



## Válasz Dr. Prohászka Zoltán opponensi véleményére

Nagyon köszönöm Prohászka Zoltán Professor úrnak, hogy doktori értekezésemet részletesen áttanulmányozta, hálásan köszönöm elismerő szavait és segítő észrevételeit. Megjegyzéseire, kérdéseire az alábbiakban szeretnék válaszolni:

**1) A doktori mű nem tartalmazza azokat a cikkeket, amelyek eredményeire közvetlenül épül, az eredmények szakaszban nem találtam utalást az eredeti munkákra, így nem volt világosan összekapcsolható az értekezés a cikkel.**

1) Őszintén szólva nem találtam egyértelmű ajánlást ezekre vonatkozólag, hogy a disszertáció alapját képező cikkeket - hasonlóan egy PhD dolgozatba - be kell-e illeszteni, ami az egyébként kissé hosszúra sikerült disszertációm méretét tovább növelte volna. Nem szerettem volna a nagyszámú referencia közé besorolni a saját cikkeimet, ezért kerültek külön felsorolásra a 10. fejezetben. Bízom benne, hogy ez érdemben nem befolyásolta a disszertációm tartalmának ellenőrzését és értékelését!

**2) Jelentős miRNS expressziós eltéréseket észleltek a miR-223, a 26b, a 140 és a 126 expressziója magasabb volt a kontrollok keringő vérlemezkéiben, mint a DM2 csoportban, azonban az obez-nem DM csoportban még az egészséges kontrollnál is magasabb expressziót észleltek (23. ábra). A keringő miRNS expresszióval kapcsolatban diabetesben hasonló, míg obezitásban eltérő eredményeket találtak (24. ábra). Mit gondol, technikai oka lehetett-e ennek az eltérésnek (thrombocytá vs. keringő miRNS)?**

2) A 2-es típusú diabetes mellitus (DM2) betegek vérlemezke miRNS expressziójának vizsgálatakor úgy gondoltuk, hogy a normál kontrollok mellett szükséges egy másik olyan kontroll csoport is, amelyben a betegek még nem hiperglikémiások, de már egyéb metabolikus eltéréseket mutatnak. Célunk az volt; hogy a diabeteses thrombocyták miRNS eredményeit hozzájuk is hasonlítsuk. DM2-ben az irodalmi adatok alapján kiválasztott 4 fontos vérlemezke miRNS intracelluláris expressziója szignifikánsan alacsonyabbnak igazolódott nemcsak az egészséges kontrollok, hanem az obez kontrollokkal szemben is. Ugyanakkor, ha a két kontroll kohorsz eredményeit egymással hasonlítottuk össze, akkor valóban kitűnt, hogy obezekben ezen celluláris miRNS expressziók szintje inkább magasabb volt, mint a normál kontrolloké.



Erre pontos magyarázatot egyelőre nem tudok adni, feltételezzük, hogy az obez személyekben a hiperglikémia hiányában még nem következett be a Dicer1 enzim aktivitás csökkenése, ami kihat a miRNS-ek érési folyamatára. Elképzelhető az is, hogy egyfajta kompenzációként a még nem diabeteses vérlemezkékben megnő bizonyos miRNS-ek szintje, hogy kivédjék vagy legalább is lassítsák a thrombocyta aktivációs állapotának változását. Obez, de nem diabeteses betegek thrombocyta miRNS profilja az irodalomból továbbra sem ismert, ami alátámaszthatná ezen eredményeinket.

Mivel az extracelluláris miRNS-ek többsége a vérlemezkékből szabadul ki, ezért megvizsgáltuk párhuzamosan, hogy vajon miként változik a miR-223, miR-26b, miR-140 és miR-126 szintje a diabeteses plazma mintákban, mint újfajta biomarkerek a vérlemezke funkció megítélésére. Azt tapasztaltuk, hogy a keringő miRNS-ek szintje is jelentősen csökkent DM2-ben szemben az egészséges kontrollokkal, ami az intracelluláris formának megfelelő, párhuzamos változás. Ezen eltérések összhangban állnak mások DM2-ben megfigyelt korábbi eredményeivel, amik egyúttal jól korreláltak a gyulladás és az atherosclerosis súlyosságával (Zampetaki A, et al. *Circ Res.* 2010;107:810-7.). Ezzel szemben a diabeteses és az obez csoport között, valamint a kontrollok között sem volt jelentős különbség a legtöbb általunk vizsgált plazma miRNS szintben. Mindez nem technikai hibára, hanem inkább arra utal, hogy a diabeteses thrombocytaiban jelentősen lecsökkent expressziójú miRNS-ekből csak kevés jut ki a keringésbe, így ezek a keringő markerek a már kialakult diabetesben tudnak kellő érzékenységet mutatni a kóros vérlemezke aktiváció detektálására, míg obezitasban nem. Diagnosztikus értéke más keringő miRNS-eknek viszont lehet: a szérumban miR-138, miR-376a és miR-15b hatékonyan különítette el az obez (még nem diabeteses) betegeket a már definitív diabeteses betegektől (Pescador N, et al. *PLoS One.* 2013;8(10):e77251.). A máj eredetű és a lipid homeosztázist is szabályozó miR-122 keringő formájának vizsgálata során Willeit és munkatársai azt tapasztalták, hogy a miRNS expressziója jelentősen emelkedett volt obezitasban, ami a betegek követése során szoros összefüggést mutatott a metabolikus szindróma (OR: 1,6; P<0,001) és a DM2 (OR: 1,37; P=0,021) kialakulásának fokozott valószínűségével. Ráadásul egérmodellben azt is igazolták, hogy a 12 hónapos atorvastatin kezelés jelentősen csökkentette a miR-122 szérumban szintjét (Willeit P, et al. *Diabetes.* 2017;66(2):347-57.). Olyan vizsgálatról viszont nincs tudomásom, amelyben a keringő



miRNS-eket a thrombocytá aktiváció mértékének összehasonlítására használták volna obese betegek és cukorbetegyek között.

### **3) Milyen technikai kontrollokat és milyen minőségbiztosítást alkalmaztak az RNS integritásával kapcsolatban, az RNS extrakció előtt?**

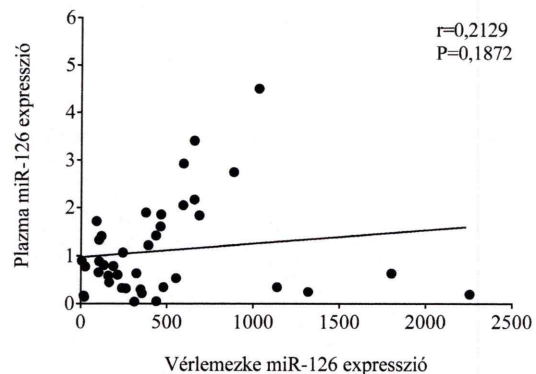
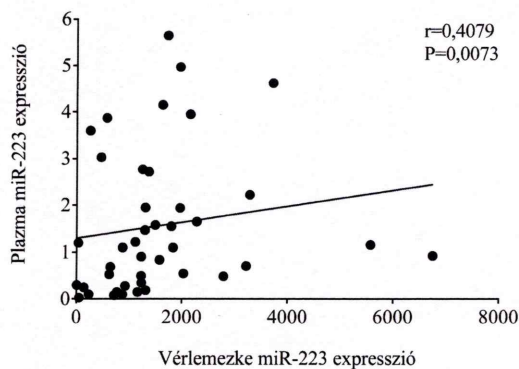
3) Valóban létezik néhány olyan fontos preanalitikai körülmény, amit figyelembe kell venni akár a thrombocytá, akár a keringő miRNS-ek analízise előtt. A betegektől levett és átlagosan 30 percen belül a laboratóriumba érkezett vérmintákat (amiket nem eljáró vagy csőposta szállította, hanem a klinikussal egyeztetve személyesen hoztuk el) gyakorlatilag azonnal elkezdtük feldolgozni annak érdekében, hogy megakadályozzuk az arteficiális vérlemezke aktiváció kialakulását, ami az intracelluláris és a plazma miRNS-ek szintjét is befolyásolta volna. Kerültük a fagyasztott plazma minták többszöri kiolvasztását az RNS analízis előtt annak ellenére, hogy a miRNS-ek relatíve stabil molekulák. Plazma mintát használtunk a szérummal szemben, mivel az *in vitro* lejátszódó véralvadás és a következményes sejtkárosodás további miRNS-ek kijutását vonhatja magával. Kerültük a heparinnal „szennyezett” minták feldolgozását, mivel a heparin egyrészt interferálhat a RT-qPCR mérésekkel, másrészt maga is fokozhatja a thrombocytá eredetű vezikulák felszabadulását és így kihathat a keringő miRNS expressziókra. A thrombocytá és plazma minták előkészítési körülményeit korábbi közleményekben validált módszerek segítségével végeztük (Zampetaki A, et al. *Circ Res.* 2010;107(6):810-7., Duan X, et al. *J Diabetes Complications.* 2014;28:705-10.), ezért további előzetes tesztelést az RNS integritásának ellenőrzésére nem végeztünk. Ami a vizsgálatok beállításánál kezdetben nehézséget okozott, az a thrombocyták potenciális kontaminációja a leukocytákkal, ami jelentősen befolyásolhatta volna az RNS minták összetételét és a miRNS expressziós végeredményeket. Ennek érdekében CD45-ellenes antitestet hordozó mágneses gyöngyöket (Dynabeads®) alkalmaztunk a fehérvérsejtek hatékony eltávolítása érdekében. Több előkísérlet során a vérlemezke minták tisztaságának ellenőrzése áramlási citometriai és RT-qPCR mérésekkel történt, és a mágneses szeparálással tisztított mintákban kevesebb, mint 1 fehérvérsejtet detektáltunk 1 millió thrombocytára vonatkoztatva. Ezzel párhuzamosan a fehérvérsejt depletált vérlemezkekben a CD45 mRNS nem volt detektálható (a cycle threshold értékek 35 felettiak voltak), mely alapján fehérvérsejt mentes vérlemezkeket sikerült kinyernünk, amelyek alkalmasak voltak a miRNS expressziók meghatározására. Izolálási



módszerünk megbízhatóságát transzkriptomikai vérelemzke vizsgálatokhoz megerősítette az a közelmúltban befejeződött nemzetközi tanulmány, amelyben a mi munkacsoportunk is részt vett, mint az egyik közreműködő centrum (Banerjee M, et al. *J Thromb Haemost.* 2024 Jul 3:S1538-7836(24)00376-3., Online ahead of print). Az előkészített vérelemzke és plazma mintákból az RNS tisztításhoz a TRI reagens gyártói ajánlásainak megfelelően totál RNS-t izoláltunk. Az RNS tisztaságát és koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométerrel, valamint RNS-szekvenálás előtt (szepszis-study) Agilent BioAnalyzer segítségével ellenőriztük és a könyvtárkészítéshez a >7 RIN értékű mintákat használtuk, ami lehetővé tette a minták megfelelő feldolgozhatóságát.

#### 4) Nem találtam elemzést arra vonatkozóan, hogy a thrombocyta és a keringő miR szintek milyen kapcsolatban voltak egymással a különböző csoportokban/betegekben?

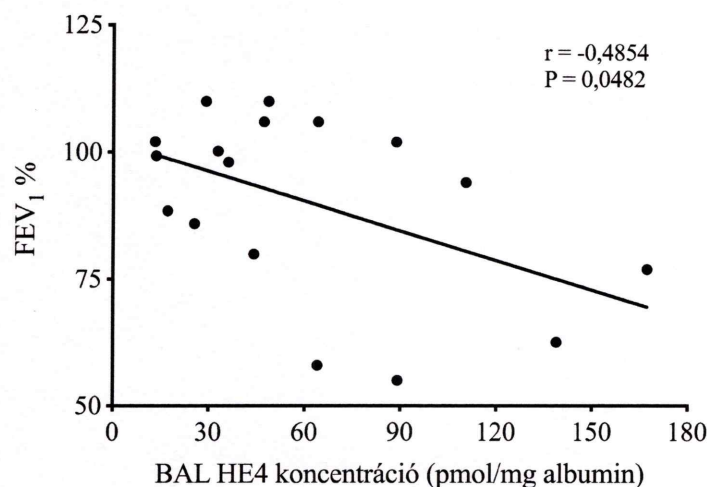
4) A közlemény megírásakor külön nem vizsgáltuk, hogy állt-e fent bármi összefüggés az egyes vérelemzke és plazma miRNS szintek között. A kérdés kellő megválaszolása érdekében utólagosan elvégeztük ezeket a korrelációs analíziseket Spearman teszttel, mely szerint a legerősebb kapcsolatot a miR-223 thrombocyta és plazma szintek között tapasztaltuk, de hasonló, bár statisztikailag nem szignifikáns tendenciát láttunk a miR-126 és a miR-26b ( $r=0,2152$ ,  $p=0,1711$ ) esetén is.



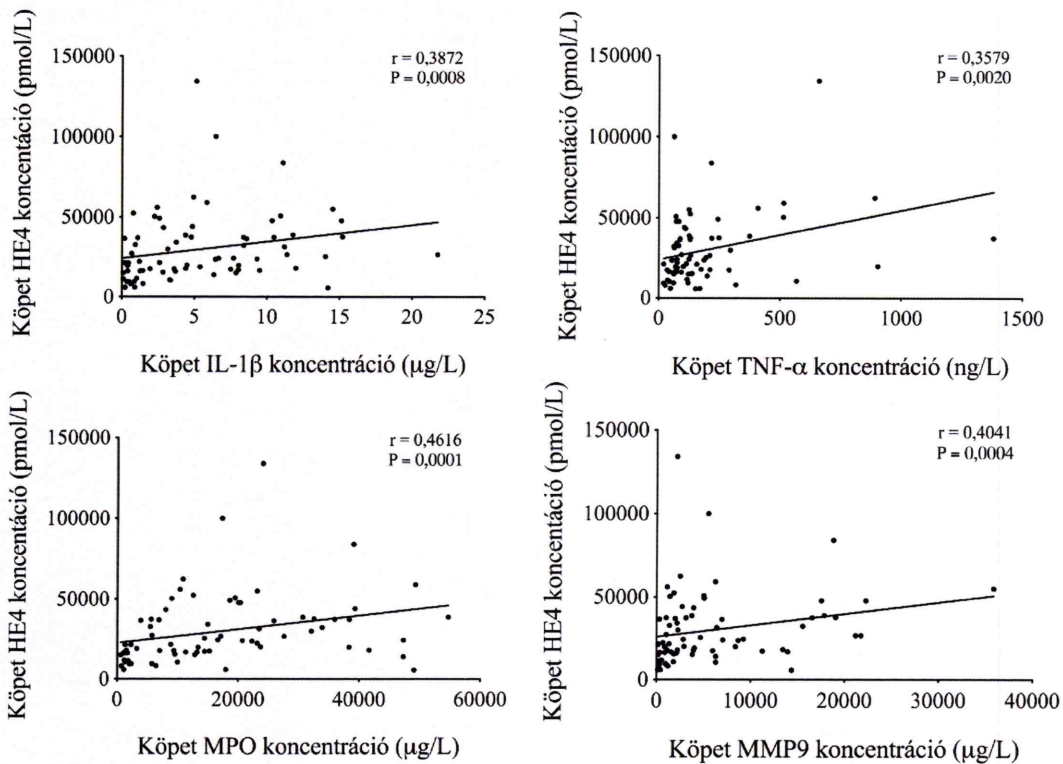


**5) Vajon milyen mértékben felelősek a tüdő epithelsejtek a keringő HE4 (mint biomarker) szintjéért? Vagyis feltételezve, hogy a CFTR-csatorna diszfunkció számos más szervet/sejtet is érint, az azonosított szabályozási mechanizmusok vajon mennyire univerzálisak, és működhetnek-e más sejttípusokban is? Van ismert irodalmi adat esetleg ennek alátámasztására?**

5) Jelen tudásunk szerint a tüdő légúti epithelsejtjei tekinthetők a CF-re jellemző kóros HE4 expresszió legfontosabb forrásának, mivel minél rosszabb egy beteg légzésfunkciója, valamint az intrapulmonális gyulladás mértéke, annál magasabb HE4 koncentrációk mérhetők a vérben. Mindezt alátámasztják azok az eddig még nem közölt adataink is, mely szerint a CF-es betegekből nyert bronchoalveoláris lavage (BAL) mintákban is a HE4 értékek (albuminra normálva) jól korreláltak a betegek FEV<sub>1</sub> %-os értékeivel.



Ezen túlmenően a HE4 fehérje a CF-es köpetmintákban - a szérum/plazma mintákhoz képest - extrém mennyiségben mérhető, mely szoros összefüggést mutatott más gyulladásos paraméterekkel.



A CFTR-csatorna a tüdő epithelsejtjein kívül a szervezet más szöveteiben is expresszálódik, így a verejtékmirigyekben, a hasnyálmirigyben és az ondóvezetékben. A HE4 vagy másnéven a *WFDC2* génről expresszálódó fehérje a Humán Protein Atlasz alapján a tüdőn kívül a pancreasban, emlőben, prosztatában, (mellék)herében és a vesében termelődik különböző mértékben. Tekintettel arra, hogy CF-ben a tüdőn kívül a hasnyálmirigy exokrin (és endokrin) funkciói károsodhatnak, ezért valóban felmerül annak lehetősége, hogy a pancreas eredetű HE4 is hozzájárulhat a keringésben mérhető magasabb fehérje koncentrációhoz. Bár az egyik vizsgáltunkban a hasnyálmirigyelgtelen CF-es betegekben a HE4 szérumkoncentrációk szignifikánsan magasabbak voltak, mint az egészséges pancreas funkcióval bíró betegekben (122,2 [84,1-149,6] pmol/L vs. 96,8 [73,8-108,8] pmol/L;  $P=0,037$ ) hasonló légzésfunkció mellett, mégis direkt *in vitro* evidenciánk jelenleg nincs arra vonatkozólag, hogy a CFTR-csatorna diszfunkció a hasnyálmirigy ductális sejtjeiben mennyivel járulhat hozzá a CF-es vérmintákban mérhető magasabb HE4 szintekhez.



**DEBRECENI  
EGYETEM**

ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR  
Laboratóriumi Medicina Intézet  
H-4032 Debrecen, Nagyerdei krt. 94.  
Tel: 52/340-006, Fax:52/417-631

---

Végezetül még egyszer nagyon köszönöm Professzor úr munkáját, elismerő véleményét és támogatását, továbbá tisztelettel szeretném kérni válaszaim szíves elfogadását.

Debrecen, 2024. szeptember 10.

Dr. Nagy Béla