TNF- α -val (100 ng/mL) kezeltük 4 órán át 37 °C-on. A transzfekcióhoz szükséges optimális körülmények megteremtéséhez OPTI-MEM médiumot használtunk, és a sejtekhez miRVana miR-26b és miR-140 mimic-eket (20 pmol) Lipofectamine RNAiMAX transzfekciós reagens segítségével juttattuk be a sejtekbe 24 óráig. Ezzel párhuzamosan negatív kontrollként a sejteket NEG-01 mimic-el (20 pmol) transzfektáltuk a fenti körülmények között. A miR-181b és SELE, valamint a VCAM1 mRNS-ek közötti kapcsolatot szintén miRNS mimic használatával erősítettük meg. A HCAEC sejteket 1 órán át TNF- α -val (100 ng/mL) kezeltük.

Az anti-miR-26b és az anti-miR-140 inhibitorokat (40 pmol) a glükózzal nem kezelt sejtekbe transzfektáltuk a Lipofectamine reagenssel. A kezelési idők lejárta után RNS-t izoláltunk és a fentebb ismertetett módon mértük a miRNS és mRNS szinteket.

4.18 mRNS, pre-miRNS és enhanszer RNS expressziók mérése RT-qPCR-rel

Az mRNS-ek és a pre-miRNS-ek analízisét is kétlépéses reakcióban végeztük el: cDNS szintézis után az RNS-ek mennyiségét SYBR Green I Master mix és az mRNS-ekre, valamint a pre-miRNS-ekre specifikus primer párok felhasználásával határoztuk meg qPCR készülékkel. Az összes mérést triplikátumban végeztük. Referenciagénként az *RPLP0* (*36B4*) gént használtuk. A vizsgált gének expressziós szintet az alábbi formulával határoztuk meg: $\Delta Cq = Cq^{ref} - Cq^{gén}$.

4.19 RNS szekvenálás

Az LPS-sel kezelt MEG-01 sejtek globális transzkripció adatainak meghatározásához RNS szekvenálást végeztünk az Illumina Sequencing Platformon. A mintákból össz RNS-t izoláltunk és az RNS minta minőségét ellenőriztük az Eukaryotic Total RNS Nano Kit alkalmazásával a gyártó ajánlása szerint. Ezt követően az RNS mintákból (200 ng) könyvtárakat készítettünk. Az egyszálú cDNS minták „random priming” reverz transzkripcióval készültek. A 75 ciklusból álló szekvenálást Illumina NextSeq500 készüléken végeztük el.

4.20 siRNS transzfektálás sejt kultúrákba

A Dicer1 fehérje expresszió „csendesítését” kétféle okból is elvégeztük két különböző sejt vonal bevonásával. Ennek kivitelezése érdekében a MEG-01, illetve a HCAEC sejtekbe specifikus Dicer1 ellenes siRNS-t (40–80 pmoL) és negatív kontrollként NEG-01 siRNS-t transzfektáltunk Lipofectamine RNAiMAX transzfekciós reagenssel és inkubáltuk vele 24-48 órán keresztül. A transzfekció hatékonyságát a Dicer1 siRNS szint mérésén keresztül TaqMan siRNA assay-vel ellenőriztük. A transzfekciót követően a MEG-01 sejt kísérletben a miR-26b, a Dicer1 működésétől független miR-451, valamint a DICER1 és SELP mRNS-ek expresszióját, továbbá a HCAEC-mikropartikula interakciót követően a miR-223, a pre-miR-223 és a DICER1 mRNS expressziót kvantáltuk RT-qPCR módszerrel.

4.21 Humán minták Thr715Pro P-selectin genotípus analízise

A DNS-t antikoagulált humán teljes vérmintából izoláltuk és restrikciós fragmens hosszúság polimorfizmus (RFLP) vizsgálattal analizáltuk. A kész PCR terméket ezután Eco91I enzimmel megemésztettük és a keletkezett termékek 3%-os agaróz gélen kerültek megfuttatásra és UV fény mellett került vizualizálásra ethidium-bromidos jelöléssel.

4.22 Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok

Az NF- κ B-út vonal aktivációját több különböző sejt vonalban is értékeltük a p65 transzkripciós faktor magtranszlokációján keresztül fluoreszcens mikroszkóppal: LPS-sel kezelt MEG-01 sejtekben, és TNF- α -val, valamint különböző CFTR modulátorral kezelt CFBE 41o⁺ sejtekben. A HCAEC sejteket szepszises betegek plazma mintáiból izolált mikropartikulákkal, illetve szeparált perifériás mononukleáris sejtekkel (PBMC) inkubáltuk együtt, hogy igazoljuk a thrombocytá eredetű mikropartikulák internalizációját az endothelsejtekbe, illetve a fehérvérsejtek adhézióját szepsziskor. Az LPS-sel és TNF- α -val kezelt MEG-01 sejt citoplazmájában a Dicer1 fehérjeszintjét detektáltuk.

4.23 Patch-clamp technika

A CFBE 41o⁺ sejt membránjában a kloridáramot ún. „egész sejt” patch-clamp módszerrel analizáltuk különböző CFTR modulátorok jelenlétében CFTR aktivátor FSK/IBMX, illetve CFTR-csatorna blokkoló CFTR_{inh172} mellett.

4.24 Rutin körülmények között meghatározott laboratóriumi paraméterek

Számos hematológiai, kémiai, immunkémiai és hemosztázis paraméter került meghatározásra a különböző klinikai állapotok kimutatására, valamint azok súlyosságának értékelésére.

4.25 Statisztikai számítások

Részletesen kiértékeljük a különböző klinikai és *in vitro* vizsgálatok során nyert adatokat. Több paraméter esetén számoltunk szenzitivitást, specificitást, ROC-görbe analízissel vizsgáltuk a prognosztikai értéket. Többszörös regressziós analízist végeztünk egy-egy biomarker és az egyéb függő változók összefüggéseinek vizsgálatára. A statisztikai számítások a GraphPad® Prism szoftverrel készültek.

4.26 Etikai engedélyek

A vizsgálatsorozatokat a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága (engedély számok: 3510-2011., 3777-2012., 4102-2014., 4780-2017., 4813-2017.), valamint a Temple Egyetem (Philadelphia, PA, USA), a Motol Egyetemi Kórház, Károly Egyetem (Prága, Csehország) és a nemzetközi kollaborátor CF-es központok helyi etikai bizottságai hagyták jóvá. A klinikai vizsgálatok a Helsinkii Egyezményben megfogalmazott elvárásoknak megfelelően történtek.

4.27 Finanszírozás, pályázatok

- Bólyai János Kutatási Ösztöndíj (MTA, BO/00522/11.) (2011-2014.)
- "Konvergencia - Magyary Zoltán Posztdoktori Ösztöndíj (2013-2014.)
- Szodoray Lajos Ösztöndíj (DE, ÁOK) (2014-2017.)
- Új Nemzeti Kiválósági Program Felsőoktatási Ösztöndíj (EMMI) (2017-2018.)
- GINOP-2.3.2-15-2016-00043 pályázat (Szív- és érkeutatósi kiválóságközpont, IRONHEART) Alprojekt vezető: Dr. Kappelmayer János (2017-2021.)
- Tudományfinanszírozási támogatások (DE, ÁOK) (2017-2023.) Témavezető: Dr. Nagy Béla
- OTKA „Bridging Fund” (DE, ÁOK) (2018-2020.) Témavezető: Dr. Nagy Béla
- OTKA-pályázat (FK-135327): Új szerepkörben a humán epididymis protein 4: a cisztás fibrózis új prognosztikai biomarkere és patofiziológiai mediátora (2020-2024.) Témavezető: Dr. Nagy Béla
- MEC_N 141438: Trombózis és vérzés: sok ezeréves kórképek XXI. századi csomagolásban (2022-2023.) Témavezető: Dr. Kappelmayer János

5 EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

5.1 A PKC θ részvétele a thrombocyta aktiváció szabályozásában

A PKC izoenzimek vérlemezkékben történt kimutatása után intenzíven kezdték el vizsgálni azok funkcionális szerepét. Bár a különböző izoenzimek nagy szerkezeti homológiát mutatnak, mégis hamar kiderült, hogy a PKC-k eltérő módon aktiválódnak és fejtik ki hatásukat a vérlemezke aktiváció különféle folyamataiban. A „novel” izoenzimek közé tartozó PKC θ az egyik legnagyobb mértékben expresszálódó thrombocyta PKC, aminek a thrombocyta funkcióban betöltött szerepe mára egyértelmű. Ugyanakkor a megakaryocytákban is jelen van, mégis a megakaryopoiesist és a vérlemezke termelődést érdemben nem befolyásolja. Vizsgálatainkat megelőzően még keveset tudtunk a thrombocyta PKC θ -ról, ezért többféle genetikai analízis alkalmazásával részleteiben vizsgáltuk a szerepét.

A PKC θ az intracellulárisan felszabaduló DAG hatására tud aktiválódni, ami mind a PAR, mind a GPVI receptor mediált útvonal mentén aktiválódott PLC enzim működése által termelődik. Az aktivált PKC θ foszforilációja a Thr538 pozícióban - TXA₂ felszabadulása nélkül is - bekövetkezik, viszont a gyengébb agonista ADP nem képes aktiválni hasonlóan a PKC δ -hoz. Korábban a PKC θ tirozin foszforilációját (Tyr90) is igazolták „outside-in” szignalizációban és GPVI receptor agonista hatására. Kísérleteinkben a kétféle PAR-receptor agonista (SFLLRN, AYPGKF) kezelés után időben kissé eltérő treonin foszforilációs mintázat volt látható, ami a különböző kinetikájú receptor-mediált thrombocyta aktivációnak köszönhető: a PAR1 útvonal egy gyorsabb, de csak átmeneti intracelluláris változásokat képes indukálni, addig a PAR4-hez kapcsolt szignalizáció tartósabb folyamatokat vált ki. A PKC θ stimulációjához a PAR-receptorok G_q kötött útvonala szükséges, míg a szintén ide tartozó G_{12/13} fehérje nem képes a PKC θ aktivációt kiváltani.

Ezt követően részletesen megvizsgáltuk a PAR és a GPVI receptor agonisták által indukált vérlemezke aggregációt, az α IIb β 3 integrin aktivációt és az α - illetve δ -granulum szekréciót. Mind a PKC θ antagonistá RACK peptiddel kezelt humán vérlemezkék, mind a PKC θ deficiens egér thrombocyták jóval kisebb aggregációt és szekréciót mutattak mindkét aktiváció után. Hasonlóan csökkent thrombin-indukált aggregációt és P-selectin expressziót tapasztaltak a PKC θ ^{-/-} egerek mintáiban a WT állatokhoz képest, addig egy másik kutatócsoport a PKC θ hiányában az általunk jóval alacsonyabb koncentrációban használt kollagén hatására fokozott GPVI-függő α -granulum szekréciót és α IIb β 3 integrin aktivációt talált. A másik sokat vizsgált „novel” izoenzim, a PKC δ szintén fokozza a PAR-mediált funkciókat, viszont a GPVI

útvonal mentén egyértelműen gátolja azokat, aminek köszönhetően a PKC δ hiányos egerek a FeCl₃ indukálta *in vivo* trombózismodellben nem mutattak különbséget a normál egerekhez viszonyítva. A klasszikus PKC-k közé tartozó PKC α fokozza az α - és δ -granulum szekréciót, míg a PKC β az „outside-in” szignalizációban vesz aktívan részt.

A PKC θ szekrécióban betöltött direkt szerepének további vizsgálata érdekében értékeltük a Syntaxin-4 foszforilációra kifejtett hatását. Ez a fehérje a granulumok membránjában elhelyezkedő SNARE-komplexhez kötődik nem aktivált thrombocytákban, és amint a vérlemezkét stimuláció éri, a Syntaxin-4 aktiválódik és egyben foszforilálódik, leválik a SNARE-komplexről, így elősegítve a szekréció folyamatának lezajlását. Azt tapasztaltuk, hogy humán thrombocytákban a PKC θ specifikus RACK peptiddel való kezelés jelentősen csökkentette a Syntaxin-4 foszforilációt a PAR és a GPVI receptorokon keresztüli aktiváció után egyaránt, ami alátámasztja a PKC θ és a Syntaxin-4 foszforilálódása közötti funkcionális kapcsolatot és egyben az izoenzim pozitív regulációs hatását. A PKC-k szerepét ebben a folyamatban egyébként már korábban is felvetették, amikor egy „általános” PKC inhibitor jelentősen lecsökkentette a Syntaxin-4 foszforilációt és vele együtt a szekréciót is.

Az α IIB β 3 integrin aktivációja is egy fontos celluláris változás a thrombocyta aktiváció során, ami egyrészt képes aktiválni a PKC θ -t, másrészt „visszafelé” a PKC befolyásolja a receptor további aktiválódását az egérvérlemezkék felszínén tapasztalt JON/A kötődés eltérések alapján. Hasonlóan, kóros α IIB β 3 integrin aktivációt közöltek a *CBFA2* génmutációval összefüggésbe hozott csökkent PKC θ aktivitás mellett humán vérlemezkékben. Mindezen eredmények összhangban vannak olyan korábbi adatokkal is, amelyek szerint a Ca²⁺ indukált CalDAG-GEFI mellett a DAG aktivált PKC izoenzimeknek párhuzamos, és egyben szinergista hatása van a PAR-indukálta α IIB β 3 integrin aktivációban. A teljes vérlemezke aktiváció megvalósulásában tevékenyen részt vevő TXA₂ termelődésére a PKC θ szintén kihat, mivel jelentősen csökkentek a GPVI és PAR agonisták által indukált TXA₂ szintek a PKC θ deficiens egerekben és egyben a cPLA₂ enzim aktivációját befolyásoló ERK foszforiláció is kisebb volt szemben a WT állatokkal. A többi „novel” PKC izoenzim vérlemezke aktivációval kapcsolatos szerepéről jelenleg még kevés adat áll rendelkezésre: a PKC ϵ ^{-/-} egerekben csökkent aggregációt és szekréciót írtak le GPVI receptor függő stimuláció után, míg az ADP-indukálta szekréció, Ca²⁺ beáramlás és TXA₂ szintézis fokozódott, ami rövidebb vérzési időt okozott. Ezzel szemben a PKC η izoenzim elősegíti az ADP által kiváltott TXA₂ felszabadulást.

Végül *in vivo* körülmények között is megvizsgáltuk a PKC θ globális funkcióját a thrombus képződés tekintetében, amikor a PKC θ deficiens és a WT egerekben FeCl₃ kezeléssel carotis sérülést váltottunk ki, ezzel provokálva a vérlemezkék és endothelsejtek aktiválódását

és az *in vivo* vérrögződést. A PKC θ deficiens egerekben jelentősen csökkent a stabil thrombus kialakulásának a lehetősége. Ezek az eredmények jól összevágznak a vérlemezke aggregációs és szekréciónak *in vitro* eredményeinkkel, illetve a mások által a PKC θ deficiens egerekben mért megnyúlt vérzési idővel, továbbá a PKC θ -ra és a PKC ϵ -ra együttesen deficiens egerekben jelentős vérvesztést tapasztaltak a WT egerekhez képest, amit a két „novel” PKC izoenzim additív hatásával magyaráztak. Mindezen adatok alapján a PKC θ izoenzim egy fontos mediátora a thrombocytáknak, és egyben aktívan részt vesz a vérrög stabilizálásában.

5.2 A P2Y₁₂ és a P-selectin receptor expresszió miR-223, illetve miR-26b által történő modulálása diabetikus vérlemezkékben

A DM2-ben gyakran kialakuló és akár hosszán fennálló hiperglikémiás állapot miatt nemcsak a keringésben funkcionáló sejtek működése változhat meg jelentősen, de a csontvelőben a megakaryocytáké is. Ugyanakkor kevés információ áll rendelkezésre a humán megakaryocytáknak és vérlemezkeknak miRNS-ek szintjének és funkciójának változásáról a metabolikus betegségekben. Korábban nem vizsgálták a P2Y₁₂ és a P-selectin receptorok szabályozásában részt vevő vérlemezke miRNS-ek expresszióját DM2-ben. Ezért diabetikus betegek vérlemezke és plazma mintáiban kvantáltuk a miR-223, miR-26b, miR-140 és miR-126 expressziót, valamint két fontos célgénjüket (*P2RY12*, *SELP*) mRNA szintjét. A hiperglikémia hatását megakaryocytáknak sejtkultúrákban *in vitro* is modelleztük, illetve külön analizáltuk a miR-26b és a miR-140 direkt funkcionális kapcsolatát is a *SELP* mRNA-val.

A vizsgálatainkban korábban és nembem illesztett egészséges kontroll személyek mellett nem diabetikus, de obez egyéneket is bevontunk, hogy kizárjuk a miRNS szinteket potenciálisan befolyásoló demográfiai paramétereket (pl. kor, nem, BMI). A thrombocytáknak funkció gátló gyógyszerek alkalmazásában sem volt különbség a vizsgálati csoportok között, ami szintén kihatott volna a miRNS szintekre. A mintavétel idején bár nem alakult ki egy betegben sem akut trombotikus esemény, mégis áramlási citométerrel kb. 3,5-szer nagyobb felszíni P-selectin százalékos pozitivitást mértünk DM2-ben az egészséges csoporthoz képest, ahogy azt munkacsoportunk már előzetesen is tapasztalta. Kiemelendő, hogy már obezekben is kb. 2x-es volt ez a P-selectin % különbsége, tehát már prediabetikus állapotban is elkezd nőni a vérlemezke aktiváció mértéke, aminek köszönhetően emelkedett szolubilis P-selectin szintek megmutatkoztak obez személyekben az egészségesekhez viszonyítva. A diabetikus vizsgálatunkban emellett jelentősen magasabb P-selectin fehérjekoncentrációt mértünk nemcsak a plazma mintákban, de a lizált DM2 vérlemezkek intracelluláris kompartmentjében is ELISA-

val az egészséges kontrollokhöz hasonlítva, ami arra utalhat, hogy a P-selectin receptornak nemcsak egy fokozott, gyors szekréciónja következik be ilyenkor, hanem több fehérje is termelődhet a tartósan fennálló metabolikus stimulusok hatására. Hasonlóan emelkedett P2Y12 és GPIIIa receptor fehérjekoncentrációkat közöltek nemrégiben akut koronária szindrómában szenvedő betegek thrombocytá lizátumában.

A fenti eredmények alapján célunk volt a DM2-hoz társult vérlemezke aktiváció finomszabályozásában szerepet játszó néhány miRNS analízise. Figyelembe véve a miR-223 direkt hatását a P2RY12 receptor expresszióra, megvizsgáltuk ennek a miRNS-nek az expresszióját a diabeteses vérlemezékben, ahol a miR-223 szintje a normál értékhez képest jelentősen alacsonyabb volt, amihez a P2RY12 mRNS emelkedett szintjét mértük. Ez megteremti a P2Y12 receptor nagyobb sejtfelszíni kifejeződésének a lehetőségét. Munkacsoportunkkal párhuzamosan mások is igazolták ezt úgy, hogy western blottal 4x nagyobb P2Y12 fehérjeszinteket mértek DM2 vérlemezke mintákban, ami jól korrelált a fokozott ADP-indukált vérlemezke aggregációval. Ráadásul ezek a receptorok tartósan aktív konformáció állapotba is voltak, ami tovább rontotta a P2Y12 specifikus inhibitorok hatékonyságát a trombózis megelőzésében a diabeteses patkányokban. Összességében elmondható, hogy a DM2-ben lecsökkent miR-223 expresszió a *P2RY12* magasabb expresszióján keresztül befolyásolja a vérlemezke aktivációt. A miR-223 depletált egerekben tapasztalt fokozott vérlemezke aggregáció, fokozott vérrögképződés és elhúzódó alvadékretrakció is ezt támasztja alá. A DM2 betegekhez használt másik kontroll csoportban az obezek nem várt módon az egészséges értékekhez képest is jóval magasabb miR-223-t és miR-26b-t mutattak, ami feltehetően egy kompenzációs mechanizmusnak lehet a része, de ennek igazolására további vizsgálatok szükségesek.

Az adatbázisok és predikciós programok alapján erős komplementaritás áll fenn a miR-26b és miR-140, valamint a SELP mRNS szekvenciája között, ezért elsőként analizáltuk ezek funkcionális kapcsolatát a thrombocytá működésben. A korábbiakban mindössze a miR-26b és az IL-6 expresszió kapcsolatát írták be, illetve vizsgálataink óta - eredményeinket alátámasztva - igazolták a miR-26a/b *SELP* expresszióra kifejtett hatását luciferáz reporter assay-vel is. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a vérlemezék miR-26b és miR-140 expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt DM2-ben az egészséges és az obez személyekhez viszonyítva. Ezzel ellentétben a SELP mRNS szintje jelentősen magasabb volt DM2-ben az egészséges kontrollokhöz képest. A miR-26b, a miR-140 és a SELP mRNS közötti direkt kapcsolatot miRNS mimic-ek és inhibitor-ok transzfektálásával MEG-01 sejtekben igazoltuk. A miRNS szintek „mesterséges” megváltoztatása után a SELP mRNS mennyisége jelentős mértékben

csökkent mindkét miRNS mimic hatására, míg ii) az anti-miR-26b és az anti-miR-140 a SELP mRNS szint szignifikáns emelkedéséhez vezetett. A miR-26b thrombocyta funkcióra és vérrögképződésre kifejtett globális hatását nemrégiben egy ApoE^{-/-}miR-26b^{-/-}egérmodellben vizsgálták. Ez az egérfenotípus fokozott vérlemezke adhéziót és aggregációt mutatott, ami indukálódott SRC és EGFR szignalizációs útvonalhoz társult. Ezen adatok alátámasztják a csökkent thrombocyta miR-26b-nek a kóros vérlemezke funkcióban betöltött szerepét DM2-ben. Bár a miR-26b deficiens egerek thrombocyta P-selectin felszíni pozitivitása nem volt magasabb a WT egerekhez képest, ugyanakkor a receptor RNS, illetve fehérjeszintű vizsgálatát nem végezték el. Megjegyzendő, hogy a vérlemezkekben megtalálható több száz miRNS közül más miRNS-ek vagy hosszú nem kódoló RNS-ek is részt vehetnek a P-selectin expresszió szabályozásában, ami további vizsgálatokat tesz szükségessé.

A thrombocyták csökkent miRNS tartalma arra is visszavezethető, hogy diabetesben már a megakaryocytákban kevesebb érett miRNS szintetizálódik. Ezt modelleztük magas glükózkoncentrációt fenntartva a médiumban kétféle megakaryocyta sejtvonalban (MEG-01, K562-MK), hogy az érett miRNS expressziót vizsgáljuk rövid (8-24 óra) és hosszú távú (1-4 hét) kezelést követően. A hiperglikémia hatására csökkenő tendenciát láttunk a miRNS expressziókban mindkét sejtvonalban már 24 óra után, és az 1-4 hetes kezelés végére ez a csökkenés még markánsabbá vált. A mannitol (ozmotikus kontroll) kezelés - hasonlóan mások kontroll kísérleteihez - nem befolyásolta a miRNS expressziókat. A glükózzal *in vitro* kezelt MEG-01 sejtekben a csökkent miRNS szintek - a vérlemezkekhez hasonlóan - emelkedett P2RY12 és SELP mRNS szintekkel jártak együtt 24 óra elteltével. Eredményeink összhangban vannak egy régi hipotézissel, miszerint a megakaryocyták hiperglikémiás környezetben kóros vérlemezkéket termelnek, amelyek a megnövekedett expressziójú glikoprotein receptorok által könnyebben aktiválódnak a keringésben. Mások vizsgálták MEG-01 sejtekben *in vitro*, illetve diabeteses patkányokból izolált megakaryocytákban is *in vivo*, hogy a P2Y12 expresszió fehérjeszinten valóban fokozódik, amiben a magas glükózkoncentráció által indukált NF-κB útvonalnak van jelentősége.

A diabetesben tapasztalt lecsökkent thrombocyta miRNS expressziók egyik okaként - a hiperglikémiás megakaryocytákban mért emelkedett pre-miRNS expressziók ellenére - alacsonyabb vérlemezke pre-miRNS szintek állnak, ami összeségében kevesebb pre-miRNS átjutását jelenheti a képződő vérlemezkekbe. A másik fő ok a csökkent megakaryocyta/thrombocyta Dicer1 enzim funkció. Saját kísérleteinkben a hiperglikémiás megakaryocytákhoz adott calpeptin korigálta a glükóz által lecsökkentett Dicer1 szintet, ami megemelte a thrombocyta miR-223 és miR-26b expressziót. A calpain inhibitor tehát jótékony

farmakológiai hatást mutat a diabetesben megváltozott miRNS szintek korrigálására és az ezzel összefüggésben kialakult fokozott vérlemezke aktivációra. A calpain inhibitorok vérlemezke funkciót gátló hatását a citoskeletális „remodelling”-en keresztül egyébként már jóval korábban - még a thrombocytá miRNS-ek azonosítása előtt - felismerték, amikor a calpastat hatékonyan blokkolta a thrombocytá aggregációt, szekréción és a kitapadást a PAR-aktiválta vérlemezkekben *in vitro*. Összeségében a megváltozott megakaryocytá RNS szintek megalapozzák az eltérő vérlemezke RNS tartalmát és azon keresztül a kóros aktivációs állapot kialakulását DM2-ben.

A plazma miRNS-eket potenciális biomarkerként is vizsgáltuk a DM2 kohorszban a reaktív vérlemezkek jelenlétének indirekt igazolására. A miR-223, miR-126, miR-26b és miR-140 szintje a plazma mintákban is jelentősen alacsonyabb volt az egészséges kontrollokhoz képest, amely összhangban van korábban megfigyelt eredményekkel DM2-ben. Ezzel ellentétben nem találtunk szignifikáns különbséget sem a vérlemezke, sem a plazma mintákban a miR-107 expressziójában, ami arra utalhat, hogy a hiperglikémia nem egységesen befolyásolja az egyes miRNS-ek szintjét. A fenti eredményeink alapján a vizsgált keringő miRNS-ek hatékonyan jelzik a fokozott thrombocytá aktiváció jelenlétét DM2-ben, amelyek közül a miR-140 szint már obezekben is szignifikánsan alacsonyabb volt az egészségesekhez képest, míg a miR-126 a (nem diabeteses) obezek és a DM2-s csoport között is jelentős különbséget mutatott. Az irodalomban csökkent keringő miR-223, miR-126, miR-24, miR-197, miR-191 és miR-21 szinteket mérték DM2-ben, amik a gyulladás és az atherosclerosis súlyosságával jól korreláltak.

5.3 Emelkedő thrombocytá aktiváció obezításban és a P2Y12 receptor által indukált útvonal hozzájárulása hiperkoleszterinémiában

Nemcsak DM2-ben, de azt megelőzően már obezításban is fokozatosan el kezd emelkedni a vérlemezkek aktiváltsági állapota a hipertónia, inzulin rezisztencia és diszlipidémia jelenlétében. Aktivált vérmezkékkal ugyanis nemcsak a már előrehaladott atherosclerosisos folyamatok járnak együtt, de maga az érlemeszesedés iniciálásához is szükséges kóros thrombocytá funkció, amit egérmodellben igazoltak. Bár a diabetesre jellemző thrombocytá reaktivitásról számtalan közlemény jelent meg, a „diabetes előszobájának” tekinthető obezításban a koagulációs abnormalitásokról, a vérlemezke aktivációs markerek szintjének változásáról, illetve az ebben részt vevő vérlemezke intracelluláris folyamatokról viszont még kevés információ áll rendelkezésre.

Ezért egyrészt egy klinikai vizsgálat keretén belül egy nagy obez betegcsoportban analizáltuk a különböző thrombocyta aktivációs markerek expressziójának alakulását, figyelembe véve a korai rizikófaktorok meglétét. Másrészt a P2Y12 receptor függő thrombocyta aktiválódást tanulmányoztuk egy hiperkoleszterinémias LDLR-deficiens állatmodell segítségével. A DM2-s betegekhez hasonlóan már obezitásban is egyértelműen kimutatható a thrombocyta aktivitás növekedése, ami szoros összefüggést mutat több rutinszerűen mért markerrel, két klinikai indexszel (HOMA, PAI), továbbá a carotis intima-média vastagság (IMT) értékével. Az utóbbi paraméter egy fontos előre jelzője a későbbi vaszkuláris történéseknek és elősegíti az atherosclerosis propagálását. A dohányzás szintén nagy mértékben befolyásolta a vaszkuláris és a thrombocyta aktivációs eredményeket, mert jóval nagyobb IMT értékek mellett jelentősen magasabb felszíni CD62 pozitivitás mérhető. Ezek az eredmények jól összevethetők mások korábbi vizsgálataival, ahol az össz koleszterin koncentráció jól korrelált a szolubilis P-selectin és a D-dimer szinttel, míg a P-selectin pozitív vérlemezkék százalékos aránya erős korrelációt mutatott a carotis IMT-vel és az artéria merevségi indexszel, továbbá szignifikáns pozitív összefüggést mutatott az életkorral, a BMI-vel, a vérnyomás szisztolés és diasztolés értékeivel, és a HbA1C-vel. A vérlemezke mikropartikulák tekintetében - az eredményeinkhez hasonlóan - jóval magasabb értékeket mértek obezekben, mint az egészséges kontrollokban, viszont a mennyiségük végül nem mutatott jelentős összefüggést az inzulin rezisztencia különböző paramétereivel. Ugyanakkor ischémiás stroke-ot követően a fokozott mértékben termelődött thrombocyta mikropartikulák mennyisége nagyon jól korrelált az IMT eredményével. Végül megvizsgáltuk a magas szolubilis P-selectin értékek ismeretében a P-selectin Thr715Pro polimorfizmusnak hatását az obez betegekben és a kontroll személyekben, mivel a Pro715-t többen „protektív” genotípusnak véleményezték csökkentve a plazma P-selectin szintet a kardiovaszkuláris betegekben, sőt, az akut koronária szindróma kialakulásának rizikóját is mérsékelte. Hasonlóan egy korábbi DM2-s vizsgáltunkhoz, illetve egy másik kutatócsoport stroke-ban végzett tanulmányához, obezitásban sem találtunk ennek a polimorfizmusnak számottevő szolubilis P-selectint befolyásoló hatását.

A cukorbetegséghez társuló kóros thrombocyta funkció mellett a különböző súlyosságú lipidanyagcsere zavarban is jelentős vérlemezke aktiváció alakul ki, ami elősegíti az érlemezésedés asszociált atherotrombózis kialakulását. Ezért a thrombocyta funkciót gátló gyógyszerek, így a P2Y12 receptor inhibitorok jó eredményt mutattak a kardiovaszkuláris elhalálozás rizikójának csökkentésében AMI-ban, DM2-ben és hiperkoleszterinémiában. Régóta ismert tény, hogy a statinok a lipidszint csökkentése mellett egyéb kedvező hatással is

bírnak, úgy, mint gyulladáscsökkentő, antioxidáns és antitrombotikus (a thrombocytamembrán koleszterintartalmának csökkentésén keresztül) hatásokkal. Ezen korábbi előzmények alapján vizsgáltuk a P2Y12 receptor indukálta szignalizáció szerepét különböző súlyosságú diszlipidémiás egerekben, amit 8 hétig eltérő lipidösszetételű diétán tartott LDLR^{-/-} és WT egerekben tudtuk megtenni. Ezt az egérmódellet más csoportok is használták korábban a hiperkoleszterinémia okozta celluláris diszfunkciók analizására, bár több esetben hosszabb ideig (akár 6 hónapig) kezelték az egereket a lipid eltérések elérése érdekében. Az általunk alkalmazott 2 hónapos kezelés így is kb. 2-3x-os össz koleszterinszint emelkedést tudott kiváltani, ami megfelel az obezitáshoz kapcsolódó hiperkoleszterinémiának vagy szubklinikusi metabolikus szindrómának. Az LDLR^{-/-} egerekben mért kb. 10x össz koleszterinszint növekedés viszont a familiáris hiperkoleszterinémiára jellemző extrém növekedésnek felel meg. Bár egy ilyen mértékű diszlipidémia jelentős endothelsejt károsodást is okozhatott az egerekben, amely hozzájárult volna a fokozott *in vivo* atherotrombózishoz, mi itt célzottan mosott thrombocyták feldolgozásával csak a vérlemezke aktivációra fókuszáltunk.

Megvizsgáltuk az LDLR^{-/-} egerekben a 2MeSADP és AYPGKF agonistákkal indukált vérlemezke aggregációt, az α Ib β 3 integrin aktivációt, és az α -, illetve δ -granulum szekréciót a WT egerekhez hasonlítva, és az tapasztaltuk, hogy a növekvő koleszterinszintekkel egyre kórosabb vérlemezke aktiváció detektálható. Kiemelendő, hogy jelentősen indukálódott a vérlemezkek aggregációja, ami megfelelt mások által publikált eredményekkel, amely szerint a magas zsírtartalmú diétán tartott LDLR^{-/-} egerekben nagyobb és több vérrögöt találtak *in vivo* összehasonlítva a normál koleszterinszintet mutató kontroll egerekben. Ezzel párhuzamosan az ATP szekréció szignifikánsan nőtt, ami tovább triggerelte a thrombocytá reaktivitást a G_i szignalizáción keresztül. A P-selectin expresszió emelkedése szintén kimutatható volt a hiperkoleszterinémiás egerekben, hasonlóan az ilyen kórképben szenvedő betegekhez, ugyanakkor a Western diétán lévő WT állatoknál, illetve a standard („chow”) diétán tartott LDLR^{-/-} egereknél a saját kontroll mintákhoz képest nem volt szignifikáns különbség. Áramlási citometriával a JON/A antitest kötődésével követtük az α Ib β 3 integrin aktivációt, ami szintén fokozatosan nőtt a súlyosbodó diszlipidémiával társult kóros vérlemezke funkcióval. Ezek alapján a P2Y12 receptor mediált útvonal sokkal inkább az α Ib β 3 integrin aktivációját és a δ -granulum szekréciót befolyásolja ilyen metabolikus körülmények között és kevésbé fontos az α -granulum szekrécióban. A TXA₂ szintézis is jelentősen nőtt a különböző nagyságú koleszterinszint eltérést mutató egerekben szemben a normál lipidanyagcseréjű egerekkel, ami még jobban stimulálja a G_q-mediált thrombocytá aktivációs folyamatokat további szekréción keresztül. Ezekkel az indukált funkcionális változásokkal jól korrelált, hogy

a hiperkoleszterinemiás egerekben a G_i -hoz kötött útvonalon keresztül fokozott volt az ERK és az Akt fehérjék foszforilációja. Az előbbi a TXA_2 szintézis, az utóbbi fehérje az $\alpha IIb\beta 3$ receptor aktiváció regulációjában vesz részt. Korábban hasonló összefüggéseket találtak, amikor a P2Y12 receptor inhibitor (pl. clopidogrel) használatával jelentősen csökkent a PAR-indukált TXA_2 termelődés, amit a cPLA₂ aktivitással való interferenciával magyaráztak. Ugyanakkor az egérkísérleteinkben a vérlemezke aktiváció mértéke nem kizárólagosan a TXA_2 által növekedett, hiszen a TXA_2 termelődés blokkolása mellett is fokozódott a thrombocytá reaktivitás. A P2Y12 receptor gátlásakor általunk is tapasztalt jelentős aggregáció csökkenés alátámasztja ezen gyógyszerek jelentőségét a diszlipidemiában szenvedő betegek kezelésében. Állatkísérletes vizsgálatokban ezt mások is megfigyelték, amikor diszlipidemiás ApoE^{-/-} egerekben a clopidogrel kezelés jól gátolta az atheroma kialakulását. A sejtmembránban „lebegő” lipid tutajok és néhány thrombocytá szignalizációs folyamat, pl. maga a P2Y12 receptor mediált útvonal közötti szoros funkcionális kapcsolat szintén egy fontos promotáló körülmény obezításban, amit az is alátámaszt, hogy a membránkoleszterin depléció jelentősen csökkentette az ADP-indukált vérmezeke aggregációt, illetve a megnőtt zsírbevitel a sejtmembránok koleszterintartalmát is emeli több arachidonsav termelődését okozva. A legújabb állatkísérletes adatok alapján már az enyhe hiperlipidémia is együtt járhat fokozott kollagén-indukálta thrombus és fibrin képződéssel, amit normál diétán tartott LDLR^{-/-} és ApoE^{-/-} egerekben - minimálisan eltérő proteom, de jelentősen megváltozott lipidprofil jelenlétében - mutattak ki a WT egerekhez képest. Mindezen kísérletes adatok megerősítik azon eredeti hipotézisünket, hogy a P2Y12 receptoron keresztül lejátszódó kóros intracelluláris folyamatok hozzájárulnak a hiperkoleszterinemiára jellemző kóros thrombocytá reaktivitáshoz.

5.4 Megváltozott megakaryocytá-thrombocytá miR-26b és SELP expresszió fokozza a kóros vérlemezke funkciót, illetve a vérlemezke miR-223 csökkenti az ICAM-1 expressziót az aktiválódott endothelsejteken szeptikus körülmények között

A szervezet különféle ingerekre túlzott mértékben fejthet ki szisztémás válaszreakciót. Amennyiben ez fertőzés miatt alakul ki, szepszisnek nevezzük, aminek számos vaszkuláris, metabolikus és celluláris rendellenesség, sőt esetenként extrém mennyiségű citokin termelődés és felszabadulás (ún. citokin-vihar) lehet a következménye. A szepszises folyamatok által indukált endothelsejt aktiváció és károsodás vaszkuláris gyulladással és fokozott permeabilitással, míg a thrombocyták túlzott aktiválódása hemosztázis zavarral és trombotikus komplikációkkal járhat együtt. Az aktivált vérlemezkek nemcsak a trombusképződés

elősegítésében játszanak fontos szerepet, hanem mikrovezikulák és számos bioaktív anyag (pl. ADP, TXA₂, citokinek, kemokinek stb.) szekretálásával közvetlenül befolyásolják a szív- és érrendszer sejtjeinek funkcióit. Ezen felül, bár a thrombocyták sejtmaggal nem rendelkeznek, a megakaryocytá-eredetű RNS-ek nagy készletét hordozzák magukban és juttatják el más sejtekhez bizonyos stimulusok hatására.

A gyulladásszerű folyamatok indukálásában kulcsszerepet játszó TLR-ek közül a TLR4 receptor is megtalálható mind a thrombocytákon, mind a megakaryocyták felszínén, aminek az egyik legfontosabb ligandja az LPS. Ennek köszönhetően számos korábbi *in vitro* vizsgálat tanulmányozta a vérlemezkék aktiválhatóságát *E. coli* eredetű LPS hatására egy meglehetősen széles agonista koncentrációtartományon belül és változatos kísérleti körülmények között. Talán emiatt is, de eltérő eredményeket közöltek ezen a téren, és még az sem volt bizonyos, hogy az LPS képes-e direktben, vagy csak leukocytá-dependens módon befolyásolni a thrombocytá aktivációt annak ellenére, hogy a bakteriális hatások szempontjából a legfontosabb TLR a vérlemezkéken a TLR4 receptor. A klinikai szempontból releváns Gram-negatív baktériumok (pl. *E. coli*) változatos felépítésű LPS molekulákat termelnek, amelyek változó számú poliszacharid egységekből épülnek fel. Az ún. S-LPS („smooth LPS”) lipid A-ból, core-oligoszacharidból és O-poliszacharidból áll, míg az Re-LPS-ből („rough LPS”) hiányoznak az O-poliszacharid láncok. Az *E. coli* eredetű S-LPS-sel korábban ellentmondásos eredményeket találtak a vérlemezke aktivációra vonatkozóan. Ezzel szemben a *S. minnesota* eredetű Re-LPS (Re595) ugyan hatékonyan aktiválta a TLR4 receptort expresszáló hízósejteket, viszont nem volt ismert, hogy ez az LPS forma vajon indukál-e vérlemezke aktivációt is. Ezért különböző thrombocytá marker változásán keresztül megvizsgáltuk az Re-LPS (Re595) hatását PRP mintákban, és a kapott eredményeinket összevetettük a mások által korábban használt *E. coli* eredetű S-LPS-sel (O111:B4).

Miután igazoltuk a Re-LPS és az S-LPS prokoaguláns aktivitását, megvizsgáltuk az LPS kötődését a vérlemezkékhez, amit FITC-cel jelölt Re-LPS kötődési vizsgálattal ellenőriztünk áramlási citometriával, és jelentősen emelkedett MFI értéket kaptunk a pozitív sejteknél. Az LPS kötődése jelentősen növelhető volt TRAP aktiváció jelenlétében, mivel a TLR4 mellett az ilyenkor expresszálódó P-selectin receptor (CD62P) szintén részt vett az LPS megkötésében, ahogy ezt korábban mások is találták. Önmagában egyik LPS forma sem tudott thrombocytá aggregációt kiváltani még 10-60 perces előkezelést követően sem, vagy akár közvetlenül az aggregációt megelőzően a PRP mintákhoz adva, mint az előzőekben próbálták. Ezzel szemben az Re-LPS, de nem az S-LPS, fokozta a szubmaximális koncentrációban használt TRAP indukálta vérlemezke aggregációt. A párhuzamosan mért felszíni CD62P és CD40L pozitivitás

tekintetében nem tapasztaltunk P-selectin expresszió emelkedést egyik LPS forma hatására sem összevetve a nem kezelt mintákkal. Ugyanakkor a szintén α -granulum eredetű CD40L receptor expresszió - magas Re-LPS koncentráció hatására - szignifikánsan emelkedett MFI értékeket mutatott, míg az S-LPS nem befolyásolta ezt ellentétben korábbi közleményekkel. A thrombocyták mikropartikulák mennyisége jelentősen nőtt önmagában az Re-LPS hatására, illetve a TRAP-pal való együttes stimulációra, ugyanakkor az S-LPS-nek sem szinergista, sem gátló hatása nem volt a mikropartikula szintekre, mint ahogyan erről mások is nyilatkoztak korábban. A fentiek alapján a két különböző LPS forma eltérő módon befolyásolja a vérlemezkék működését.

Értékeljük az Re-LPS kötődésének további körülményeit is a saját *in vitro* beállításaink között. Ellenőriztük, hogy ez az LPS forma képes-e interakcióba lépni a thrombocyták TLR4 receptorral CD14 nélkül is. A S-LPS aktivációhoz biztosan szükséges a CD14, hogy kötődjön a TLR4-hez. Mivel a thrombocyták nem expresszálnak CD14-t, ezért megnéztük, hogy a szolubilis CD14 szükséges, illetve alkalmas-e, hogy az Re-LPS modulálja a vérlemezke aktivációt. Ezért gél-filtrált vérlemezke mintákat aktiváltunk Re-LPS-sel és TRAP-pal, fibrinogén mellett, LBP és szolubilis CD14 jelenlétében vagy hiányában. Azt tapasztaltuk, hogy az Re-LPS és TRAP stimulálta vérlemezke aggregáció nem volt tovább fokozható az LBP és szolubilis CD14 előkezeléssel. Szemben tehát a S-LPS-sel, az Re-LPS-nek tényleg nem szükséges CD14, és így is képes aktiválni a thrombocytákat. Összeségében megállapítható, hogy bár mindkét LPS forma biológiailag aktív, de csak az Re-LPS volt képes modulálni a vérlemezkék aktivációját.

Szepszisben nemcsak a keringő vérlemezkék, de a megakaryocyták is ki vannak téve a gyulladásos mediátorok direkt hatásának a TLR4 receptoron keresztül. Mindez a megakaryocyták abnormális működéséhez és ennek eredményeként akár az újonnan termelődő thrombocyták megváltozott funkciójához és fehérje szintéziséhez, pl. a granzyme B fokozott expressziójához és következményes lymphotoxicitáshoz vezet. Ezen felül a TLR2 receptoron keresztül indukálódó intracelluláris folyamatok szabályozzák a megakaryocyták működését is, ami kihathat a megakaryocyták-thrombocyták vonal működésére, így pl. fokozott GPIb receptor és COX-2 enzim expressziót okozva. Ugyanakkor a TLR4-mediálta megakaryocyták funkció eltérésekről és annak thrombocytákban észlelhető következményeiről még kevés információ áll rendelkezésre. Két korábbi vizsgálat során, amikor egereket 1 hétig alacsony (szubletális) dózisú LPS-nek tettek ki, az *ex vivo* thrombocyták az idő előrehaladtával fokozatosan növekvő aktivációt mutattak, ami emelkedő felszíni P-selectin pozitivitást és nagyobb aggregációs hajlamot eredményezett. Mindezt a szerzők az LPS-nek a megakaryocytákra kifejtett direkt

hatásának és az ezáltal megváltozott funkciójú új keringő vérlemezéknek tulajdonították. Összeségében minden olyan trigger, amely a megakaryocytákat érinti a csontvelőben, a thrombocyták „előaktivált”, protrombotikus fenotípusához vezethet szepszisben a vér nagyobb prokoaguláns aktivitása mellett.

Ezért első szepszises vizsgálsorozatunkban szeptikus betegektől izoláltunk nagy tisztaságú, fehérvérsejt-depletált thrombocytákat, és 3 szeptikus beteg vérlemezke mintájában miRNS-profilt analizáltuk TaqMan OpenArray módszerrel. Az egészséges személyekhez viszonyítva 121 miRNS csökkent, míg 61 fokozott mértékben expresszáldott a szeptikus vérlemezékben. A szeptikus csoportban a fokozott thrombocyta aktiváció háttérében detektáltuk a fokozott *SELP* gén (P-selectin) expresszióját szabályozó miR-26b csökkent szintjét, mint ahogyan előtte diabeteses vérlemezke és hiperglikémiás megakaryocyta sejt kultúrában tettük. A miR-26b expressziója ráadásul jelentősen alacsonyabb volt azoknál a betegeknél, akiknél szeptikus sokk alakult ki, illetve akik 28 napon belül elhaláloztak. Ezért ez a thrombocyta miRNS egy érzékeny új biomarkernek bizonyul a szepszishez társuló thrombocyta reaktivitás előrejelzésében úgy, mint a thrombocyta miR-223 és miR-146a koronária betegségben vagy diabetesben.

A szeptikus vérlemezék a magas felszíni P-selectin pozitivitás mellett szignifikánsan megnövekedett *SELP* mRNS expressziót is mutattak a kontrollokhöz képest megemelkedett *IL1B* expresszió mellett, amely utóbbit korábban szeptikus vérlemezékben leírtak. Fontos kiemelni, hogy amikor a thrombocyták méretét és reaktivitását kifejező MPV értékek alapján tovább elemeztük a *SELP* expressziót a betegek vérlemezke mintáiban, magasabb *SELP* mRNS szintet találtunk azoknál, akiknél a vérlemezék nagy MPV értéket mutattak ($\geq 11,1$ fL). A nagyobb vérlemezék általában több granulomot és RNS-t is tartalmaznak, ezáltal valóban reaktívabbá válhatnak, mint a kisebb thrombocyták. Bár ezeknél a betegeknél a *SELP* expresszió nem korrelált szignifikánsan a szepszis súlyosságával és kimenetelével, a megnövekedett MPV értékek előre jelezték a betegség prognózisát. A P-selectin expressziót elősegítő megnövekedett *SELP* mRNS szint mellett viszont magasabb P-selectin fehérjetartalmat is detektáltunk a szepszises thrombocyta lizátumokban, amihez hozzájárul a megakaryocyták és a vérlemezék megváltozott miRNS és mRNS expressziója. Egy peritoneális szepszises állatkísérletben az egér vérlemezék 48 órán át emelkedő P-selectin pozitivitást mutattak. Az aktivált thrombocyták felszínén a fokozott P-selectin expresszió nagymértékben részt vesz a heterotipikus aggregátumok kialakulásában, ami mikrovaszkuláris trombozishoz vezethet. Összeségében a vérlemezékben indukálódó *SELP* gén expressziója

még inkább hozzájárulhat a sejt-sejt interakciók nagyobb mértékű kialakulásához, és ezáltal a P-selectin receptor új terápiás célpontot jelenthet szepszisben.

A szepszis vérlemezke transzkriptomát érintő hatását nemrégiben karakterizálták, ugyanakkor kevés tanulmány foglalkozott eddig a megakaryocytákat közvetlenül érintő szepszises folyamatokkal, amely megváltozott RNS expressziót eredményezhet nemcsak bennük, hanem a keringő vérlemezékben is. Ezért részleteiben megvizsgáltuk az LPS által kiváltott transzkripciós változásokat egy régóta alkalmazott, könnyen fenntartható, és jól kezelhető megakaryocytá modellrendszerben, a MEG-01 sejtekben. A szepszis során a vérlemezékben emelkedett ITGA2B mRNA expressziót figyeltek meg mind a humán, mind az egér vérlemezékben, ami az α IIB thrombocytá fehérje *de novo* szintézisét eredményezte az α IIB β 3 integrin tartós aktivációjával. Ennek érdekében a MEG-01 sejt kultúrákat 4 órán keresztül LPS-sel stimuláltuk a megakaryocytá transzkriptóma elemzésére. Az LPS indukálja az NF- κ B útvonalat a MEG-01 sejtekben, amelyet a p65 fokozott nukleáris transzlokációjával fluoreszcens mikroszkóppal vizualizáltunk. RNS szekvenálással 1060 szignifikánsan csökkent és 354 nagyobb mértékben expresszálandó transzkriptet detektáltunk. Ezen eredmények alapján a *SELP*-et az 50 legnagyobb változást mutató gén között azonosítottuk. Ezt követően validáltuk a *SELP* expresszió változását LPS-stimulált MEG-01 sejtekben RT-qPCR-rel, ami szignifikáns emelkedést mutatott. A fenti adatokból arra következtethetünk, hogy a szepszis kialakulása során a csontvelő érintettsége okán jelentős intracelluláris folyamatok és génexpressziós változások következnek be a megakaryocytá-thrombocytá tengelyben, ami változatos fenotípusú vérlemezék termelődéséhez vezethet. Ezt a mechanizmust a fokozott vérlemezke aktivációra vonatkozóan akut koronária szindrómában is felvetették korábban. Jelen kísérleteinkben az LPS-sel aktivált MEG-01 sejtekben a miR-26b szint a normálhoz képest jelentősen alacsonyabb volt, hasonlóan az *ex vivo* szepszises vérlemezékhez. A miR-26b-nek a *SELP* mRNA expresszióra gyakorolt funkcionális hatását ezen gyulladós körülmények között MEG-01 sejtekben erősítettük meg specifikus miRNA mimik segítségével, amit azóta mások is igazoltak egy állatmodellben.

Bár más gyulladós kórképben (pl. rheumatoid arthritis) csökkent *DICER1* expressziót mutattak ki, amely jelentősen megváltoztatta a miRNA expressziókat és ezen keresztül a gyulladós válaszreakciót, szepszisben ilyen adatok előttünk nem álltak rendelkezésre. Vizsgálataink során a Dicer1 fehérjeszint csökkenését figyeltük meg az *ex vivo* szepszises betegek thrombocytá lizátumában western blottal, míg az *in vitro* LPS-stimulált MEG-01 sejtek szintén alacsonyabb Dicer1 expressziót mutattak fluoreszcens mikroszkóppal. A Dicer1 enzim működésének közvetlen vizsgálata siRNA-sel végzett géncsendesítéssel történt, valamint a

calpain 1 és calpain 2 specifikus inhibitorral, a calpeptinnel. Eredményeink alapján szepszisben csökkent Dicer1 szint alakul ki, ami csökkentheti a miR-26b szintet, és ezáltal emelkedik a SELP mRNS expresszió mind a vérlemezkékben, mind a megakaryocytákban. Ennek megfelelően az LPS-re vagy TNF- α -ra adott válaszként megemelkedett intracelluláris Ca²⁺-koncentráció olyan calpain funkcióhoz vezet, amely hasítja a Dicer1 enzimet, és így kevesebb érett miRNS termelődik. Amikor a calpain aktivitását blokkoltuk, és a Dicer1 hasítását a calpeptin megakadályozta, az érett miR-26b szintek visszarendeződtek a MEG-01 sejtekben. Ennek megfelelően súlyos akut gyulladás során a vérlemezkékben és megakaryocytákban jelentősen csökkenhet a Dicer1 aktivitás, jelentősen átírva a miRNS-ek profilját. De csökkent a Dicer1 enzim szint krónikus inflammációban is, így DM2-ben, amit mi is és mások is kimutattak, hasonlóan a hiperglikémiás környezetben tartott a MEG-01 sejtekben. Ezen eredményeink alapján szepszisben a megakaryocytákban és a vérlemezkékben lecsökkent Dicer1 szint alacsony miR-26b expressziót eredményez, ami emelkedett SELP expresszióhoz vezet, így hozzájárulhat a vérlemezkék fokozottabb aktivációs állapotának kialakulásához. Génontológiai elemzést is végeztünk, amely alapján a SELP gén részt vesz számos gyulladásos válaszreakció kialakításában. A perifériás vérsejtekben kimutatott magas SELP expressziót proinflammatorikus kockázati tényezőként írták le reumás ízületi gyulladásban, valamint asztmában, továbbá egy friss szérum proteom vizsgálat alapján a SELP fehérje egy prokoaguláns prognosztikai faktor esszenciális thrombocytopeniában.

A thrombocyták aktiválódását a mikropartikulák lefűződése és ily módon a vérlemezke miRNS-ek szekréciója kíséri. Korábbi eredmények alapján kiderült, hogy a miR-223 HDL-hez kötött formában képes *in vitro* regulálni az ICAM-1 expressziót HCAEC sejtekben, míg a thrombocytá miR-320b jelentős parakrin hatást kifejtve az endothelsejteken szintén az ICAM-1 receptor felszínen való megjelenését modulálja AMI-ban. Ezek a korábbi adatok is azt bizonyítják, hogy a keringő miRNS-ek - bejutva más sejtekbe - képesek kiváltani az apoptózist, a sejtproliferációt, a migrációt és az inflammatorikus folyamatok lejátékozódását az endothelsejteken. Azonban nem állnak rendelkezésre olyan eredmények, hogy a thrombocytá miR-223 szeptikus körülmények között miként tudja befolyásolni az endothélium ICAM-1 expresszióját. A vizsgálathoz használt szepszises minták vérlemezkéinek fokozott aktiválódását ezúttal is a magas felszíni P-selectin expresszióval igazoltuk, ami megnövekedett mikropartikula számmal járt együtt a kontrollokhöz képest. A szolubilis ICAM-1 szintet vizsgálva a szeptikus szérumokban szignifikáns emelkedést találtunk a kontroll csoporthoz képest, ami az endothelsejtek fokozott aktivációját jelzi. Ezt követően a miR-223 expresszióját RT-qPCR segítségével vizsgáltuk a bevont betegek vérlemezkéiben, plazmájában és izolált

mikropartikula mintáiban. A miR-223 expresszió csökkent szintet mutatott a szeptikus thrombocytákban, míg a keringő miR-223 expresszió mind a szeptikus plazma mintákban, mind az izolált vérlemezke mikropartikula mintákban emelkedett volt a kontroll mintákhoz képest. Feltételeztük, hogy az alacsonyabb thrombocyta miR-223 szint másik oka - az előzőekben bemutatott mechanizmusok mellett - a miRNS felszabadulása lehet a plazmába részben a mikropartikulákon keresztül ilyen súlyos gyulladási körülmények között. Ezért LDP mintákat magas TRAP koncentrációval *in vitro* stimuláltuk, amely modellezte a szépszisben fokozott thrombinképződés által indukált vérlemezke aktivációt, és a thrombocyta „pellet”-ben és felülúszóban is megvizsgáltuk miR-223 expressziót. A TRAP-pal aktivált thrombocytákban a miR-223 expresszió szignifikánsan csökkent a nem kezelt mintához képest, míg a felülúszóban megemelkedett miR-223 szintet figyeltünk meg a kezelés után. Ennek megfelelően azt gondoljuk, hogy a thrombocyta aktiválódásakor a mikropartikulákban lévő miRNS átvitele valóban megtörténik a keringésbe. Mások vizsgálata szerint a thrombin aktiváció a cel-miR-39 expressziójának jelentős emelkedését okozta a vérlemezkék felülúszójában, ami az intracelluláris miR-39 tartalom kikerülését jelentette.

Mivel az endothélium a keringő mikrovezikula tartalom fontos célpontja a szív- és érrendszeri megbetegedésekben, valamint a gyulladási kórképekben, ezért mi is megvizsgáltuk és detektáltuk a miRNS-ek thrombocyta eredetű mikropartikulákon keresztüli bejutását az endothelsejtekbe. A HCAEC sejteket együtt tenyésztettük szépszises, illetve kontroll egyének mintáiból izolált mikropartikulákkal. Azt tapasztaltuk, hogy 24 óra elteltével nagyobb mértékű volt a szépszises mikropartikulák felvétele az endothelsejtekbe, mint a kontroll minták esetében. Korábbi tanulmányok dokumentálták a normál mikropartikulák és exoszómák internalizációját a HUVEC sejtekbe. Jelen tanulmányunkban a szépszis eredetű thrombocyta mikropartikula fokozott internalizációjáról számoltunk be az endothéliumba, amely 4 °C-on gátolható volt. Ezt az inhibíciót korábban más kutatók is alkalmazták, ahol a cél az endocitózis megakadályozása volt. Ezután megfigyeltük a szépszises mikropartikulák hatását az endothelsejtek működésére a „szekretált” miRNS-ek révén. A HCAEC sejteket előkezeltük szépszises vérlemezke-eredetű mikropartikulával, amelyek megnövekedett miR-223 expressziót mutattak, míg az ICAM1 mRNS expresszió csökkent. Ezzel párhuzamosan a TNF- α -val előkezelt HCAEC sejteket *in vitro* inkubáltuk TRAP stimulációval „előállított” mikropartikula mintával. Maga a TNF- α előkezelés csökkentette a miR-223 expresszióját és emelte az ICAM1 mRNS szintet a kontroll mintához képest, míg a TRAP-aktivált mikropartikulák jelenlétében a magasabb miR-223-at csökkent *ICAM1* expresszióval detektáltuk. Az endothelsejtek felülúszójában a szolubilis ICAM-1 protein mennyiségét a TNF-

α növelte, míg a TNF- α és mikropartikulák együttes kezelése 24 óra elteltével szignifikánsan csökkent fehérje koncentrációt eredményezett. Ezen kívül a jégen (4 °C-on) tartott HCAEC sejtekben a miRNS expresszió nem változott, míg 37 °C-on a miR-223 szint emelkedett volt a mikropartikula nélküli kontroll endothelsejt mintákhoz képest. Ezek az eredmények együttesen megerősítik, hogy a miR-223-at hordozó mikropartikulák endocitózisa egyértelműen növeli a miRNS expresszióját az endothelsejtekben. Ezen kívül a thrombocytá mikropartikulák által átjutott miR-223 képes a gyulladáshoz vezető körülmények miatt indukált ICAM-1 receptor expresszióját csökkenteni az endothelsejtekben.

A miRNS expressziójának molekuláris mechanizmusának további tisztázása érdekében ezekben a kísérletekben is vizsgáltuk, hogy történik-e fokozott miRNS transzkripció, illetve a Dicer1 enzim esetleges fokozott szintje hozzájárul-e a szepszises mikropartikulákkal kezelt HCAEC sejtek fokozott miR-223 expressziójához. Azt tapasztaltuk, hogy az érett miR-223 jelentősen emelkedett, míg a pre-miR-223 szint nem változott a mikropartikulák jelenlétében, míg a *DICER1* gén siRNS-sel való csendesítése után is az érett miR-223 szint még mindig jelentősen emelkedett volt a mikropartikulák jelenlétében a HCAEC sejtekben. Összességében tehát a megnövekedett miR-223 szint a mikropartikulák által szállított miRNS következménye volt, ami arra is utal, hogy sem transzkripció, sem a Dicer1 enzim szint változása nem járult hozzá ezen gyulladáshoz vezető körülmények között tartott endothelsejtek megváltozott miR-223 expressziójához.

Végül a miR-223 leukocytá-endothelsejt interakcióra gyakorolt funkcionális hatásának megértése érdekében végeztünk kísérletet. Az endothelsejtek felszínéhez kötött izolált PBMC-k mennyisége kb. 30%-kal csökkent, amikor előkezelésként szepsziszből származó mikropartikulákat adtunk a HCAEC sejtekhez. Mivel több receptor is részt vesz a leukocytá-endothelsejt interakcióban, ezért ennél nagyobb mértékű csökkenésre nem számítottunk. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a PMP-k a miR-223-on keresztül mérsékelik az ICAM-1 expressziót az endothelsejteken, ami kevesebb leukocytá-endothelsejt interakciót eredményez.

A két szepszises vizsgálatunk és mások eredményeinek összesítéséből azt gondoljuk, hogy a szepszisz során felszabaduló bakteriális mediátorok (pl. LPS) és citokinek (pl. IL-1 β , IL-6) nemcsak a vérlemezkéket stimulálják a keringésben, ami fokozott thrombocytá aktivációhoz vezethet, hanem a csontvelőbe bejutnak és a megakaryocyták működésére is hatással vannak: fokozhatják (pl. TNF- α) vagy éppen gátolhatják a megakaryopoiesist és thrombopoiesist (pl. IFN- α). Hasonlóan, egy coecum ligációs és punkciós (CLP) szepszises egérmódel szerint az LPS is képes bejutni az állatok csontvelőjébe és a megakaryocyták fokozott IL6 mRNA expressziót mutattak. Mindennek köszönhetően megváltozott működésű, protrombotikus új

vérlemezkék termelődnek, amit nemcsak bakteriális szepszisben, hanem koronavírus-betegség 2019 (COVID-19) betegségben is nemrégiben leírtak. Ezek a thrombocyták már eleve egy „előaktivált” állapotban vannak és megváltozott RNS expressziójuk révén prokoaguláns fehérjéket, pl. P-selectint (csökkent miR-26b/emelkedett SELP mRNS által) vagy α IIb integrint (magas ITGA2B mRNS által) tudnak újonnan termelni. Ezzel párhuzamosan az aktiválódott vérlemezkék mikropartikulákat szekretálnak, amelyekbe a miRNS tartalmuk is bepakolódik, ami így eljut a keringésen keresztül más sejtekhez, pl. az endothelsejtekhez megváltoztatva azok működését, fehérje expresszióját. Tehát szepszisben a megváltozott thrombocyta miRNS expressziók kialakításában mindkét mechanizmus egyszerre részt vehet. Ugyanakkor érdekes adat az is, hogy az aktiválódott vérlemezke funkció következménye nemcsak a kóros alvadási zavarok bekövetkezte, hanem a túlzott mértékű, akár elhúzódó endothelsejt aktiváció kompenzációja is.

5.5 A BMS és DES eltérő sejtaktiváló hatása, valamint a DES-ből felszabaduló everolimus által csökkentett endothelsejt aktiváció szabályozása

Az utóbbi években számos klinikai közlemény jelent meg a DES kedvező hatásairól szemben a hagyományos fémsztentekkel. Az elmúlt két évtizedben a DES beültetés után az AMI kialakulásának kockázata és a kórházi mortalitás aránya jelentősen csökkent, a kezelt érszakasz revaszkularizációja egyre könnyebben volt elérhető, vagyis kevesebb ISR alakult ki, így összességében a betegek életminősége jelentősen javult. A DES valamilyen gyulladáscsökkentő és sejtproliferációt gátló hatással bíró gyógyszert (pl. everolimus, paclitaxel, sirolimus stb.) két fázisban bocsát ki az érintett érszakaszba a beültetést követő kb. 2-3 hónap alatt, és ezáltal lassabb endothelizáció és simaizomsejt proliferáció alakul ki, ami az ISR kockázatát jelentősen csökkenti. A DES és a BMS különböző típusainak hatékonyságát bár számos klinikai tanulmányban vizsgálták, mégis kevés *ex vivo* és még inkább *in vitro* adat állt rendelkezésre a két sztenttípus különböző sejtekre kifejtett direkt aktiváló hatásáról.

Tanulmányunkban összesen 28 BMS és 21 DES kezelésben részesült stabil anginás betegről származó vérmintában hasonlítottunk össze vérlemezke és az endothelsejt aktivációs markereket. A betegektől három időpontban gyűjtöttünk mintákat, akik azonos típusú BMS típusú sztentet (Integrity[®]) vagy everolimust eluáló koronária sztentet (Xience[®]) kaptak, és a két betegcsoport korban, nemből, dohányzási szokásokban és a társbetegségek vonatkozásában illesztett volt. A sztentbeültetést követő hemosztázis eltérések monitorozására D-dimer, fibrinogén és FM koncentrációkat értékeltünk. Ezek közül csak az FM szintje emelkedett meg a beavatkozást követően, amely inkább a koronária érszakasz átmeneti sérülésének köszönhető,

nem pedig a fokozott véralvadási folyamatnak. A beavatkozást követően a betegeket fél éven keresztül követtük, amely során nem tapasztaltunk sztenttrombózist, azonban 6 BMS betegnél (21,4 %) ISR alakult ki. Egy korábbi tanulmányban a komplikáció kialakulásának aránya (20,1%) nagyon hasonló volt a BMS betegeknél.

Fokozott vérlemezke aktivációt detektáltunk minden vérvételi időpontban mindkét betegcsoportban - a posztimplantációs vérlemezke gátló kezelés ellenére is - hasonlóan korábbi tanulmányainkhoz, ahol az invazív kardiológiai beavatkozást követően emelkedett thrombocyta P-selectin expressziót és megnőtt thrombocyta-eredetű mikropartikula szintet detektáltunk. Bár a CD62 pozitivitás átmenetileg csökkent a keringésből kikerült aktivált vérlemezkek miatt, de 1 hónap múlva újra megnőtt értékeket kaptunk. A szolubilis P-selectin koncentrációk fokozatosan emelkedtek a keringésben a vizsgálati időszak alatt, különösen a BMS csoportban, ahogyan ezt mások már 90 perc után találták, és a beavatkozás után 1 hónappal szignifikánsan még magasabb értékeket mértünk a BMS kezelés előtti szintekhez képest. Ezzel ellentétben mások nem találtak különbséget a szolubilis P-selectin szintben egyik sztentelés után sem, vagy inkább csökkent a koncentrációja a beavatkozást követő 24 órában. A szolubilis CD40L és a PDGF-BB a normálisnál emelkedettebb szintet mutatott, de a BMS és a DES csoport között nem találtunk jelentős eltérést ezekben a thrombocyta markerekben, ami megfelelt mások korábbi eredményeinek.

Az endothelsejt aktivációs markerek közül egyszerre vizsgáltunk korai markereket (pl. vWF) és késői, *de novo* szintetizálódó fehérjéket (pl. VCAM-1). A sztentelés előtt nem volt jelentős különbség a vWF-Ag koncentrációkban a két csoport között, ugyanakkor a BMS kohorsz már 24 órával a beavatkozás után szignifikáns emelkedést mutatott. A BMS csoportban a PCI után vett plazma mintákban szignifikánsan magasabb szolubilis VCAM-1 koncentrációkat is mértünk szemben a DES csoporttal. Hasonló VCAM-1 eredményekről számoltak be a BMS kezelést követően 3 nappal, valamint az ISR kialakulása után is jóval magasabb koncentrációját írták le emelkedett TNF- α értékek mellett. A szolubilis E-selectin már 24 óra után megemelkedett a beavatkozás után, elsősorban a BMS csoportban és tartósan magas maradt 1 hónap után is. Az E-selectin expresszió PCI általi indukciója régóta ismert, ugyanakkor mások csökkenő E-selectin plazma koncentrációkról számoltak be, különösen a DES betegek körében. Az ICAM-1 szintekben mi csak lassan növekvő értékeket detektáltunk, ami más betegkohorszok sztentelés utáni eredményeinek megfelel szoros összefüggést mutatva a keringő endothelsejtekkel.

A BMS kezelésben részesült betegek közül 6 esetben ISR alakult ki a 6 hónapos követési idő alatt, viszont a DES csoportban nem volt ilyen komplikáció, ezért a csoportbontás után

tovább analizáltuk az aktivációs markerek eredményeit. Az ISR szignifikánsan magasabb szolubilis ICAM-1 és CD40L, valamint E-selectin és vWF koncentrációk jelenlétében következett be a BMS betegekben, jelezve a nagyobb mértékű celluláris aktivációt a DES csoporthoz képest. A vaszkuláris sérülést követően aktiválódott vérlemezkékből nagyobb mennyiségű PDGF-BB is kikerül a keringésbe, ami a simaizomsejtek proliferációját okozhatja, fokozva az ISR kialakulásának valószínűségét. Végül a szignifikánsan magasabb TNF- α szint az ISR kialakulása során lejátszódó kóros gyulladási folyamatokat jelzi.

Az ISR jelenlétében mért magasabb E-selectin és VCAM-1 plazma szintek háttérében álló génextpressziók transzkripció és poszttranszkripció szintű szabályozásáról, valamint az everolimus sejtaktivációt csökkentő hatásáról még kevés információ állt rendelkezésre. Ezért a vaszkuláris gyulladási folyamatokat TNF- α aktivációval modelleztük koronária (artériás) és vénás endothelsejteken everolimus jelenlétében és hiányában. Az everolimus végkoncentrációjának 0,5 μ M választottunk, ami megfelel a sztent által lokálisan fenntartott gyógyszerkoncentrációnak a gyártó leírása szerint. A HCAEC alkalmas sejt kultúrának bizonyult az artériás endothelsejtek vizsgálatára, míg a szélesebb körben használt HUVEC sejtekben pedig megerősítettük eredményeinket. A SELE és a VCAM1 mRNS szintje a TNF- α hatására az inkubálási idő függvényében markánsan növekedett, amit az everolimus szignifikánsan csökkenteni tudott mindkét endothelsejt tenyészetben. Az everolimus az mRNS szintek befolyásolásán keresztül a fehérjék koncentrációját is képes volt szignifikánsan csökkenteni. Ezek az *in vitro* eredmények tehát magyarázattal szolgálhatnak arra vonatkozóan, hogy a DES csoportban miért volt kisebb az endothelsejt aktiváció és az E-selectin/VCAM-1 szintek a plazma mintákban. Az endothelsejt aktivációs markerek szabályozásában betöltött szerepe mellett az everolimus kedvező hatását az IL1B és IL-6 mRNS-ek expresszióján keresztül is analizáltuk. A HCAEC sejtekben TNF- α -val kiváltott általános gyulladási folyamatokat az emelkedett IL1B és IL-6 mRNS szintek igazolták, amik már 1-4 órával a kezelés után jelentős magasabbak voltak. Ezt a nagyfokú gyulladási válaszreakciót az everolimus 1 óra alatt szignifikánsan redukálta, ami 4 órát követően még kifejezőbbé vált. Az everolimus tehát csökkenteni tudta az endothelsejtek gyulladási folyamatait. Ezekből következően az everolimus antiproliferatív hatása mellett gyulladáscsökkentő hatással is bír, amit fehérvérsejteken igazolták már, miután neutrophil granulocytákban csökkentette az IL-8 termelését és a sejtek TNF- α indukálta endothelsejt-adhézióját is mérsékelte. Hasonlóan, a sirolimus szintén csökkenteni tudta a TNF- α kezeléssel kiváltott VCAM-1 szintjét a HUVEC sejtekben. További kísérletekkel igazolni tudtuk, hogy az everolimus képes az NF- κ B útvonalat gátolni a korai p65 transzlokáció gátlásán keresztül.

Az E-selectin és VCAM-1 expressziók transzkripciós szabályozásában részt vevő folyamatokat eddig csak LPS-el kezelt endothelsejtekben vizsgálták. A fenti eredmények alapján feltételeztük, hogy az everolimus a gének közelében található aktív enhanszerek represszálásán keresztül képes csökkenteni a TNF- α hatására megemelkedett SELE és VCAM1 mRNS szinteket. A SELE és VCAM1 gének közelében TNF- α indukált aktív enhanszer régiókat azonosítottunk a HUVEC sejtek eredményei alapján készült publikus ChIP-szekvenálási adatok újra elemzésével. A közelmúltban megjelent közleményekben bemutatták, hogy az enhanszerek aktivitására jól lehet következtetni az enhanszer RNS expressziók változásának mérésével. Ebből adódóan egy-egy kiválasztott enhanszer RNS expresszióját határoztuk meg mindkét gén esetén. Megerősítettük, hogy a TNF- α stimulus hatására a SELE_-11Kb és VCAM1_-10Kb enhanszer RNS-ek expressziója fokozódik, amit az everolimus 1 órás kezelést követően csökkentett a HCAEC sejtekben. Mindezek alapján azt gondoljuk, hogy az everolimus az eRNS-ek represszálásán keresztül gátolni tudja a TNF- α indukálta SELE és VCAM1 gének fokozott transzkripcióját, ezáltal mérsékelve az endothelsejt aktivációt.

Az E-selectin és VCAM-1 gének poszttranszkripciós szabályozása miRNS-ek által is történhet, mint ahogy azt HUVEC sejtekben már korábban vizsgálták. Jelen vizsgálatunkban a miR-181b szerepét *in vitro* analizáltuk TNF- α stimulált endothelsejt kultúrákban, valamint megvizsgáltuk az everolimus lehetséges befolyásoló szerepét is. A TNF- α -val kiváltott sejtaktivációs folyamatokat a gyulladás specifikus miR-155 és miR-146a expresszió változásán keresztül követtük, amik az irodalmi adatokkal egyezően jelentősen megemelkedett mindkét sejttypusban, ami az IL1B és IL-6 mRNS-hez hasonlóan jelezte a gyulladásos válaszreakciót. Ugyanakkor ezen miRNS-ek fokozott expressziója az everolimus jelenlétében nem következett be. Kiemelendő, hogy a miR-181b expressziója lényegesen lecsökkent a TNF- α stimulus hatására, majd a gyulladásos citokinnel egy időben alkalmazott everolimus mérsékelte a miR-181b expressziójának csökkenését, ezáltal csökkentve a cél mRNS-ek fokozott kifejeződését. Megerősítettük a miR-181b és a SELE, valamint a VCAM1 mRNS-ek közötti direkt funkcionális összefüggést a TNF- α stimulált HCAEC sejtekben miR-181b specifikus miRNS mimic-vel.

Az ISR kialakulásának hátterében a keringő miRNS-ek mennyiségének változását is megvizsgáltuk, ezért a betegetől származó plazma mintákban is meghatároztuk a miRNS profilt, amit a szolubilis markerekkel korreláltattunk. Az *ex vivo* plazma mintákban tapasztalt magasabb TNF- α koncentrációk mellett a markánsan emelkedett keringő miR-155 és miR-185 expressziók is alátámasztják az ISR-ben kialakult vaszkuláris diszfunkciót, szemben a komplikáció nélküli BMS és DES csoportokkal. Az E-selectin és VCAM-1 expressziókat

szabályozó miR-181b szintje még kisebb volt ISR-ben a teljes BMS és főleg DES csoportokhoz képest. Az OpenArray analízissel a teljes betegcsoportban a miR-424 szintje is jelentősen lecsökkent ISR-ben a komplikáció nélküli csoportokhoz képest, ami a vWF hosszú távú expresszió változását szabályozhatja. Az ISR-ben lecsökkent miR-126 és miR-34 a vaszkuláris gyulladásos folyamatokban töltenek be funkciót, amit már mások azonosítottak, ezért „kontroll” miRNS-ként szolgáltak a méréseink során. Végül a miR-181b és miR-424 expresszióját korreláltattuk a plazma mintákban mért endothelsejt aktivációs markerek szintjével. Erős korrelációt találtunk a csökkent miR-181b és az emelkedett E-selectin és VCAM-1 plazmaszintek, valamint a miR-424 és a vWF-Ag koncentrációk között. Ezekből arra következtethetünk, hogy a csökkent miRNS expressziók egy komplex szabályozási folyamat részeként hozzájárulhatnak a fokozott endothelsejt aktivációhoz ISR-ben.

5.6 A szérum/plazma HE4 fehérje egy új diagnosztikai és követéses biomarker CF-ben és a fokozott HE4 expressziót elősegíti a CF-es légúti epithelsejtek gyulladásos folyamatai

A CF klasszikus formája akár több szervet érintő örökletes megbetegedés, amely jelentősen lerövidíti a betegek várható élettartamát. Az életkilátásokat leginkább a CF-es légúti manifesztációk súlyossága határozza meg, ezért a tüdőbetegség mielőbbi észlelése, valamint lefolyásának és súlyosságának hatékony követése alapvető szempont a betegek gondozásában. A tüdőbetegség monitorizálására a klinikai gyakorlatban használt standard vizsgálati lehetőségek, így a spirometria korlátozott értékűek vagy a tüdő funkcionális MR vizsgálata korlátozott az elérhetőségük, ezért lehetőség szerint vérből meghatározható biomarkerekre van szükség.

A CF-es tüdőbetegség patomechanizmusának alapja a neutrophil granulocyták által mediált, és valamilyen bakteriális infekció által provokált légúti gyulladás, ami alapján kézenfekvőnek tűnik a gyulladásos biomarkerek meghatározása különböző testváladékokból a betegség aktivitásának követése céljából. A BAL mintából meghatározott gyulladásos biomarkerek között vannak erős prognosztikai vagy prediktív értékkel bíró mediátorok, pl. NE, azonban a mintavétel invazivitása miatt a klinikumban ez a lehetőség csak korlátozottan áll rendelkezésre. A köpet vizsgálatának legfőbb limitációja, hogy kisgyermekekben együttműködés hiányában nem nyerhető alsó légúti minta. Ráadásul a véralapú vizsgálatokhoz képest kevésbé reprodukálható eredmények várhatók, hiszen a köpet különböző mértékben érintett tüdőrégiókból származhat. A CF-es betegek köpetében részben ezért tapasztalható a citokinek szintjének nagy intra- és interindividuais variabilitása. Ezzel szemben számos

vérmintából meghatározott potenciális biomarker segítheti CF-ben a betegség követését, de ezek közül egy sem került bevezetésre a mindennapi gyakorlatba. A szérum IL-1 β , MPO és CRP, valamint a plazma IL-8 ugyan előre jelezte az akut pulmonális exacerbációt, de csak rövid távon. A leggyakrabban használt rutin paraméter, a CRP ugyanakkor nem mutatott szignifikáns összefüggést a betegség súlyossági indexével.

A HE4 rutinszerű mérése elsőként epitheliális petefészekrákban került bevezetésre tumor markerként. Azóta számos közlemény bizonyította, hogy a CA 125-höz képest nagyobb diagnosztikus értékkel bír a tumorok ezen formájában, de egyéb tumorokban, pl. tüdőrák is megemelkedhet a szintje. Kóros HE4 szintek viszont nemcsak malignitásokban, hanem egyéb, nem daganatos betegségekben is kimutathatók, így pl. tüdőtuberculosisban. A CF és a HE4 kapcsolatára egy olyan korábbi tanulmány hívta fel a figyelmünket, amelyben a HE4 immunhisztokémiai festésével emelkedett HE4 pozitivitást találtak CF-es betegekben származó tüdőbiopsziás mintákban. Azt viszont nem vizsgálták, hogy a fokozott pulmonális HE4 expresszió vezethet-e emelkedett szérum szinthez is a CF-es betegekben és ha igen, mi lehet ennek a celluláris mechanizmusa. Napjainkban a CF-es tüdőbetegség laboratóriumi paraméterekkel történő rendszeres vizsgálata még nem kellően megoldott, különösen a rendkívül drága CFTR-specifikus kezelés követésére, ezért nagy népegészségügyi jelentősége van új laboratóriumi tesztek kidolgozásának.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy mind a gyermek, mind a felnőtt nem kezelt CF-es betegek szérum mintáiban szignifikánsan magasabb HE4 koncentráció mérhető az egészséges személyek, illetve a nem CF-es tüdőbetegek mintáihoz képest. Esetenként a nem CF-es tüdőbeteg kohorszban a normálnál nagyobb HE4 értéket mértünk, különösen bronchiectasia esetén, de a legtöbb individuális HE4 eredmény jóval alatta maradt a CF-es populáció értékeihez viszonyítva. Ezek alapján a fokozott HE4 termelés CF-ben nemcsak az intrapulmonális gyulladásnak, hanem a CF-hez társuló speciálisabb celluláris körülményeknek, pl. a CFTR-csatorna diszfunkciónak köszönhető, amit azóta mások is megerősítettek. Bár az életkor általában befolyásolja a HE4 értékek alakulását, a CF-es beteg esetében az életkornak nem volt számottevő hatása a HE4 szintekre, szemben a verejték klorid koncentrációval, amely az életkor előrehaladtával növekvő tendenciát mutat. A súlyos tüneteket mutató CF-es betegekben lemért CRP többnyire csak mérsékelten volt emelkedett, pozitív szignifikáns összefüggést találtunk a HE4 és a CRP szintek között. Érdekes módon, a nem CF-es tüdőbetegek csoportjában ez a HE4/CRP összefüggés már nem volt kimutatható. A szérum HE4 diagnosztikai erejét ROC-görbe analízissel tovább vizsgáltuk: a CF-es betegek és a normál kontrollok megkülönböztetésére igen magas AUC értéket (0,993) kaptunk, míg a CF-es és nem

CF-es tüdőbetegség elkülönítésére némileg alacsonyabb, de még mindig markáns AUC értéket (0,778) kaptunk. Kiemelendő, hogy a szérumban HE4 akkor is kórosan emelkedett volt, amikor a verejték klorid intermedier tartományba esett (30-60 mmol/L) a genetikai teszttel igazolt CF-es betegekben.

A CF-ben megnőtt szérumban HE4 koncentráció eredetét és mechanizmusát előttünk mások nem vizsgálták. Néhány CF-es betegből bronchoscoppal nyert hörgőnyálkahártya biopsziás mintában kvantáltuk a HE4-specifikus mRNS szintet, amely szignifikánsan emelkedett volt a nem CF-es bronchitises kontroll mintákhoz képest. Ez az eredmény azt sugallta, hogy az emelkedett szérumban HE4 a CF-es légúti hám által fokozottan termelt fehérjének lehet köszönhető. Eredményeinket alátámasztotta egy korábbi vizsgálat, amelyben a *WFDC2* gént a fokozott expressziót mutató gének között igazolták a CF-es ornyálkahártya mintákban. A HE4 transzkripció szabályozása viszont ezidáig nem volt kellően ismert. A HE4-nek mint tumormarkereknek a kóros termelődése CF-ben összefügghet azzal, hogy a bronchoepithelsejtek kevésbé differenciált állapotban vannak a nem CF-es körülményekhez képest. Génexpressziós profilok metaanalízise alapján a CF-es nazális epithelsejtek profilja jelentős átfedést mutatott a nem differenciált epithélium fenotípus génjeivel. Pulmonális epitheliális sejtekben kimutatták, hogy a WFDC-fehérjecsaldába tartozó Elafin fehérje termelődésének citokin indukcióját egy NF- κ B kötőhely szabályozza a gén proximális promóter régióján belül. Hasonlóan, a HE4 promóter régiójától -322 pozícióban is leírtak egy NF- κ B kötőhelyet, így feltételeztük, hogy a HE4 transzkripciója az NF- κ B útvonal befolyása alatt áll.

Sok kérdés vár még annak megválaszolására, hogy a CFTR funkció korrekciója a károsodott veleszületett immunitás és/vagy az epithelsejt aktiváció modulálásával befolyásolja-e érdemben a légúti gyulladást CF-ben. A legutóbbi *in vitro* vizsgálatok csökkent IL-1 β és IL-18 szintet igazoltak a LPS által indukált monocytákban LUM/IVA, illetve TEZ/IVA kezelést követően, továbbá az IVA, vagy a LUM/IVA terápia jelentősen csökkentette a bakteriális fertőzés (*P. aeruginosa*) indukálta proinflammatorikus citokinek termelődését a macrophag funkció javításával. Alacsonyabb CXCL8 expressziót és p38 MAPK foszforilációt detektáltak a CFBE sejtekben Orkambi® kezelést követően. A CFTR korrektorok és potenciátorok gyulladáscsökkentő képességéről csak klinikai vizsgálatokból származó közvetett bizonyítékok álltak rendelkezésre. Ezért is fontos a CFTR-modulátorok ilyen típusú hatásának *in vitro* vizsgálatokkal történő alátámasztása.

A sejtes kísérleti munkánk célja ezért annak vizsgálata volt, hogy a CF-ben potenciális biomarkerként alkalmazható HE4 fokozott expressziója befolyásolható-e a CFTR funkció

javításával. Ennek érdekében a F508del-CFTR-t expresszázó CFBE 410⁻ sejt kultúrákban analizáltuk a kiindulási és a TNF- α által indukált HE4 szinteket a CFTR funkció és az NF- κ B útvonal aktiválódásának farmakológiai befolyásolása mellett, és az eredményeket a vad típusú CFTR-t expresszázó kontroll sejtek eredményeihez hasonlítottuk. Kiemelendő, hogy F508del-CFTR CFBE sejtek felülűszójában kb. 1,5-szer nagyobb HE4 koncentrációt találtunk a normál sejtekhez képest. A LUM/IVA, illetve a TEZ/IVA kezelés egyaránt csökkentette a HE4 szinteket a F508del-CFTR pozitív sejtekben a nem kezelt mintákhoz képest. A CFTR modulátorok általunk alkalmazott kísérleti körülményei összhangban vannak a korábbi *in vitro* tanulmányokban alkalmazott módszerekkel.

A CFTR modulátorok általi CFTR-csatorna funkció korrekciót korábban *in vitro* vizsgálatok már igazolták CF-es epithelsejt kultúrákban, de patch-clamp technikával mi is igazoltuk a CFTR funkció helyreállítását a CFTR modulátorok által egy korábbi publikációban bemutatott módszer alapján. Bár a CFTR aktivitás csak részleges korrekciója következett be a kezelés hatására, mértéke jelentősnek volt mondható mindkét alkalmazott gyógyszerkombináció mellett tekintettel arra, hogy az ionáram erősség 4pA/pF feletti értéke esetén már korrigált CFTR aktivitásról beszélhetünk. A két alkalmazott CFTR modulátor kombináció közül a TEZ/IVA nagyobb mértékben korrigálta a klorid áramot és csökkentette a HE4 expressziót a LUM/IVA-hoz képest. Ezt követően a CFTR-t a vad típusú sejtekben CFTR_{inh172} alkalmazásával gátoltuk, melynek eredményeképpen emelkedett HE4 szinteket mértünk. Ezzel ellentétben, a CFTR aktivátor FSK/IBMX kezelés csökkentette a HE4 koncentrációkat ugyanezen sejt típusban. Végezetül abban az esetben, ha a FSK/IBMX-t a CFTR modulátorokkal együtt alkalmaztuk a F508del-CFTR-t expresszázó CFBE sejtekben, a HE4 koncentráció tovább csökkent, különösen a TEZ/IVA esetén. A HE4 szintek változása megfelelt az adott körülmények között bekövetkező kloridáram változásnak. Eredményeink alapján a CF-es légúti epithelsejtekben a károsodott CFTR funkció növeli a HE4 expressziót, amely hatásosan csökkenthető az ioncsatorna funkciót helyreállításával. Az eredményeink párhuzamba állíthatók azzal a korábbi tanulmánnyal, amelyben a CFTR_{inh172} adását követően emelkedett NF- κ B aktivitást és magasabb IL-8 szintet találtak, míg a FSK/IBMX hatására csökkenő NF- κ B aktivitást mutattak ki az epitheliális sejt kultúrában.

A HE4 expresszió és a gyulladásos sejtaktiváció lehetséges kapcsolatát is analizáltuk, amikor TNF- α -val kezelt F508del-CFTR-t expresszázó CFBE 410⁻ sejttenyészetben a HE4 mRNS szint már 1 óras sejtaktivációt követően emelkedett. A TNF- α párhuzamosan kiváltotta a várt proinflammatorikus hatását a CFBE sejtekben, amit az IL6, IL8 és IL1B mRNS szinteken

keresztül követtünk RT-qPCR módszerrel. Az IL6 és IL8 esetén a mRNS szintek időbeli változásának mintázata hasonló volt a HE4 expresszió változásának időbeli alakulásához. Adataink arra utaltak, hogy a CF-es bronchoepithelsejtekben a gyulladáscitokinek emelkedett szintjével párhuzamosan a HE4 bazális expressziója is megnövekedett, tehát tovább fokozódhat gyulladáscitokinek között. Hasonló HE4 expresszió időbeli változást mutattak ki az NF- κ B jelátvitellel asszociált TLR2-mediálta útvonalon keresztül tumorsejtekben. Az ugyancsak a WFDC fehérjecsaldába tartozó SLPI és az Elafin termelődése hasonlóan indukálható volt TNF- α -val humán alveoláris epithelsejtekben.

Annak érdekében, hogy az NF- κ B jelátvitel fokozott működése és az emelkedett HE4 expresszió közötti összefüggést vizsgáljuk a CFBE sejtekben, a p65 nukleáris transzlokációt fluoreszcens mikroszkóppal vizualizáltuk mindkét CFBE 410⁺ sejt típusban TNF- α kezeléssel vagy anélkül. A CF-re jellemző fokozott proinflammatorikus aktivitásnak megfelelően a F508del-CFTR pozitív CFBE sejtekben szignifikánsan magasabb bazális p65 nukleáris pozitivitást detektáltunk a vad típusú sejtekhez képest TNF- α stimulus nélkül is. Az eredmény összhangban van korábbi adatokkal, amikor a vad típusú CFTR a TRADD fehérje degradációján keresztül szabályozta a TNF- α stimuláció által kiváltott jelátvitelt és így gátolta az NF- κ B jelátviteli kaskád lefolyását, míg a F508del-CFTR-t expresszáló sejtekben ez a gátló hatás nem jutott érvényre. Abban az esetben, amikor a sejteket TNF- α -val aktiváltuk, a p65 transzlokációban még szembetűnőbb volt a különbség a két CFBE sejt kultúra között. Eredményeink így megerősítik az alapállapotban is fokozott, illetve a gyulladás indukálta HE4 expresszió és az NF- κ B aktivitás közötti összefüggést.

Ezt követően kíváncsiak voltunk arra, hogy a LUM/IVA vagy a TEZ/IVA kezelés képes-e csökkenteni az alap és a TNF- α aktivált NF- κ B jelátvitelt, amely folyamat végsősoron felelős lenne a felülúszóban mért csökkent HE4 plazmaszintekért a CFTR-specifikus terápia alatt. A CFTR modulátorok nemcsak az aktiválatlan F508del-CFTR-t expresszáló CFBE sejtekben, de a TNF- α -val stimulált sejtekben is szignifikánsan csökkentették a p65 nukleáris pozitivitását. Ezen korrigált CFTR funkcióval bíró CFBE sejtek felülúszójában csökkent IL-6 szintet mértünk, ami arra utal, hogy a CFTR modulátoroknak a HE4 expresszióra gyakorolt gátló hatás mellett további gyulladáscsökkentő tulajdonságuk is van, mint amire más szerzők is a közelmúltban rávilágítottak. A CF-es légúti epithelsejtek gyulladáscsökkentő állapota tehát direkt módon csökkenthető CFTR modulátorokkal. Megfigyeléseinket és következtetéseinket több más publikált adat is támogatja, miszerint a LUM/IVA vagy TEZ/IVA kezelésben részesült CF-es betegek PBMC mintáiban csökkent inflammoszóma (NLRP3) aktivációt írtak le a caspase-

1 aktivitás csökkenésének következtében 3 hónapos kezelést követően. Az Orkambi® kezelés helyreállította a CFTR-dependens kloridáramot és javította a sérült légúti epithélium gyógyulását.

Mivel a F508del-CFTR pozitív CFBE 410⁺ sejtekben az NF-κB útvonal megnövekedett alapaktivitását találtuk, megvizsgáltuk, hogy egy specifikus NF-κB útvonal inhibitorral (BAY 11-7082) gátolható-e a HE4 expressziója. Az NF-κB inhibitor szignifikánsan csökkentette nem csak az alap, de az indukált HE4 és IL-6 koncentrációt is. Az eredmény arra utal, hogy az NF-κB jelátviteli útvonal szerepet játszik a HE4 expresszió szabályozásában. Ezzel a megállapítással összhangban vannak a CF-es betegek vizsgálatából származó adataink is: a súlyosabb légúti gyulladás (klinikai értelemben légúti exacerbáció) az emelkedett CRP szinttel együtt magasabb szérum HE4 szintekkel járt. Ha az NF-κB útvonal gátlása mellett CFTR modulátorokkal is kezeltük a CFBE sejteket, a HE4 és IL-6 szintek további szignifikáns csökkenése következett be, ami szerint a HE4 a CFTR direkt hatása alatt áll. A CF-es epithelsejtekben tehát a fokozott HE4 expresszióknak kettős oka van: a CFTR diszfunkció és az ehhez kötött, illetve egyéb külső stimulusok által indukált NF-κB útvonal kóros aktivitása.

A CFTR funkció helyreállítása konzekvensen alacsonyabb HE4 szinteket eredményezett *in vitro* kísérleteink során, ami összhangban volt a különböző CFTR modulátor kezelésekként álló CF-es betegcsoportok plazma mintáinak mért csökkenő HE4 értékekkel. Munkacsoportunk elsőként vizsgálta a plazma HE4 lehetséges biomarker szerepét a CFTR modulátor kezelésekként hatásosságának követésében. Elsőként *ivacaftorral* kezelt, a p.Gly551Asp-CFTR variánsra pozitív CF-es betegcsoportok plazmamintáinak HE4 koncentrációját határoztuk meg és vetettük össze a klinikai követési paraméterekkel, így a FEV₁ %-kal, a verejték klorid szintekkel és a BMI-vel. Az összes CF-es betegben magas volt az *ivacaftor* előtti plazma HE4 szint az egészséges populációhoz viszonyítva. Az *ivacaftor* kezelés eredményeképp - a javuló légzésfunkció és csökkenő verejték klorid értékek mellett - a kiindulási koncentrációtól függetlenül a HE4 értéke szignifikánsan alacsonyabb volt már 1 hónap után is, és fokozatosan tovább csökkentek a vizsgálati periódus végéig. A kezelt betegpopulációkban is a HE4 szintek jól korreláltak a tüdőbetegség súlyosságával: a HE4 abszolút és delta értékei szignifikáns inverz összefüggést mutattak a FEV₁ % és delta FEV₁ % értékekkel. A CF-es betegek jelentős részében a CRP értékek mérhetetlenül alacsonyak voltak, így a CRP nem igen volt használható a CFTR modulátorok hatásának monitorizálására. Ugyanakkor más szerzők szerint a CRP változásai segíthetik a CF-es tüdőbeteg súlyosságának követését, és akár a pulmonális exacerbáció előre jelzésére is alkalmas lehet. Bár szoros

összefüggés mutatkozott a HE4 és a CRP értékek között a vizsgálati populációnkban, összeségében a HE4-et alkalmasabb biomarkernek találtuk a CRP-hez képest az *ivacaftor* kezelés monitorizálásában. Végül a delta HE4 megkülönböztető erőt mutatkozott 7%-os FEV₁ % változás előrejelzésében a ROC-görbe analízis alapján, jelentős AUC értéket (0,806) találtunk főleg az első 2 hónapos gyógyszeres kezelést követően 81%-os szenzitivitással és 89%-os specificitással -15,8 pmol/L-es cut-off érték mellett.

Értékeljük a plazma HE4 szint változását a *lumacaftor/ivacaftor* kezelés alatt álló, a p.Phe508del-CFTR mutációra homozigóta CF-es betegek plazmamintáiban is. Ez a kezelés még több CF-es betegnek nyújthat segítséget mind gyermekkorban, mind felnőttekben, mivel a betegek kb. 80%-a a p.Phe508del-CFTR variánst hordozza. Hasonlóan az *ivacaftor* kezelt betegekhez, az Orkambi® terápia már egy hónappal a kezelés elindítása után szignifikánsan csökkentette a plazma HE4 koncentrációt. Jól korrelált a HE4 és a FEV₁ %-os értéke különösen a CF-es gyermekek körében, és a delta HE4 a 6. hónapban mért delta FEV₁ % eredményekkel még erősebb összefüggést mutatott, mint a két paraméter abszolút értékei. Ehhez kapcsolódóan, a ROC-görbe analízis is gyermekkorban mutatott magasabb AUC értéket a HE4 változás használhatóságára akár 2,6%-os (AUC: 0,9139), akár 5%-os FEV₁ % változást vettünk figyelembe (AUC: 0,7913). Megállapítottuk továbbá, hogy a kezelés előtt sokkal rosszabb légzésfunkcióval bíró betegek esetén a LUM/IVA terápia hatására sokkal nagyobb mértékű HE4 koncentráció változás következik be, ami nagyban segíti a klinikai állapot monitorozását. Végül a HE4 mérése a kezelésre jól és kevésbé jól reagáló betegek elkülönítését is segítheti, mivel a plazma HE4 csak azoknál a betegeknél változott érdemben, akik tényleges terápiás választ mutattak, szemben a verejték klorid és a BMI értékek alakulásával. Mások a szérumban mért IL-18, TNF- α és IL-1 β szintek követésével vizsgálták a *lumacaftor/ivacaftor*, illetve a *tezacaftor/ivacaftor* kezelés hatásosságát, illetve egy friss közlemény alapján a *tezacaftor/elexacaftor/ivacaftor* kezelést legérzékenyebben a plazma HE4 követte szemben az IL-6, IL-8 és MMP-9 értékekkel. Az utóbbi CFTR-specifikus terápia monitorozására munkacsoportunk jelenleg is teszteli a HE4-t.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a szervezetben bárhol, bármely okból kiváltott akut vagy krónikus gyulladás képes különböző sejttípusokban - sokszor egyidőben - olyan kóros intracelluláris, akár génszinten bekövetkező folyamatokat generálni, ami jelentősen befolyásolhatja az érintett sejtek működését. Egyúttal számos fehérje és nukleinsav természetű mediátor expressziója változik meg ilyenkor, amelyek hatékony laboratóriumi biomarkerként szolgálhatják a kórfolyamatok detektálását.

6 ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. A thrombocyta PKC θ izoenzim elősegíti mind a PAR, mind a GPVI receptorhoz kötött thrombocyta aktivációt azáltal, hogy fokozza az α IIb β 3 integrin aktivációját, szekréciót indukál a Syntaxin-4 foszforiláción keresztül, és egyben növeli a TXA₂ szintézist az ERK foszforiláció befolyásolásával. Összeségében a PKC θ részt vesz számos fontos vérlemezke aktivációs folyamat regulációjában, és ezáltal hozzájárul a stabil vérrögképződés kialakulásához.

2. 2-es típusú diabetes mellitusban a hiperglikémia hatására csökkent Dicer1 enzim funkció alacsony megakaryocyta-thrombocyta miR-223, miR-26b és miR-140 expressziót okoz, ami fokozott P2RY12 és SELP mRNS szintekhez vezet, és mindez kedvez a kóros vérlemezke reaktivitás kialakulásának a DM2 betegekben. A plazma mintákban mért csökkent plazma miR-223, miR-26b, miR-140 és miR-126 jól elkülönítette a diabeteses betegeket az egészséges kontrolloktól.

3. Már obezításban elkezd emelkedni a thrombocyták aktiváltsági szintje, amit a P2Y12 receptor által mediált szignálút vonal túlzott működése jelentős mértékben elősegít TXA₂-függő és független módon - indukált ERK és Akt foszforiláció révén - nemcsak extrém hiperkoleszterinémiában, hanem már mérsékelt emelkedett koleszterinszintek jelenlétében is. Obez betegekben szignifikáns pozitív összefüggés mutatható ki a carotis intima-média vastagság (IMT) értéke, valamint a thrombocyta P-selectin expresszió, a szolubilis P-selectin koncentráció és a vérlemezke mikropartikulák mennyisége között.

4. A megakaryocyta-thrombocyta RNS profil jelentős átrendeződése, köztük az alacsony miR-26b és az emelkedett SELP expresszió - a Dicer1 enzim csökkent működésének is köszönhetően - közreműködik a kóros vérlemezke aktiváció kialakulásában bakteriális szepszisben, ugyanakkor a vérlemezke-eredetű mikropartikulák által szállított miR-223 képes mérsékelni az endothelsejt diszfunkciót az ICAM-1 expresszió regulációján keresztül.

5. A gyógyszeres koronárisztent (DES) implantációja kisebb mértékű endothelsejt aktivációt okoz, mint a fémsztentek (BMS) beültetése, így kisebb eséllyel alakul ki resztenózis (ISR), ami annak is köszönhető, hogy a DES felszínéről felszabaduló everolimus képes lokálisan az endothelsejtek E-selectin és VCAM-1 expresszióját jelentősen mérsékelni transzkripció és poszttranszkripció szinten. A keringő miRNS-ek közül az emelkedett miR-155 és miR-185, valamint a csökkent miR-181b és miR-424 szintek megbízhatóan jelzik az ISR kialakulását.

6. A HE4 szérum/plazma koncentrációja jelentős mértékben megemelkedik cisztás fibrózisos tüdőbetegségben, ami jól korrelál a légzésfunkció változásával és az intrapulmonális gyulladással, valamint hatékonyan képes követni a CFTR-specifikus gyógyszerek hatását. A CF-es légúti epithelsejtek kóros HE4 expressziója a CFTR-csatorna diszfunkciónak, valamint az NF- κ B jelátviteli útvonal által közvetített gyulladási folyamatoknak a következménye.

7 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Pályámon **Kappelmayer János** professzor úr indított el, amiért nagyon hálás vagyok neki. Külön köszönöm a folyamatos emberi és szakmai támogatását, a jó munkahelyi légkör biztosítását és az élet egyéb területén is folytatott baráti eszmecsereket. Munkakapcsolatunk még III. éves orvostanhallgató koromban - egy klinikai biokémia gyakorlaton - kezdődött több mint 20 évvel ezelőtt, amikor a késésem miatt „büntetésből” vért vett tőlem a gyakorlathoz. Ennek ellenére később volt merszem felkeresni, hogy hadd csinálhassam nála a TDK-pályamunkámat. Kis habozás után igent mondott, bár rögtön hozzátette, hogy 2 hónap múlva indul egy egyéves tanulmányútra az USA-ba, így csak távolról tudja majd követni a munkámat. Így „pótanyaként” **Hevessy Zsuzsa** tanárnő vette át a témavezetésem, akinek ezúttal is köszönöm a segítségét. A tudományos diákköri munka olyan jól sikerült, hogy végzést követően nappali PhD hallgatóként Professzor úr mellett maradtam addig is időt nyerve, hogy végre eldöntsem, milyen klinikai szakmát válasszak. Tovább húzva az időt, a PhD munka folyamányaként egy 2 éves philadelphiai tanulmányútra mentem, amit **Satya Kunapuli** professzor úrnak utólag is nagyon köszönök, felejthetetlen szakmai és egyben élettapasztalat volt számomra. Onnan hazatérve maradtam a labordiagnosztikánál, így segítve a Betegek gyógyulását. A szakvizsgát követően máris saját PhD hallgatót szerettem volna, így kezdtem el együtt dolgozni **Fejes Zsolt** kollégámmal, akivel - végzését követően is - tovább folytatjuk a közös munkát. Nagyon köszönöm neki, hogy segített egy új tudományos témát, egy önálló labort együtt kialakítani, amihez azóta már 5 további PhD hallgató (**Debreczeni-Szilágyi Bernadett, Bene Zsolt, Pócsi Marianna, Sütő Renáta, Balla György Jázon**) is csatlakozott, akik itt végezték vagy jelenleg is végzik a kutatómunkájukat. Nekik is köszönöm az alapos munkájukat, a kitartásukat és az együtt eltöltött kellemes időt. Külön köszönöm közvetlen kollégáimnak, **Antal-Szalmás Péter** és **Balogh István** professzor uraknak a technikai segítségüket és jó ötleteiket, és **Bekéné Debreceni Ildikónak** a metodikai fortélyok átadását. Kutatásaink során számos remek hazai és külföldi kollaborátorral dolgozhattam együtt. Köszönettel tartozom **Czimmerer Zsoltnak, Fenyvesi Ferencnek, Váradi Juditnak, Rusznyák Ágnesnek, Fagyas Miklósnak, Póliska Szilárdnak, Horváth Attilának, Szántó Tibornak, Panyi Györgynek, Jeney Viktóriának** és **Balogh Enikőnek**, továbbá **Milan Macek, Margarida D. Amaral, Libor Fila, Luka A. Clarke** és **Kenneth Clemetson** professzoroknak a gyümölcsöző együttműködésért. Úgy érzem, hogy az elmúlt években nemcsak szakmai, de baráti kapcsolat is kialakult közöttünk, amiért külön hálás vagyok. Bátorításukért és támogatásukért köszönettel tartozom **Balla György, Paragh György, Balla**

József, Mátyus László, Papp Zoltán és Hegyi Péter professzor uraknak. Hálával gondolok továbbá azokra a kiváló klinikus kollégákra, akik értékes beteganyagukkal és hasznos tanácsaikkal segítették a munkámat: **Szük Tibor, Káplár Miklós, Csongrádi Éva, id. Nagy Béla, Gönczy Ferenc, Bede Olga, Nagy Dóra, Újhelyi Rita, Szabó Ágnes, Anghelyi Andrea, Major Miklós, Nagy György, Kerekes György, Berhés Mariann, Szücs Ildikó, Griger Zoltán és Halmi Sándor.** Emellett köszönöm **Nagy Attilának, Bhattoa Harjit Palnak és Karányi Zsoltnak** a statisztikai számításokban, **Kópis Ildikónak, Köteles Juliannának és Botosné László Valentinának** az adminisztratív ügyekben, valamint valamennyi **Asszisztensnőnek és Analitikusnak** a disszertációhoz kapcsolódó laboratóriumi munkában nyújtott segítségét. Végül nagyon köszönöm **Szüleim, Testvérem, Feleségem,** csodálatos **Gyermekeim és Barátaim** odaadó szeretetét és türelmes támogatását.

8 AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Nagy B Jr**, Bhavaraju K, Getz T, Bynagari YS, Kim S, Kunapuli SP. Impaired activation of platelets lacking protein kinase C-theta isoform. *Blood*. 2009; 113(11): 2557-67. IF: 10,555
2. Csongrádi É, **Nagy B Jr**, Fulop T, Varga Z, Karányi Z, Magyar MT, Oláh L, Papp M, Facskó A, Kappelmayer J, Paragh G, Káplár M. Increased levels of platelet activation markers are positively associated with carotid wall thickness and other atherosclerotic risk factors in obese patients. *Thromb Haemost*. 2011; 106(4): 683-92. IF: 5,044
3. **Nagy B Jr**, Jin J, Ashby B, Reilly MP, Kunapuli SP. Contribution of the P2Y12 receptor-mediated pathway to platelet hyperreactivity in hypercholesterolemia. *J Thromb Haemost*. 2011; 9(4): 810-9. IF: 5,731
4. **Nagy B Jr**, Krasznai ZT, Balla H, Csobán M, Antal-Szalmás P, Hernádi Z, Kappelmayer J. Elevated human epididymis protein 4 concentrations in chronic kidney disease. *Ann Clin Biochem*. 2012; 49(Pt 4): 377-80. IF: 1,922
5. **Nagy B Jr**, Miszti-Blasius K, Kerényi A, Clemetson KJ, Kappelmayer J. Potential therapeutic targeting of platelet-mediated cellular interactions in atherosclerosis and inflammation. *Curr Med Chem*. 2012; 19(4): 518-31. IF: 4,070
6. Kappelmayer J, Beke Debreceni I, Vida A, Antal-Szalmás P, Clemetson KJ, **Nagy B Jr**. Distinct effects of Re- and S-forms of LPS on modulating platelet activation. *J Thromb Haemost*. 2013; 11(4): 775-8. IF: 5,550
7. Szük T, Fejes Z, Debreceni IB, Kerényi A, Édes I, Kappelmayer J, **Nagy B Jr**. Integrity[®] bare-metal coronary stent-induced platelet and endothelial cell activation results in a higher risk of restenosis compared to Xience[®] everolimus-eluting stents in stable angina patients. *Platelets*. 2016; 27(5): 410-9. IF: 2,465

8. **Nagy B Jr**, Nagy B, Fila L, Clarke LA, Gönczy F, Bede O, Nagy D, Újhelyi R, Szabó Á, Anghelyi A, Major M, Bene Z, Fejes Z, Antal-Szalmás P, Bhattoa HP, Balla G, Kappelmayer J, Amaral MD, Macek M Jr, Balogh I. Human Epididymis Protein 4: A Novel Serum Inflammatory Biomarker in Cystic Fibrosis. *Chest*. 2016; 150(3): 661-72. IF: 6,044

9. Fejes Z, Póliska S, Czimmerer Z, Káplár M, Penyige A, Gál Szabó G, Beke Debreceni I, Kunapuli SP, Kappelmayer J, **Nagy B Jr**. Hyperglycaemia suppresses microRNA expression in platelets to increase P2RY12 and SELP levels in type 2 diabetes mellitus. *Thromb Haemost*. 2017; 117(3): 529-42. IF: 4,952

10. Fejes Z, Szilágyi B, Kappelmayer J, **ifj. Nagy B**. Vérlemezke-mikro-RNS-ek expressziójának változása thrombocytaktivációval járó betegségekben. *Orv Hetil*. 2018; 159(47): 1962-70. IF: 0,564

11. Fejes Z, Czimmerer Z, Szük T, Póliska S, Horváth A, Balogh E, Jeney V, Váradi J, Fenyvesi F, Balla G, Édes I, Balla J, Kappelmayer J, **Nagy B Jr**. Endothelial cell activation is attenuated by everolimus via transcriptional and post-transcriptional regulatory mechanisms after drug-eluting coronary stenting. *PLoS One*. 2018; 13(6): e0197890. IF: 2,776

12. Szilágyi B, Fejes Z, Pócsi M, Kappelmayer J, **Nagy B Jr**. Role of sepsis modulated circulating microRNAs. *EJIFCC*. 2019; 30(2): 128-45.

13. **Nagy B Jr**, Bene Z, Fejes Z, Heltshe SL, Reid D, Ronan NJ, McCarthy Y, Smith D, Nagy A, Joseloff E, Balla G, Kappelmayer J, Macek M Jr, Bell SC, Plant BJ, Amaral MD, Balogh I. Human epididymis protein 4 (HE4) levels inversely correlate with lung function improvement (Δ FEV₁) in cystic fibrosis patients receiving ivacaftor treatment. *J Cyst Fibros*. 2019; 18(2): 271-7. IF: 4,759

14. Szilágyi B, Fejes Z, Póliska S, Pócsi M, Czimmerer Z, Patsalos A, Fenyvesi F, Rusznyák Á, Nagy G, Kerekes G, Berhész M, Szűcs I, Kunapuli SP, Kappelmayer J, **Nagy B Jr**. Reduced miR-26b Expression in Megakaryocytes and Platelets Contributes to Elevated Level of Platelet Activation Status in Sepsis. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(3): 866. IF: 5,924

15. Szilágyi B, Fejes Z, Rusznyák Á, Fenyvesi F, Pócsi M, Halmi S, Griger Z, Kunapuli SP, Kappelmayer J, **Nagy B Jr.** Platelet Microparticles Enriched in miR-223 Reduce ICAM-1-Dependent Vascular Inflammation in Septic Conditions. *Front Physiol.* 2021; 12: 658524.

IF: 4,755

16. Bene Z, Fejes Z, Szanto TG, Fenyvesi F, Váradi J, Clarke LA, Panyi G, Macek M Jr, Amaral MD, Balogh I, **Nagy B Jr.** Enhanced Expression of Human Epididymis Protein 4 (HE4) Reflecting Pro-Inflammatory Status Is Regulated by CFTR in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells. *Front Pharmacol.* 2021; 12: 592184.

IF: 5,988

17. Pócsi M, Fejes Z, Bene Z, Nagy A, Balogh I, Amaral MD, Macek M Jr, **Nagy B Jr.** Human epididymis protein 4 (HE4) plasma concentration inversely correlates with the improvement of cystic fibrosis lung disease in p.Phe508del-CFTR homozygous cases treated with the CFTR modulator lumacaftor/ivacaftor combination. *J Cyst Fibros.* 2023; 22:1085-1092.

IF: 5,527

9 AZ ÉRTEKEZÉSBEN NEM TÁRGYALT KÖZLEMÉNYEK

1. **Nagy B**, Veszprémi A, Kiss F, Miszti-Blasius K, Kappelmayer J. Thrombocyták aktiváltsági állapotának vizsgálata áramlási citometriai módszerekkel. *Klin Kísérl Lab Med.* 2003; 30: 46-53.
2. Kappelmayer J, **Nagy B Jr**, Miszti-Blasius K, Hevessy Z, Setiadi H. The emerging value of P-selectin as a disease marker. *Clin Chem Lab Med.* 2004; 42(5): 475-86. IF: 1,685
3. Hevessy Z, **Nagy B Jr**, Kiss F, Kissné SV, Kiss A, Reményi G, Kappelmayer J. Paroxysmalis nocturnalis hemoglobinuria laboratóriumi diagnosztikája. *Klin Kísérl Lab Med.* 2004; 31(2): 66-76.
4. Hevessy Z, **Nagy B Jr**, Kiss F, Kiss A, Kappelmayer J. Mean fluorescence intensity rate is a useful marker in the detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones. *Clin Chem Lab Med.* 2005; 43(9): 919-23. IF: 1,918
5. Szük T, **Nagy B Jr**, Bereczky Z, Koszegi Z, Edes I, Kappelmayer J. Effects of ad hoc clopidogrel loading versus pre-treatment on P-selectin expression after coronary stent implantation. *Platelets.* 2006; 17(5): 344-6. IF: 1,679
6. **Nagy B Jr**, Csongrádi E, Bhattoa HP, Balogh I, Blaskó G, Paragh G, Kappelmayer J, Káplár M. Investigation of Thr715Pro P-selectin gene polymorphism and soluble P-selectin levels in type 2 diabetes mellitus. *Thromb Haemost.* 2007; 98(1): 186-91. IF: 3,501
7. Schlammadinger Á, Tóth J, **Nagy B**, Fazakas F, Hársfalvi J, Kappelmayer J, Muszbek L, Radványi G, Boda Z. Bernard-Soulier szindróma: a herediter thrombocytopeniák ritka oka. *Hemat Transzf.* 2007; 40: 40-6.
8. Chari R, Getz T, **Nagy B Jr**, Bhavaraju K, Mao Y, Bynagari YS, Murugappan S, Nakayama K, Kunapuli SP. Protein kinase C[delta] differentially regulates platelet functional responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(5): 699-705. IF: 7,235
9. Bynagari YS, **Nagy B Jr**, Tuluc F, Bhavaraju K, Kim S, Vijayan KV, Kunapuli SP. Mechanism of activation and functional role of protein kinase Ceta in human platelets. *J Biol Chem.* 2009; 284(20): 13413-21. IF: 5,328

10. **Nagy B Jr**, Simon Z, Bagoly Z, Muszbek L, Kappelmayer J. Binding of plasma factor XIII to thrombin-receptor activated human platelets. *Thromb Haemost.* 2009; 102(1): 83-9. IF: 4,451
11. Simon Z, Kiss A, Erdödi F, Setiadi H, Beke Debreceni I, **Nagy B Jr**, Kappelmayer J. Protein phosphatase inhibitor calyculin-A modulates activation markers in TRAP-stimulated human platelets. *Platelets.* 2010; 21(7): 555-62. IF: 2,117
12. **Nagy B Jr**, Szuk T, Debreceni IB, Kappelmayer J. Platelet-derived microparticle levels are significantly elevated in patients treated by elective stenting compared to subjects with diagnostic catheterization alone. *Platelets.* 2010; 21(2): 147-51. IF: 2,117
13. Turaga R, Bynagari Y, **Nagy B Jr**, Kunapuli S. Protein kinase C isoforms - implications to thrombosis. *Curr Signal Transduct Ther.* 2011; 6(3): 353-62. IF: 0,500
14. Shemirani AH, **Nagy B Jr**, Takáts AT, Zsóri KS, András C, Kappelmayer J, Csiki Z. Increased mean platelet volume in primary Raynaud's phenomenon. *Platelets.* 2012; 23(4): 312-6. IF: 2,240
15. **Nagy B Jr**, Debreceni IB, Kappelmayer J. Flow Cytometric Investigation of Classical and Alternative Platelet Activation Markers. *EJIFCC.* 2013; 23(4): 124-34.
16. Nagy V, Kolozsvari B, Balogh Z, Csutak A, Kasza M, **Nagy B Jr**, Kardos L, Berta A, Pfliegler G. Increased level of platelet P-selectin in nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2013; 251(3): 917-22. IF: 2,333
17. Antal-Szalmás P, **Nagy B Jr**, Debreceni IB, Kappelmayer J. Measurement of Soluble Biomarkers by Flow Cytometry. *EJIFCC.* 2013; 23(4): 135-42.
18. Nagy B, Gaspar I, Papp A, Bene Z, **Nagy B Jr**, Voko Z, Balla G. Efficacy of methylprednisolone in children with severe community acquired pneumonia. *Pediatr Pulmonol.* 2013; 48(2): 168-75. IF: 2,297
19. Reményi G, Szász R, Debreceni IB, Szarvas M, Batár P, **Nagy B Jr**, Kappelmayer J, Udvardy M. Comparison of coated-platelet levels in patients with essential thrombocythemia with and without hydroxyurea treatment. *Platelets.* 2013; 24(6): 486-92. IF: 2,627

20. **Nagy B Jr**, Bhattoa HP, Steiber Z, Csobán M, Szilasi M, Méhes G, Müller M, Lázár J, Kappelmayer J, Antal-Szalmás P. Serum human epididymis protein 4 (HE4) as a tumor marker in men with lung cancer. *Clin Chem Lab Med.* 2014; 52(11): 1639-48. IF: 2,707
21. Kappelmayer J, Antal-Szalmás P, **Nagy B Jr**. Human epididymis protein 4 (HE4) in laboratory medicine and an algorithm in renal disorders. *Clin Chim Acta.* 2015; 438: 35-42. IF: 2,799
22. Papp Á, Bene Z, Gáspár I, **Nagy B Jr**, Kádár L, Márialigeti T, Bánfi A, Baktai G, Balla G, Nagy B. Decreased VEGF Level Is Associated with Elevated Ferritin Concentration in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Children with Interstitial Lung Diseases. *Respiration.* 2015; 90(6): 443-50. IF: 2,651
23. Balogh E, Tolnai E, **Nagy B Jr**, Nagy B, Balla G, Balla J, Jeney V. Iron overload inhibits osteogenic commitment and differentiation of mesenchymal stem cells via the induction of ferritin. *Biochim Biophys Acta.* 2016; 1862(9): 1640-9. IF: 5,476
24. Kappelmayer J, **Nagy B Jr**. The Interaction of Selectins and PSGL-1 as a Key Component in Thrombus Formation and Cancer Progression. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 6138145. IF: 2,583
25. Kasza M, Meleg J, Vardai J, **Nagy B Jr**, Szalai E, Damjanovich J, Csutak A, Ujhelyi B, Nagy V. Plasma E-selectin levels can play a role in the development of diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2017; 255(1): 25-30. IF: 2,249
26. Andrikovics H, Meggyesi N, Kajtár B, **ifj. Nagy B**, László Z, Bors A, Antal-Szalmás P, Kövy P, Kiss R, Gángó A, Vida L, Lacza Á, Kereskai L, White H, Cross NCP, Müller MC, Hochhaus A, Bödör C, MHTT Onkohematológiai Molekuláris Diagnosztikai Munkacsoport. A mély molekuláris válasz jelentősége krónikus myeloid leukaemiában – beszámoló a BCR-ABL1-monitorozás hazai standardizációs előrelépéseiről. *Hemat Transzf.* 2017; 50(Suppl.2): 3–14.
27. Kerényi A, Beke Debreceni I, Oláh Z, Ilonczai P, Bereczky Z, **Nagy B Jr**, Muszbek L, Kappelmayer J. Evaluation of flow cytometric HIT assays in relation to an IgG-Specific immunoassay and clinical outcome. *Cytometry B Clin Cytom.* 2017; 92(5): 389-97. IF: 2,757
28. **Nagy B Jr**, Nagy B, Kappelmayer J, Balogh I. A humán epididymis protein 4 vizsgálatának labor diagnosztikai jelentősége cystás fibrosisban: kezdeti eredmények. *Mucovis Hung.* 2017; 3(1): 99-105.

29. Csongrádi É, Káplár M, **Nagy B Jr**, Koch CA, Juhász A, Bajnok L, Varga Z, Seres I, Karányi Z, Magyar MT, Oláh L, Facskó A, Kappelmayer J, Paragh G. Adipokines as atherothrombotic risk factors in obese subjects: Associations with haemostatic markers and common carotid wall thickness. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2017; 27(6): 571-80. IF: 3,318
30. Pál I, Illés Á, **Nagy B**, Szilágyi B, Váróczy L. β -katenin és glutathion-S-transzferáz génpolimorfizmusok vizsgálata myeloma multiplexben. *Hemat Transzfuz.* 2018; 51(2): 77-85.
31. Balogh E, **Nagy B Jr**, Gyetvai Á, Bene Z, Hendrik Z, Jeney V, Nagy P, Papp Á, Balla J, Balla G, Kappelmayer J, Nagy B. Impaired Immunosuppressive Effect of Bronchoalveolar Mesenchymal Stem Cells in Hypersensitivity Pneumonitis: Preliminary Findings. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018; 94(2): 363-8. IF: 2,938
32. Czimmerer Z, Daniel B, Horvath A, Ruckerl D, Nagy G, Kiss M, Peloquin M, Budai MM, Cuaranta-Monroy I, Simandi Z, Steiner L, **Nagy B Jr**, Poliska S, Banko C, Bacso Z, Schulman IG, Sauer S, Deleuze JF, Allen JE, Benko S, Nagy L. The Transcription Factor STAT6 Mediates Direct Repression of Inflammatory Enhancers and Limits Activation of Alternatively Polarized Macrophages. *Immunity.* 2018; 48(1): 75-90.e6. IF: 21,522
33. Molnár Z, Fazakas J, Prinz G, **Nagy B**, Gál J. Konszenzus az IgM-mel dúsitott adjuváns immunglobulin terápia indikációira szeptikus sokkban: az első Pentaglobin Konszenzus Konferencia ajánlásai. *Anaesthesiol Intenziv Ther.* 2018; 48(2): 27-31.
34. Nyakundi BB, Tóth A, Balogh E, **Nagy B**, Erdei J, Ryffel B, Paragh G, Cordero MD, Jeney V. Oxidized hemoglobin forms contribute to NLRP3 inflammasome-driven IL-1 β production upon intravascular hemolysis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019; 1865(2): 464-75. IF: 4,352
35. Gyongyosi A, Szoke K, Fenyvesi F, Fejes Z, Debreceni IB, **Nagy B Jr**, Tosaki A, Lekli I. Inhibited autophagy may contribute to heme toxicity in cardiomyoblast cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019; 511(4): 732-8. IF: 2,985
36. **Nagy B Jr**. Foreword: non-coding RNAs as potential laboratory biomarkers. *EJIFCC.* 2019; 30(2): 110-3.
37. **Nagy B Jr**, Bhattoa HP, Kappelmayer, J. A prosztatatarák laboratóriumi diagnosztikája: honnan hová tartunk? *Magy Onkol.* 2019; 63: 16-25.

38. **ifj. Nagy B**, Gángó A, Rejtő L, Krizsán S, Ujfalusi A, Antal-Szalmás P. A CEBPA-mutációk vizsgálata és prognosztikai jelentőségük akut myeloid leukémiában. *Hemat Transzfuz.* 2019; 52(1): 11-7.
39. Erdei J, Tóth A, Nagy A, Nyakundi BB, Fejes Z, **Nagy B Jr**, Novák L, Bognár L, Balogh E, Paragh G, Kappelmayer J, Bácsi A, Jeney V. The Role of Hemoglobin Oxidation Products in Triggering Inflammatory Response Upon Intraventricular Hemorrhage in Premature Infants. *Front Immunol.* 2020; 11: 228. IF: 7,561
40. Pál I, Szilágyi B, **Nagy B Jr**, Pál T, Hodosi K, Illés Á, Váróczy L. The Impact of Beta-Catenin and glutathione-S-transferase Gene Polymorphisms on the Treatment Results and Survival of Multiple Myeloma Patients. *Pathol Oncol Res.* 2020; 26(3): 1633-38. IF: 3,201
41. Kóder G, Olasz J, Tanyi JL, George E, Tóth L, Antal-Szalmás P, **Nagy B Jr**, Bubán T, András C, Urbancsek H, Laczik M, Csuka O, Damjanovich L, Tanyi M. Identification of Novel Pathogenic Sequence Variants of the Mismatch Repair Genes During Screening for Lynch Syndrome in a Single Centre of Eastern Hungary. *J Gastrointest Cancer.* 2020; 51(3): 1007-15. IF: 0,310
42. Bene Z, Fejes Z, Macek M Jr, Amaral MD, Balogh I, **Nagy B Jr**. Laboratory biomarkers for lung disease severity and progression in cystic fibrosis. *Clin Chim Acta.* 2020; 508: 277-86. IF: 3,786
43. Nyakundi BB, Erdei J, Tóth A, Balogh E, Nagy A, **Nagy B Jr**, Novák L, Bognár L, Paragh G, Kappelmayer J, Jeney V. Formation and Detection of Highly Oxidized Hemoglobin Forms in Biological Fluids during Hemolytic Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2020; 2020: 8929020. IF: 6,543
44. Fejes Z, Erdei J, Pócsi M, Takai J, Jeney V, Nagy A, Varga A, Bácsi A, Bognár L, Novák L, Kappelmayer J, **Nagy B Jr**. Elevated Pro-Inflammatory Cell-Free MicroRNA Levels in Cerebrospinal Fluid of Premature Infants after Intraventricular Hemorrhage. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(18): 6870. IF: 5,924
45. Hircsu I, Gazdag A, Bodor M, Berta E, András M, Kanyári Z, Győry F, Barna S, Bhattoa HP, **Nagy B**, Nagy E, Erdei A. A multiplex endokrin neoplasia-2A szindrómáról egy család kapcsán. *Orv Hetil.* 2020; 161(2): 75-9. IF: 0,540

46. Ghansah H, Debreceni IB, Fejes Z, **Nagy B Jr**, Kappelmayer J. The Proteasome Inhibitor Bortezomib Induces Apoptosis and Activation in Gel-Filtered Human Platelets. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(16): 8955. IF: 6,208
47. Dzsudzsák E, Sütő R, Pócsi M, Fagyas M, Szentkereszty Z, **Nagy B Jr**. Profiling of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in COVID-19 Disease. *EJIFCC.* 2021; 32(4): 432-41.
48. Fejes Z, Pócsi M, Takai J, Erdei J, Tóth A, Balogh E, Rusznyák Á, Fenyvesi F, Nagy A, Kappelmayer J, Jeney V, **Nagy B Jr**. Preterm Intraventricular Hemorrhage-Induced Inflammatory Response in Human Choroid Plexus Epithelial Cells. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(16): 8648. IF: 6,208
49. Rusznyák Á, Malanga M, Fenyvesi É, Sente L, Váradi J, Bácskay I, Vecsernyés M, Vasvári G, Haimhoffer Á, Fehér P, Ujhelyi Z, **Nagy B Jr**, Fejes Z, Fenyvesi F. Investigation of the Cellular Effects of Beta- Cyclodextrin Derivatives on Caco-2 Intestinal Epithelial Cells. *Pharmaceutics.* 2021; 13(2): 157. IF: 6,525
50. **Nagy B Jr**, Fejes Z, Szentkereszty Z, Sütő R, Várkonyi I, Ajzner É, Kappelmayer J, Papp Z, Tóth A, Fagyas M. A dramatic rise in serum ACE2 activity in a critically ill COVID-19 patient. *Int J Infect Dis.* 2021; 103: 412-14. IF: 12,074
51. Ivanovics B, Gazsi G, Reining M, Berta I, Poliska S, Toth M, Domokos A, **Nagy B Jr**, Staszny A, Cserhati M, Csosz E, Bacsi A, Csenki-Bakos Z, Acs A, Urbanyi B, Czimmerer Z. Embryonic exposure to low concentrations of aflatoxin B1 triggers global transcriptomic changes, defective yolk lipid mobilization, abnormal gastrointestinal tract development and inflammation in zebrafish. *J Hazard Mater.* 2021; 416: 125788. IF: 14,224
52. Fagyas M, Fejes Z, Sütő R, Nagy Z, Székely B, Pócsi M, Ivády G, Bíró E, Bekő G, Nagy A, Kerekes G, Szentkereszty Z, Papp Z, Tóth A, Kappelmayer J, **Nagy B Jr**. Circulating ACE2 activity predicts mortality and disease severity in hospitalized COVID-19 patients. *Int J Infect Dis.* 2022; 115: 8-16. IF: 8,400
53. Nagy PF, Pócsi M, Fejes Z, Bidiga L, Szabó E, Balogh O, Szöllősi GJ, **Nagy B Jr**, Nemes B. Investigation of Circulating MicroRNA Levels in Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation. *Transplant Proc.* 2022; 54(9): 2570-7. IF: 0,900

54. Fagyas M, **Nagy B Jr**, Ráduly AP, Mányiné IS, Mártha L, Erdősi G, Sipka S Jr, Enyedi E, Szabó AÁ, Pólik Z, Kappelmayer J, Papp Z, Borbély A, Szabó T, Balla J, Balla G, Bai P, Bácsi A, Tóth A. The majority of severe COVID-19 patients develop anti-cardiac autoantibodies. *Geroscience*. 2022; 44(5): 2347-60. IF: 5,600
55. Feher A, Pócsi M, Papp F, Szanto TG, Csoti A, Fejes Z, **Nagy B Jr**, Nemes B, Varga Z. Functional Voltage-Gated Sodium Channels Are Present in the Human B Cell Membrane. *Cells*. 2022; 11(7): 1225. IF: 6,000
56. **Nagy B Jr**. Foreword: Current Laboratory Aspects of COVID-19. *EJIFCC*. 2022; 33(2): 75-8.
57. Illési Á, Debreceni IB, Fejes Z, **Nagy B Jr**, Hodosi K, Kappelmayer J, Csanádi Z, Szük TI. Effect of invasive therapeutic coronary interventions on endothelial cell activation and thrombin generation in patients with chronic total coronary occlusion. *Thromb Res*. 2022; 217: 64-72. IF: 7,500
58. Bereczki D, **Nagy B**, Kerényi A, Nagy G, Szarka K, Kristóf K, Szalay B, Vásárhelyi B, Bhattoa HP, Kappelmayer J. EDTA-Induced Pseudothrombocytopenia up to 9 Months after Initial COVID-19 Infection Associated with Persistent Anti-SARS-CoV-2 IgM/IgG Seropositivity. *Lab Med*. 2022; 53(2): 206-9. IF: 1,300
59. Magyarai F, Pinczés LI, Páyer E, Farkas K, Ujfalusi S, Diószegi Á, Sik M, Simon Z, Nagy G, Hevessy Z, **Nagy B Jr**, Illés Á. Early administration of remdesivir plus convalescent plasma therapy is effective to treat COVID-19 pneumonia in B-cell depleted patients with hematological malignancies. *Ann Hematol*. 2022; 101(10): 2337-45. IF: 3,500
60. Tóth A, Csiki DM, **Nagy B Jr**, Balogh E, Lente G, Ababneh H, Szöőr Á, Jeney V. Daprodustat Accelerates High Phosphate-Induced Calcification Through the Activation of HIF-1 Signaling. *Front Pharmacol*. 2022; 13: 798053. IF: 5,600
61. Müller J, Szűcs-Farkas D, Szegedi I, Csóka M, Garami M, Tizslavicz LG, Hauser P, Kriván G, Csanádi K, Ottóffy G, **Nagy B Jr**, Kiss C, Kovács G. Clinical Course of COVID-19 Disease in Children Treated With Neoplastic Diseases in Hungary. *Pathol Oncol Res*. 2022; 28: 1610261. IF: 2,800
62. Husi K, Pinczés LI, Fejes Z, **Nagy B Jr**, Illés Á, Miltényi Z. Combined prognostic role of TARC and interim 18F-FDG PET/CT in patients with Hodgkin lymphoma-real world observational study. *Hell J Nucl Med*. 2022; 25(2): 125-31. IF: 1,500

63. **Nagy B**, Csoma E, Kappelmayer J. A SARS-COV-2 szerológiai tesztjei: a humorális immunválasz vizsgálata különféle laboratóriumi módszerekkel. *Metabolizmus*. 2022; 20(5): 254-62.
64. Király J, Szabó E, Fodor P, Fejes Z, **Nagy B Jr**, Juhász É, Vass A, Choudhury M, Kónya G, Halmos G, Szabó Z. Shikonin Causes an Apoptotic Effect on Human Kidney Cancer Cells through Ras/MAPK and PI3K/AKT Pathways. *Molecules*. 2023; 28(18): 6725. IF: 4,600
65. Szuromi L, Hajas O, Nagy-Baló E, Forgács I, Nagy L, Fagyas M, Tóth A, **Nagy B Jr**, Kappelmayer J, Csanádi Z. Long-Term Changes in the Biomarkers of Left Atrial Fibrosis after Pulmonary Vein Isolation for Paroxysmal and Persistent Atrial Fibrillation. *Rev Cardiovasc Med*. 2023; 24(6): 171. IF: 2,700
66. Csiki DM, Ababneh H, Tóth A, Lente G, Szöőr Á, Tóth A, Fillér C, Juhász T, **Nagy B Jr**, Balogh E, Jeney V. Hypoxia-inducible factor activation promotes osteogenic transition of valve interstitial cells and accelerates aortic valve calcification in a mice model of chronic kidney disease. *Front Cardiovasc Med*. 2023; 10: 1168339. IF: 3,600
67. Rákóczi É, Magócs G, Kovács S, **Nagy B Jr**, Szűcs G, Szekanez Z. Evaluation of the Efficacy of BBIBP-CorV Inactivated Vaccine Combined with BNT62b2 mRNA Booster Vaccine. *Diagnostics (Basel)*. 2023; 13(3): 556. IF: 3,600
68. Csoma E, Nagy Koroknai Á, Sütő R, Szakács Szilágyi E, Pócsi M, Nagy A, Bíró K, Kappelmayer J, **Nagy B Jr**. Evaluation of the Diagnostic Performance of Two Automated SARS-CoV-2 Neutralization Immunoassays following Two Doses of mRNA, Adenoviral Vector, and Inactivated Whole-Virus Vaccinations in COVID-19 Naïve Subjects. *Microorganisms*. 2023; 11(5): 1187. IF: 4,500
69. Bartha-Tatár A, Kappelmayer J, **Nagy B Jr**. A klasszikus szérumtumormarkerek helye a felnőttkori daganatok kivizsgálásában és a terápia monitorizálásában. *Magy Onkol*. 2023; 67(2): 116-23.
70. Tóth E, Fagyas M, **Nagy B Jr**, Siket IM, Szóke B, Mártha L, Mahdi M, Erdősi G, Pólik Z, Kappelmayer J, Papp Z, Borbély A, Szabó T, Balla J, Balla G, Bácsi A, Szekanez Z, Bai P, Tóth A. Distinct subsets of anti-pulmonary autoantibodies correlate with disease severity and survival in severe COVID-19 patients. *Geroscience*. 2023 Sep 1. doi: 10.1007/s11357-023-00887-2. Online ahead of print. IF: 5,600

71. Király J, Szabó E, Fodor P, Fejes Z, **Nagy B Jr**, Juhász É, Vass A, Choudhury M, Kónya G, Halmos G, Szabó Z. Shikonin Causes an Apoptotic Effect on Human Kidney Cancer Cells through Ras/MAPK and PI3K/AKT Pathways. *Molecules*. 2023; 28: 6725. IF: 4,600

72. Illési Á, Fejes Z, Pócsi M, Debreceni IB, Hodosi K, **Nagy B Jr**, Kappelmayer J, Kőszegi Z, Csanádi Z, Szük T. Technically Challenging Percutaneous Interventions of Chronic Total Occlusions Are Associated with Enhanced Platelet Activation. *J Clin Med*. 2023; 12: 6829. IF: 3,900

73. Stercel V, Lóczi L, Kadenczki O, Nemes É, **Nagy B Jr**, Hodossy-Takács R, Szabó AÁ, Fagyas M, Kappelmayer J, Szabó T, Bagoly Z. Effect of anti-SARS-CoV-2 BNT162b2 mRNA vaccination on thrombin generation in children with inflammatory bowel disease. *Front Immunol*. 2023; 14: 1257072. IF: 7,300

10 FELSŐOKTATÁSI TANKÖNYVRÉSZEK

1. **Nagy Béla**: A liquor cerebrospinalis és egyéb testfolyadékok laboratóriumi diagnosztikája. In: Kappelmayer János (szerk.) Laboratóriumi diagnosztikai gyakorlatok. Debrecen, 2016: pp. 203-210.

2. Hevessy Zsuzsanna, **Nagy Béla**: Malignus hematológiai kórképek diagnosztikája. In: Kappelmayer János (szerk.) Laboratóriumi diagnosztikai gyakorlatok. Debrecen, 2016: pp. 47-57.

3. **Nagy Béla**: Laboratory investigation of cerebrospinal fluid and other body fluids. In: Kappelmayer János (Ed.) Practicals in laboratory medicine. Debrecen, 2016: pp. 203-210.

4. Hevessy Zsuzsanna, **Nagy Béla**: Diagnostics of malignant hematological disorders. In: Kappelmayer János (Ed.) Practicals in laboratory medicine. Debrecen, 2016: pp. 47-58.

11 OKTATÁSI JEGYZET

Nagy Béla: Liquor vizsgálatok. In: V. Oláh Anna (szerk.) Klinikai kémia II. Összefoglaló laboratóriumi analitikusok és klinikai biokémikusok számára. Debrecen, 2020: pp. 47-57.

12 TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

Nagy Béla (laboratóriumi medicina) tudományos és oktatói munkásságának összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztálya (2023.12.11)

Tudományos közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratcikk²	86			
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű		57	957	1105
szakcikk hazai idegen nyelvű		0	0	0
szakcikk magyar nyelvű		6	0	0
szakcikk sokszerzős, érdemi szerzőként ³		1	0	0
összefoglaló közlemény		13	223	242
rövid közlemény		9	109	126
II. Könyvek	0			
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv		0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0			
idegen nyelvű		0		
magyar nyelvű		0		
bb) Felsőoktatási tankönyv		0		
III. Könyvrészlet	4			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet		4	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	0		0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)		4	0	0
Tudományos közlemények összesen (I.-IV)		86	1289	1473
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV)	90		1289	1473
V. További tudományos művek	4			
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikket is		1	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		3	0	0
Oltalmak (szabadalmak)		0	0	0
VI. Hivatkozott absztraktok⁵	0		0	0
Összes hivatkozás¹			1289	1473
Hirsch index⁶	23			
g index⁶	37			

Speciális tudományometriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	18	416
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	21	370
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2010) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	73	1168
Az utolsó 10 év (2013-) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	67	969
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	150	10,18%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben		41 + 0
Jelentés, guideline	1	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0