

nagyb80_156_23

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**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

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1	BEVEZETÉS, TÉMAVÁLASZTÁS	9
2	ELŐZMÉNYEK, IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
2.1	A vérlemezke aktiváció (pato)fiziológiai jelentősége.....	10
2.2	A thrombocyta aktiválódás intracelluláris mechanizmusának főbb lépései....	13
2.3	Kóros vérlemezke aktiváció kialakulása metabolikus kórképekben.....	17
2.4	Szepszishez társuló fokozott thrombocyta funkció	20
2.5	TLR4 receptoron keresztül bekövetkező NF- κ B-útvonala aktiválódás.....	23
2.6	A vérlemezkek RNS tartalma és translációs képessége	24
2.7	A miRNS-ek szintézise és funkciói	27
2.8	Thrombocyta aktivációval összefüggésbe hozott miRNS-ek és cél mRNS-ek ..	29
2.9	Vezikulákban történő miRNS transzfer és funkcionális hatásai	31
2.10	Vérlemezke miRNS expresszió változások diabetesben és szepszisben.....	33
2.11	Endothelsejt károsodás kialakulása és szabályozása szepszisben.....	34
2.12	Koronária sztentelést követő endothelsejt diszfunkció és klinikai következményei.....	36
2.13	Gyógyszeres koronárisztent hatásmechanizmusa a beavatkozás indukálta endothelsejt aktiváció mérséklésében.....	38
2.14	Krónikus légúti gyulladás által kiváltott bronchiális epithelsejt diszfunkció cisztás fibrózisban	40
2.15	Új biomarkerek tesztelése CFTR moduláló kezelésben részesülő cisztás fibrózisos betegekben	43
3	CÉLKITŰZÉSEK	46
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	50
4.1	Betegek és kontrollok beválogatása	50

4.2	Egérmodellek	52
4.3	Mosott thrombocyta izolálása humán és egér vérmintákból	53
4.4	Vérlemezke aggregáció és δ -granulum szekréció vizsgálat	53
4.5	Humán thrombocyta minták <i>in vitro</i> aktiválása különböző agonistákkal	54
4.6	Trombózis <i>in vivo</i> vizsgálata egérmodellben	54
4.7	Immunprecipitáció	55
4.8	Western blot.....	55
4.9	Vérlemezke-eredetű mikropartikulák izolálása	56
4.10	Áramlási citometriai vizsgálatok	56
4.11	Fehérvérsejt-depletált thrombocyta előkészítése és minőségi ellenőrzése	57
4.12	Különböző sejtvonalak tenyésztése, differenciálódása és kezelése	57
4.13	ELISA mérések.....	60
4.14	RNS izolálás	60
4.15	TaqMan OpenArray	61
4.16	Intracelluláris és keringő miRNS expressziók analízise	61
4.17	miRNS mimic és inhibitor transzfektálás sejt kultúrákba	62
4.18	mRNS, pre-miRNS és enhanszer RNS expressziók mérése RT-qPCR-rel	63
4.19	RNS szekvenálás és a szekvenálási adatok elemzése.....	64
4.20	siRNS transzfektálás sejt kultúrákba	65
4.21	Humán minták Thr715Pro P-selectin genotípus analízise	65
4.22	Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok	66
4.23	Patch-clamp technika.....	68
4.24	Rutin körülmények között meghatározott laboratóriumi paraméterek.....	69
4.25	Statisztikai számítások.....	69
4.26	Etikai engedélyek.....	70
4.27	Finanszírozás, pályázatok.....	70

5	EREDMÉNYEK.....	72
5.1	A PKCθ szerepe a thrombocyta aktiváció lezajlásában	72
5.1.1	<i>A PAR és GPVI receptor agonisták által indukált PKCθ foszforiláció, valamint kóros vérlemezke aggregáció, αIIBβ3 integrin aktiváció, α- illetve δ-granulum szekréció a PKCθ hiányában</i>	72
5.1.2	<i>A PKCθ funkciója a szekréció és a TXA$_2$ szintézis regulációjában a Syntaxin-4 és az ERK foszforiláción keresztül</i>	76
5.1.3	<i>A thrombocyta PKCθ hiányának hatása az in vivo vérrögképződésre</i>	78
5.2	A P2Y12 és a P-selectin receptor expresszió miRNS-ek által történő modulálása diabeteses vérlemezkekben.....	79
5.2.1	<i>A vérlemezke aktiváltsági állapot és a miR-223, miR-26b és miR-140 expresszió közötti összefüggés vizsgálata DM2 thrombocytákban összehasonlítva obesez és egészséges kontroll mintákkal</i>	80
5.2.2	<i>A diabeteses csontvelői körülmények modellezése kétféle megakaryocyta sejtvonalon, és a hiperglikémia közvetlen hatásának vizsgálata a thrombocyta és megakaryocyta miRNS és cél (P2RY12 és SELP) mRNS expresszióra.....</i>	85
5.2.3	<i>A miR-26b és a miR-140, valamint a SELP mRNS közötti funkcionális kapcsolat igazolása, illetve a csökkent Dicer1 funkció ellenőrzése a megváltozott miRNS szintek kialakulásában</i>	90
5.3	Emelkedő thrombocyta aktiválódási szint értékelése obezításban és a P2Y12 receptor által mediált szignálút vonal ebben betöltött szerepének vizsgálata.....	93
5.3.1	<i>Vérlemezke aktiváció specifikus biomarkerek korrelálása a carotis intima-media vastagsággal és egyéb korai atherosclerosis rizikófaktorokkal obesez betegekben. 93</i>	
5.3.2	<i>Thrombocyta funkciós vizsgálatok normál és magas zsirtartalmú diétán tartott LDL-receptor hiányos és vad típusú egerekben.....</i>	99
5.3.3	<i>A P2Y12 receptor mediált út vonal szerepének vizsgálata a kóros vérlemezke reaktivitásban, illetve a thrombocyta ERK és Akt foszforiláció változása különböző súlyosságú hiperkoleszterinémiás egerekben.....</i>	102
5.4	A megakaryocyta-thrombocyta eredetű miRNS-ek szerepe a kóros vérlemezke funkció kialakulásában és a túlzott mértékű endothelsejt aktiváció modulálása szepszisben	106
5.4.1	<i>Különböző típusú LPS-ek direkt thrombocyta aktiváló hatásának vizsgálata in vitro, valamint szeptikus betegek vérlemezke miRNS profiljának és a miR-26b expressziójának további analízise a betegség lefolyásának függvényében.....</i>	106
5.4.2	<i>Génexpressziós vizsgálatok LPS-stimulált megakaryocyta sejtenyészetekben, valamint a Dicer1 enzim fehérjeszintjének detektálása vérlemezkekben és megakaryocytákban szeptikus in vitro körülmények között.....</i>	114

5.4.3	<i>Szepszises plazmamintákból izolált vérlemezke-eredetű mikropartikulák internalizációja endothelsejt kultúrákba és az így bejutott thrombocytá miR-223 hatása az endothelsejt ICAM-1 expresszióra és a leukocytá adhézióra in vitro</i>	119
5.5	A gyógyszeres koronárisztent (DES) és fémsztent (BMS) sejtaktiváló hatásának összehasonlítása, valamint a DES-ből eluáló everolimus kedvező hatásának mechanizmusa az endothelsejt aktiváció tükrében	127
5.5.1	<i>BMS vagy DES kezelésben részesült stabil anginás betegekben meghatározott vérlemezke és endothelsejt aktivációs markerek koncentrációjának és a 6 hónapon belül kialakult ISR-rel való összefüggésük elemzése</i>	128
5.5.2	<i>A koronárisztentelés okozta gyulladós folyamatok modellezése kétféle endothelsejtvonalon, és az E-selectin és a VCAM-1 receptor expresszió kvantálása, valamint az everolimus NF-κB útvonalon keresztüli gyulladáscsökkentő hatásának in vitro vizsgálata</i>	135
5.5.3	<i>A SELE és VCAM1 gének expressziójának transzkripciós szinten való vizsgálata az enhanszer RNS-ek expresszió változásán keresztül, illetve a posztranszkripciós szabályozásáért felelős miR-181b szintjének analízise endothelsejtekben everolimus jelenlétében és hiányában</i>	138
5.6	A szérum/plazma HE4 tesztelése cisztás fibrózisban új diagnosztikai és követéses biomarkerként, valamint a CF-es légúti epithelsejtek fokozott HE4 expressziójának háttérben álló intracelluláris folyamatok vizsgálata	143
5.6.1	<i>A HE4 koncentráció mérése kezelésben nem részesült CF-es betegpopulációkban és különböző kontroll kohorszokban, illetve szérumszintjének korrelációja a tüdőbetegség súlyosságával és egyéb befolyásoló tényezőkkel</i>	143
5.6.2	<i>Kezelés előtti és alatti plazma HE4 szintek mérése CFTR-specifikus ivacaftor, illetve lumacaftor/ivacaftor kezelés alatt álló CF-es betegek klinikai állapotának nyomon követésére a légzés- és vesefunkció figyelembevétele mellett</i>	149
5.6.3	<i>A F508del-CFTR-t, illetve a wt-CFTR-t expresszáló CF-es bronchoepitheliális sejtekben a HE4 expresszió vizsgálata, továbbá a CFTR-csatorna funkciójának és az NF-κB jelátviteli útvonal direkt hatásának igazolása a HE4 expresszióra CF-ben</i>	162
6	MEGBESZÉLÉS	172
6.1	A PKCθ részvétele a thrombocytá aktiváció szabályozásában	172
6.2	A P2Y12 és a P-selectin receptor expresszió miR-223, illetve miR-26b által történő modulálása diabeteses vérlemezkekben	175
6.3	Emelkedő thrombocytá aktiváció obezításban és a P2Y12 receptor által indukált útvonal hozzájárulása hiperkoleszterinémiában	180

6.4	Megváltozott megakaryocita-thrombocyta 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.....	184
6.5	A BMS és DES eltérő sejtaktiváló hatása, valamint a DES-ből felszabaduló everolimus által csökkentett endothelsejt aktiváció szabályozása	194
6.6	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.....	199
7	ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK	208
8	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	210
9	REFERENCIÁK	212
10	AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	255
11	AZ ÉRTEKEZÉSBEN NEM TÁRGYALT KÖZLEMÉNYEK.....	258
12	FELSŐOKTATÁSI TANKÖNYVRÉSZEK	268
13	OKTATÁSI JEGYZET	268
14	TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK	269

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AC	-	adenilát-cikláz
ADAM9	-	diszintegrin és metalloproteináz 9
ADP	-	adenozin-difoszfát
AMI	-	akut miokardiális infarktus
BALF	-	bronchoalveoláris mosófolyadék
BMI	-	body mass index
BMS	-	bare metal stent/fémszent
BSA	-	bovine serum albumin/marhaszérum albumin
cAMP	-	ciklikus adenozin-monofoszfát
CD40L	-	CD40 ligand
CF	-	cisztás fibrózis
CLEC2	-	C-típusú lektinszerű receptor 2
COX1	-	ciklooxigenáz 1
cPLA ₂	-	citoszolikus foszfolipáz A ₂
CRP	-	C-reaktív protein
CRP	-	kollagénszerű peptid
DAG	-	diacilglicerol
DAMP	-	sérülés-asszociált molekuláris mintázat
DES	-	drug eluting stent/gyógyszert eluáló sztent
DIC	-	disszeminált intravaszkuláris koaguláció
DM2	-	2-es típusú diabetes mellitus
DMSO	-	dimetil-szulfoxid
DTT	-	ditiotreitól
eRNS	-	enhanszer RNS
FBS	-	fetal bovine serum/fötális marhaszérum
FITC	-	fluoreszcein-izotiocianát
FSK	-	forskolin
FXIII-A	-	FXIII véralvadási faktor A alegység
GC	-	guanilát-cikláz
GP	-	glikoprotein
HDL	-	magas denzitású lipoprotein
HOMA-IR	-	homeostasis model assessment of insulin resistance
HUVEC	-	humán umbilikális véna endothelsejt
IBMX	-	3-izobutil-1-metilxantin
ICAM-1	-	intercelluláris adhéziós molekula 1
IL-1 β	-	interleukin-1 β
IMT	-	intima-media thickness/intima-média vastagság
ISR	-	in-stent restenosis/sztenten belüli resztenózis
LBP	-	lipoprotein-kötő protein
LDL	-	alacsony denzitású lipoprotein
LDP	-	leukocyta-depletált thrombocyta
LPS	-	lipopoliszacharid
MFI	-	mean fluorescence intensity/átlagos fluoreszcencia intenzitás
miRNS	-	mikroRNS
mRNS	-	messenger/hírvivő RNS
NE	-	neutrophil elasztáz
NET	-	neutrophil extracelluláris csapda
NF- κ B	-	nukleáris faktor kappa B

NGS	-	újgenerációs szekvenálás
NO	-	nitrogén-oxid
PAI	-	plazma atherogén index
PAI-1	-	plazminogén aktivátor inhibitor-1
PAMP	-	patogén-asszociált molekuláris mintázat
PAR	-	proteáz-aktivált receptor
PCI	-	perkután koronária intervenció
PCT	-	prokalcitonin
PDGF-BB	-	platelet-derived growth factor-BB
PE	-	fikoeritrin
PI3K	-	foszfoinozítid-3-kináz
PKC	-	protein kináz C
PLC β	-	foszfolipáz C β
PPP	-	thrombocyta-szegény plazma
PRP	-	thrombocyta-gazdag plazma
PS	-	foszfatidil-szerin
ROS	-	reaktív oxigén gyök
SDS	-	Na-dodecil-szulfát
SNARE	-	SNAP receptor
SOFA	-	Sequential organ failure assessment
TBST	-	Tris-buffered saline with Tween
TF	-	szöveti faktor
TLR	-	Toll-szerű receptor
TNF- α	-	tumor nekrozis faktor- α
TPO	-	thrombopoietin
TRAP	-	thrombin-receptor aktiváló peptid
TTO	-	time to occlusion/érelzáródáshoz szükséges idő
TXA ₂	-	thromboxán A ₂
VAMP8	-	vezikula-asszociált membrán protein 8
VASP	-	vazodilatátor-stimulált foszfoprotein
VCAM-1	-	vaszkuláris sejtadhéziós molekula 1
vWF	-	von Willebrand faktor
WFDC	-	whey acidic protein four-disulfide-core/tejsavó fehérje-4-diszulfid maggal

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 sejt kultúrák 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

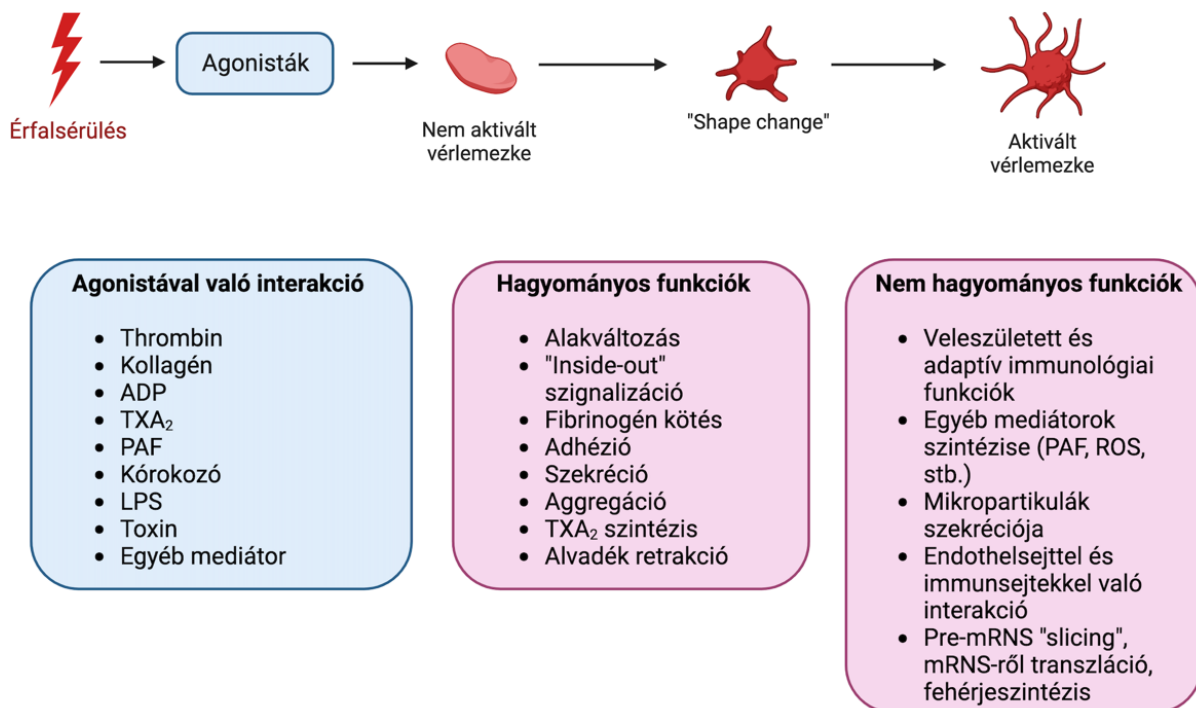
felismerve orvosi laboratóriumi diagnosztikai szakorvosként - a PhD dolgozatom témájának folytatásaként - tovább kutattam i) a vérlemezkékben, ii) az endothelsejtekben, és iii) a bronchiális epithelsejtekben akut vagy krónikus inflammatórikus környezetben lejátszódó sejtaktivációs folyamatok jelátviteli 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

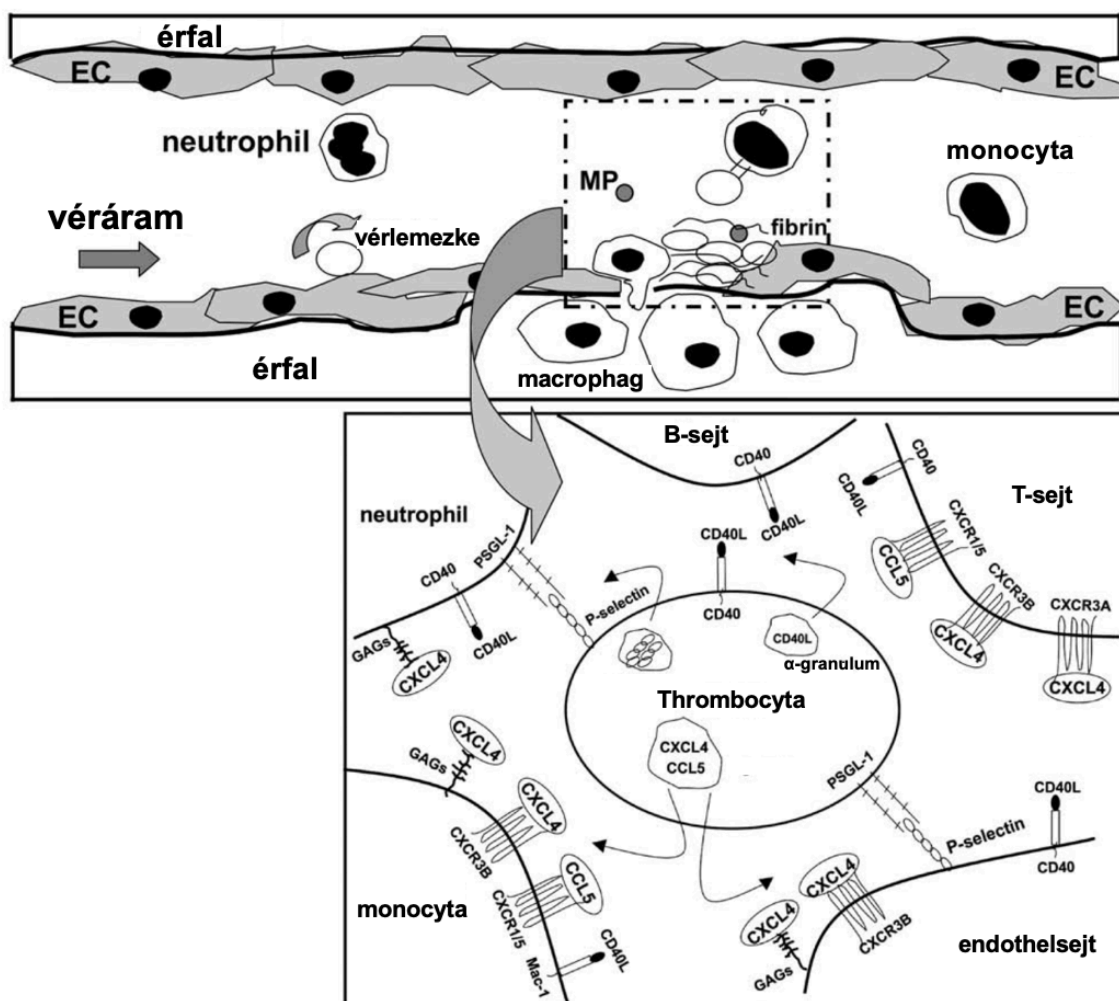
A vérlemezkék a csontvelőben termelődnek a megakaryocyták felszínéről lefűződő előalakok, ún. „proplatelet-ek” formájában, és fragmentálódást követően érik el érett, funkcionális állapotukat a keringésben [1]. Ugyanakkor a csontvelőből származó és a tüdő (extra)vaszkuláris kompartmentjében megtapadó megakaryocyták szintén hozzájárulhatnak a vérlemezke biogeneziséhez [2]. 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 [3, 4]. 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 [3, 4]. Ennek eredményeként előbb thrombocytá adhézió, 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 [3, 4]. A vaszkuláris integritás fenntartásához - normál sejtszám mellett - a vérlemezkék biztosítják az endothél-barriert is az ún. „VE-cadherin kötéseken” keresztül, amit stabilizáló faktorok felszabadítása révén érnek el [5]. Ezzel szemben, súlyos thrombocytopenia, illetve masszív gyulladás esetén a tüdőben ezek a kötések károsodnak és felbomlanak, ami jelentős folyadék-, fehérje- és akár vérkiáramlást okozhat a mikrovaszkulaturából az alveoláris térbe [5].

A hemosztázisban és trombólízisban betöltött „klasszikus” szerepük mellett a thrombocyták számos immunológiai funkciója is ismertté vált [6, 7]. Különböző mediátorok és citokinek termelésével, továbbá a lymphocytákkal, monocytákkal, neutrophil granulocytákkal és a dendritikus sejtekkel való közvetlen interakciójuk révén a vérlemezkék összehangolják a gyulladásos folyamatok lezajlását [6, 7]. 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 [8]. Az aktivált vérlemezkék képesek bizonyos baktériumokat (pl. *S. aureus*, *E. coli*) a felszínükön akár többféle receptoron keresztül megkötni [9], aminek eredményeképpen az *E. coli*-eredetű lipopoliszacharid (LPS) vagy a *S. aureus* α -toxinja szignál-dependens fehérjeszintézist tud indukálni a thrombocytákban [10]. Mi több, a thrombin stimulált thrombocyták fagocitálni és így eliminálni is tudják a *S. aureus* baktériumokat [11]. A vérlemezkéknek tehát számos „tradicionális” és nemrégiben felismert ún. „nem tradicionális” funkciója is ismert, mely feladatokat az **1. ábra** foglalja össze.



1. ábra A reaktív vérlemezkék jelenleg ismert funkcióinak repertoárja, ami számos hagyományos és nem hagyományos feladatokat foglal magába. Primer hemosztázisban a thrombocyták aktiválódnak a sérült érfal területén. A thrombocyták „tradicionális” aktivitásai mellett ugyanakkor számos egyéb új funkciója is van, amelyek jelentősen hozzájárulnak a fiziológiás és a kóros hemosztázis lezajlásához. Ennek részletei a szövegben olvashatók. Forrás: Middleton és munkatársai 2016-os összefoglaló közleményéből adaptálva [8]. Az ábra a Biorender.com program alkalmazásával készült.

Jótevény feladatai mellett a vérlemezkék túlzott mértékű aktivációját figyelhetjük meg számos betegségben, így a metabolikus kórképekben, pl. 2-es típusú diabetes mellitusban (DM2) [12] vagy akut fertőzéssel járó súlyos szisztémás gyulladásban [9]. A kóros aktiválódást kiválthatja közvetlenül a hiperglikémia és a hiperinzulinémia DM2-ben [13], akár nem-diabetikus egészséges személyekben is [14], továbbá a Gram-pozitív (peptidoglikán) és Gram-negatív baktérium eredetű strukturális komponensek (LPS) szepszisben [15], illetve a tartósan magas koleszterinszint is [16, 17]. A kóros metabolikus eltérések ráadásul elősegítik az érlemezésedés kifejlődését is, ami trombo-inflammációhoz vezethet a thrombocyták aktív közreműködésével (2. ábra).



2. ábra A vérlemezkék központi szerepe a trombo-inflammációs folyamatok mediálásában egy atheroscleroticus lézió helyén. A thrombocyták által mediált különböző sejt-sejt interakciók láthatók kinagyítva. Az aktiválódott vérlemezkék többek között felszíni P-selectint és CD40L receptort expresszálnak az α -granulumból, de számos citokint/kemokint is szekretálnak, amik a T- és B-sejteken, a monocytákon, az endothelsejteken (EC) és a neutrophilokon megtalálható különböző receptoroknak a ligandjai. Mindezen celluláris folyamatok nagyban elősegítik az érlemezésedés kialakulását és az ahhoz társuló trombo-inflammációt. Forrás: A disszertáció alapjául szolgáló Nagy és munkatársai által 2012-ben megjelent összefoglaló közleményből adaptált ábra.

A különböző kórképekben kialakult túlzott vérlemezke aktiváció napjainkban már könnyen detektálható többféle szenzitív laboratóriumi biomarker segítségével [18], amelyek közül az egyik legmegbízhatóbb paraméter az emelkedett sejtfelszíni és a plazmában szolubilis formában mérhető P-selectin (CD62P vagy SELP) receptor [19]. 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 [20]. A P-selectin expresszió vizsgálatának így nemcsak diagnosztikai jelentősége van, de patofiziológiai szereppel is bír a trombotikus, gyulladásos és vaszkuláris szövődmények kialakulásában [4]. Az Eredmények részben a P-selectin pozitivitás mellett több más thrombocyta biomarker vizsgálatának alkalmazhatóságáról is szó lesz. Vizsgálataink során obez, de nem diabetesez, továbbá DM2-ben, illetve bakteriális szepszisben szenvedő különböző betegcsoportok vérmintáiban vizsgáltunk többféle thrombocyta aktivációs markert, valamint kóros metabolikus és súlyos gyulladásos (széptikus) *in vitro* körülmények között analizáltuk a vérlemezke aktiválódás intracelluláris folyamatait.

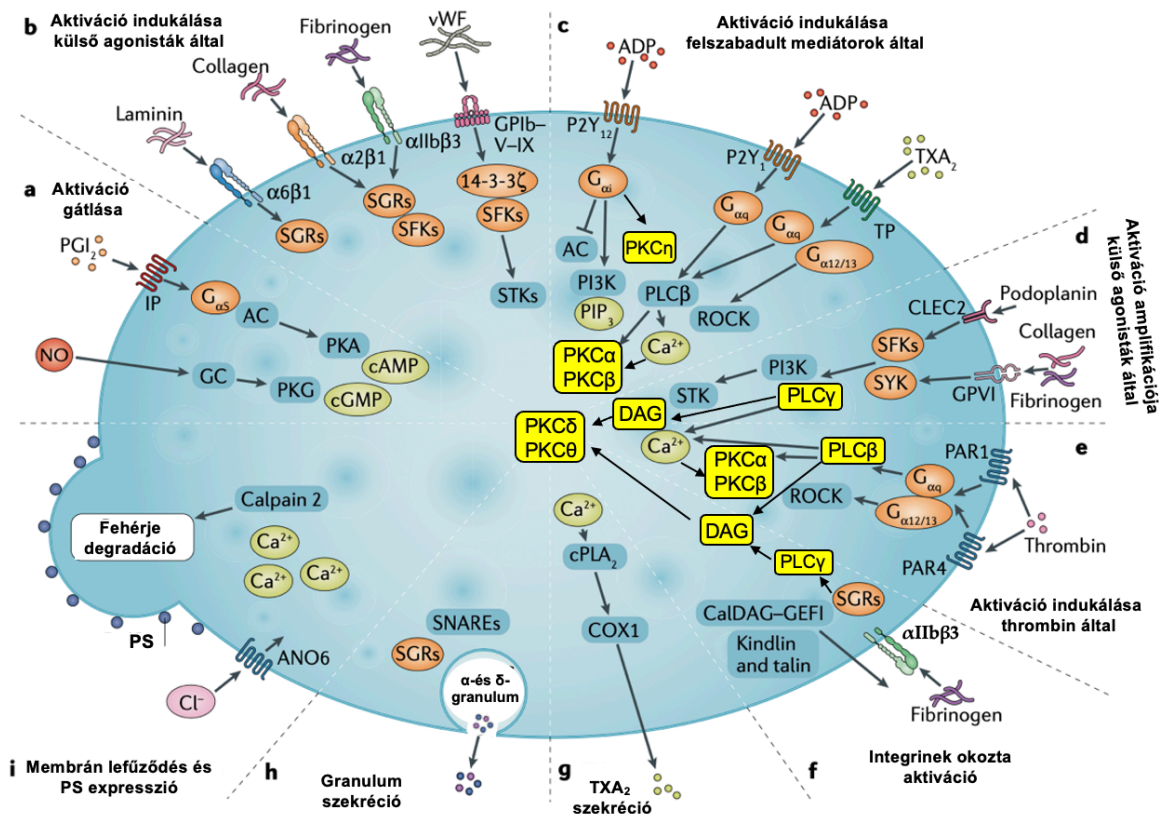
2.2 A thrombocyta aktiválódás intracelluláris mechanizmusának főbb lépései

A thrombocyták teljes aktiválódásának elősegítésében a különböző adhéziós receptorok ($\alpha\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha I I \beta 3$ integrinek és glikoprotein (GP) Ib-V-IX komplex) vesznek részt azáltal, hogy kapcsolódnak a ligandjukkal, nevezetesen a kollagénnel és a vWF-ral az érfalsérülés helyén. Ezen receptorok által indukált jelátviteli folyamatok lejátszódásában több kis G-protein regulátor (SGR), SRC kinázok és szerin/treonin kinázok vesznek részt. A vérlemezke stimuláció hatására felszabaduló adenzin-difoszfát (ADP) és thromboxán A_2 (TXA₂) a P2Y₁₂ és P2Y₁ receptorokat, valamint a TXA₂ receptort (TP) aktiválják. A P2Y₁₂ receptor a G_i fehérjén keresztül gátolja az adenilát-cikláz (AC) enzimet, ugyanakkor aktiválja a foszfoinozítid-3-kinázt (PI3K). A P2Y₁ és a TP receptor mediált szignálút vonal a G_q fehérjén keresztül a foszfolipáz C β (PLC β) enzim stimulációját okozza, elősegítve a Ca²⁺ beáramlását a citoplazmába és bizonyos protein kináz C (PKC) izoenzimek aktivációját. A TP receptor aktiválja továbbá a G_{12/13} fehérjét, ezzel indukálva a Rho-asszociált protein kinázt (ROCK), aminek a thrombocyta alakváltozásban („shape change”) és kinyúlásban („spreading”) van fontos szerepe. A vérlemezke aktiváció amplifikálásában a GPVI receptor és a C-típusú lektinszerű receptor 2 (CLEC2) funkciója jelentős, mivel erős intracelluláris szignált váltanak ki tirozin kináz által mediált út vonalon keresztül, többek között a SFK és SYK fehérjék révén, ami PI3K és PLC γ aktivációt és intracelluláris Ca²⁺ felszabadulást eredményez. A képződő

thrombin egy erős vérlemezke agonista, amely a G_q -kötött (proteáz-aktivált receptor) PAR1 és PAR4 receptorokat (egerekben a PAR3 és PAR4 receptorokat) aktiválja.

A sejt felszíni integrinek (pl. α IIb β 3) konformáció változáson mennek keresztül számos intracelluláris fehérje, így a PLC, PKC, PI3K és CalDAG-GEFI összehangolt működése révén, és ennek köszönhetően megnő ezeknek a receptoroknak az affinitása a ligandjuk, pl. a fibrinogén irányába. Ennek lezajlását egyéb proteinek, pl. a Rap1B, továbbá a citoskeletonhoz kapcsolt fehérjék (pl. kindlin és talin) is segítik. A TXA₂ felszabadulását a citoszolikus foszfolipáz A₂ (cPLA₂) és a ciklooxygenáz 1 (COX1) enzimek működése szabályozza. Az erős thrombocytágonisták által kiváltott α - és δ -granulum szekréció a Ca^{2+} és a diacilglicerol (DAG) által aktivált különböző PKC izoenzimeken keresztül szabályozódik (alább részletezve). A granulumoknak a külső sejtmembránhoz történő fúzióját a SNAP receptor (SNARE) komplex fehérjéi mediálják. A thrombocytá membrán lefűződést („membrane ballooning”) és a foszfatidilszerin (PS) expozíciót csak a jelentős Ca^{2+} mobilizációt okozó agonisták képesek kiváltani. Végül a thrombocytá fehérjék intracelluláris degradációját a calpain 2 enzim végzi.

Kiemelendő, hogy a vérlemezkek túlzott mértékű aktiválódását belső ellenregulációs mechanizmusok kompenzálják: a nitrogén-oxid (NO) és a prosztaglandin I₂ (PGI₂) (vagy másnéven prosztaciklin) az ún. IP receptort stimulálja. Ennek révén a guanilat-cikláz (GC) és az AC enzimek közreműködésével a protein kináz G (PKG) és protein kináz A (PKA) aktivációja következik be. A vérlemezke aktiváció mechanizmusának legfontosabb lépései a **3. ábrán** kerülnek bemutatásra, aminek további részletei összefoglaló közleményekből ismerhető meg [4, 21]. A vérlemezke aktiváció molekuláris mechanizmusának vizsgálata lehetővé teszi nemcsak a thrombocytá funkció jobb megértését, de elősegíti új terápiás célpontok azonosítását, amelyek fontosak lehetnek a kóros vérlemezke aktivációval járó különböző betegségek hatékonyabb kezelésében [22].



3. ábra A legfontosabb szignalizációs útvonalak és aktiválódási folyamatok a humán vérlemezkében. A thrombocyta receptorok által mediált transzduktív folyamatok az egyre nagyobb mértékű vérlemezke aktiváció stádiumai alapján kerültek összefoglalásra (órámutató járásával megegyezően irányban). Sárgával kerültek kiemelésre a különböző PKC izoenzimek és az aktivációjukhoz kapcsolódó legfontosabb folyamatok. A bonyolult celluláris események lejátszódásának részletei a szövegben olvashatók. Forrás: van der Meijden és Heemskerk 2019-es összefoglaló közleményéből adaptálva és módosítva [4].

A vérlemezkékből aktiválódásuk során eltérő méretű vezikulák, így kisméretű exoszómák (< 100 nm átmérő), valamint ennél nagyobb méretű mikropartikulák (100-1000 nm) és apoptotikus testek (500-2000 nm) válnak ki [23, 24]. Az előbbieket exocitózissal, míg a mikropartikulák a thrombocytamembrán lefűződése („budding”) révén szabadulnak ki, és számos vérlemezke citoplazmafehérjét és külső membránreceptort hordoznak [23]. Ebből kifolyólag a thrombocyta-eredetű mikropartikulák CD62P és CD63 pozitívak [25]. Sőt, a PS-pozitív vérlemezkékből PS-pozitív mikropartikulák kerülnek a keringésbe, amiknek akár 50-100-szor nagyobb prokoaguláns aktivitásuk van, mint az aktiválódott vérlemezkéknek [26]. Emellett a mikropartikulák érzékeny thrombocyta aktiváció-függő biomarkerek is [18], ezért több tanulmányunkban is megmértük a mennyiségüket a plazmában. Érdekeségük még, hogy a számuk és a tartalmuk nagyban függ a thrombocytát ért stimulus természetétől. Egy korábbi tanulmány szerint a thrombin jóval több mikropartikula termelődését váltotta ki, mint az LPS, és egyben nagyon eltérő fehérjeösszetételű populációk keletkeztek a két stimulációt követően

[27]. A vérben cirkuláló mikropartikulák mind a thrombocyttal, mind a leukocyttal közvetlen interakcióba lépnek, és jelentősen súlyosbítják a gyulladást [28].

A vérlemezkék felszínén nagyszámban expresszálódnak különböző receptorok, amiket több mint 10 alcsoportba sorolhatunk felépítésük és funkciójuk alapján: megkülönböztetünk integrinokat, 7-transzmembrán receptorokat, az immunglobulin szupercsaládba tartozó receptorokat, C-típusú lektin receptorokat, és tirozin kináz receptorokat stb. [29]. A 7-transzmembrán receptorok közé tartozó ADP-receptorok közül a P2Y₁₂ receptort szeretném itt kiemelni a dolgozat terjedelmének limitáltsága miatt. Amíg a P2Y₁ receptor az intracelluláris Ca²⁺ 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 thrombocyta aggregáció kiteljesedését. Mindez a PI3K-Rap1B-GTP interakción keresztül az αIIbβ3 integrin aktivációján át valósul meg [4]. Ugyanakkor a P2Y₁₂ az AC enzim aktivitását is gátolja, ami bár nincs közvetlen kapcsolatban a vérlemezke aktivációt fokozó hatásával, de a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szint csökkentésével elősegíti az aggregáció bekövetkezését, kivédve az azt megakadályozó PGI₂ hatását [30]. 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 [31]. Azóta több gyulladást okozó humán kórképből is vizsgálták már ennek a receptornak a szerepét a fokozott vérlemezke aktiváció lezajlásában [32, 33]. Szintén jól jelzi a P2Y₁₂ receptor jelentőségét a thrombocyta funkcióban az, hogy a vérlemezke receptorok specifikus inhibitorai közül a P2Y₁₂ receptor inhibitorai terjedtek el az egyik legszélesebb körben a trombotikus komplikációk megelőzése érdekében, így a tienopiridin készítmények (pl. clopidogrel), a cangrelor és a ticagrelor [34]. Kutatásaink során a P2Y₁₂ receptor mediált kóros vérlemezke aktiváció folyamatát vizsgáltuk egy hiperkoleszterinémias egérmódelben, amelynek eredményei később kerülnek bemutatásra.

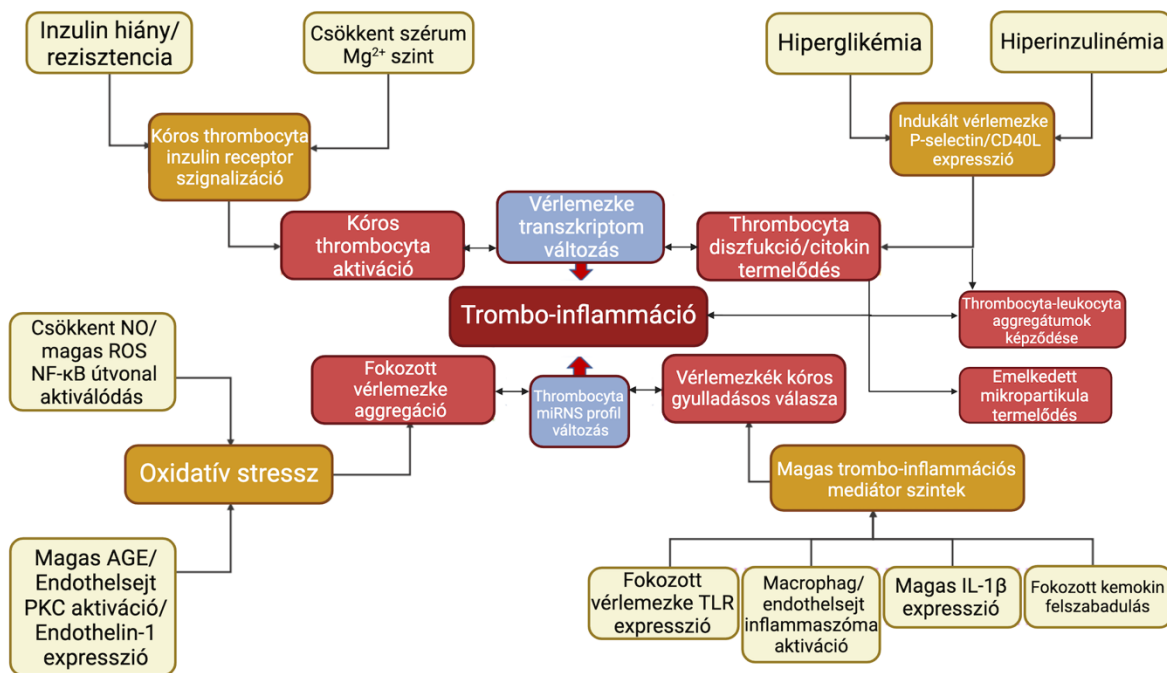
A PKC fehérjecsald tagjai fontos jelátviteli integrátorai a vérlemezke aktivációnak számos thrombocyta funkció változás szabályozásán keresztül [35] (**3. ábra**). A PKC izoenzimek három alcsoportba sorolhatók aktiválhatóságuk alapján [36]: i) az ún. „klasszikus” formák (PKCα és PKCβ) mind a Ca²⁺, mind a DAG által képesek aktiválódni akár a G-protein mediált útvonalakon (PLCβ), akár a GPVI receptoron keresztül (PLCγ) érkezik a stimuláció, és elsősorban a szekréción keresztül fokozzák a thrombocyta aktivációt [37]; ii) az új vagy „novel” PKC izoenzimek közé tartozó PKCδ, PKCθ, PKCη és PKCε (az utóbbi humánban nem, csak egérmódelben expresszálódik) kizárólag a DAG-ra érzékeny, és meglehetősen eltérő hatásuk van a különböző szignálútvonalakon keresztül [38], míg végül iii) az „atípusos” formák (PKCζ és

PKC ι/λ) aktiválódásukhoz sem Ca²⁺-t, sem DAG-t nem igényelnek, hanem teljesen más mechanizmusok révén, pl. PI3K-mediálta útvonalon keresztül funkcionálnak [39]. A „novel” PKC izoenzimek közül a PKC θ , PKC δ és PKC η thrombocyta funkcióban betöltött szerepét vizsgáltam egy külföldi tanulmányút során, amelyek közül a PKC θ -val kapott eredményeimet fogom a későbbiekben részletezni.

2.3 Kóros vérlemezke aktiváció kialakulása metabolikus kórképekben

A DM2 szoros összefüggést mutat a kardiovaszkuláris morbiditással és mortalitással különböző mikro- és makrovaszkuláris komplikációkat okozva [40]. Ennek köszönhetően a diabeteses betegek akár 70%-ában a kardiovaszkuláris betegségek jelentik a közvetlen halálokot. Ráadásul a DM2 kialakulásának rizikója fokozatosan nő az életkorral az idősödő nyugati társadalmakban, ami az obezitással és a nem megfelelő életvitellel is összefügg [40]. Gyakoriak az atheroscleroticus érelváltozások, amik jelentős részben a krónikus gyulladásnak, illetve a kóros metabolikus környezetben indukálódott thrombocyta és endothelsejt diszfunkciónak a következménye. Mindez tovább növeli az atherotrombotikus szövődmények, pl. akut miokardiális infarktus (AMI), stroke vagy perifériás érbetegség kialakulását [40].

DM2-ben a hiperglikémia, az inzulinrezisztencia és az idő előrehaladtával csökkenő inzulinszint miatt akár alacsonyabb koncentrációjú agonista hatására is bekövetkezhet a thrombocyta aggregáció, ami megnövekedett TXA₂ szintézishez vezet [41, 42]. A kóros glikémiás állapotra jellemző még a vérlemezkekben kimutatható nagyobb ic. Ca²⁺ mobilizáció, a fokozott tirozin kináz foszforiláció, kevesebb NO és több reaktív oxigéngyök (ROS) termelődése és a felszíni glikoproteinek nem enzimatis glikációja. A magas Ca²⁺ koncentráció számos thrombocyta aktivációs mechanizmust indukál, többek között bizonyos PKC izoenzimek funkcióját. A ROS termékek felszaporodása vérlemezkefehérje nitrációhoz vezet, ami inaktiválja a szarkoendoplazmatikus retikulum Ca²⁺-ATPáz enzimét, és ez még magasabb ic. Ca²⁺ szintet okoz fokozott calpain aktivációval, ami felelős számos thrombocyta fehérje proteolíziséért [42]. A thrombocyta aktivációjától függő gyulladásos 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 [43, 44]. Ráadásul a nem fiziológiás metabolikus környezetben a vérlemezkek RNS expressziója is jelentősen megváltozik, ami szintén hozzájárulhat a kóros vérlemezke reaktivitáshoz (4. ábra).



4. ábra A diabetesre jellemző kóros metabolikus és celluláris folyamatok által kiváltott fokozott thrombocyta aktiváció és a következményes trombo-inflammáció. A kóros metabolikus körülmények DM2-ben jelentősen befolyásolhatják a vérlemezke miRNS profilt és transzkriptomot is, ami hozzájárulhat a trombotikus folyamatok nagyobb eséllyel történő kialakulásához. Forrás: Sagar és munkatársai 2022-es összefoglaló közleményéből adaptálva és módosítva [12]. Az ábra a Biorender.com program alkalmazásával készült.

A P2Y₁₂ receptor-mediált szignálút vonal a normálisnál aktívabb a DM2-s vérlemezkekben [45, 46]. Mindez jobban csökkenti a cAMP szintet és az inzulin vérlemezke gátló hatását, ami miatt még tovább nő a thrombocyta aggregációs hajlam, valamint a prokoaguláns aktivitás mértéke [47]. Ráadásul a GPIb és GPIIb/IIIa receptorok expressziója is jelentősen megemelkedik DM2-ben [41].

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 [48]. A DM2 betegekben magasabb megakaryocita ploidotást találtak, ami sokkal több retikulált thrombocyta termelődéséhez vezethet. A keringő vérlemezkekhez képest nagyobb méretű és több messenger/hírvivő RNS-t (mRNS) tartalmazó fiatal, retikulált vérlemezkek több TXA₂-t képesek kibocsátani [49]. Friss irodalmi adatok alapján a retikulált vérlemezkek kóros termelődésének hátterében a neutrophil eredetű S100A8/A9 fehérje által kiváltott túlzott thrombopoietin (TPO) termelődés áll, ami a májból eljut a csontvelőbe [50]. A hiperglikémiának tehát nemcsak direkt thrombocyta aktiváló hatása van a keringésben [51], de

az „anyasejtek” működését is képes befolyásolni a csontvelőben eddig nem pontosan ismert mechanizmusokon keresztül [52].

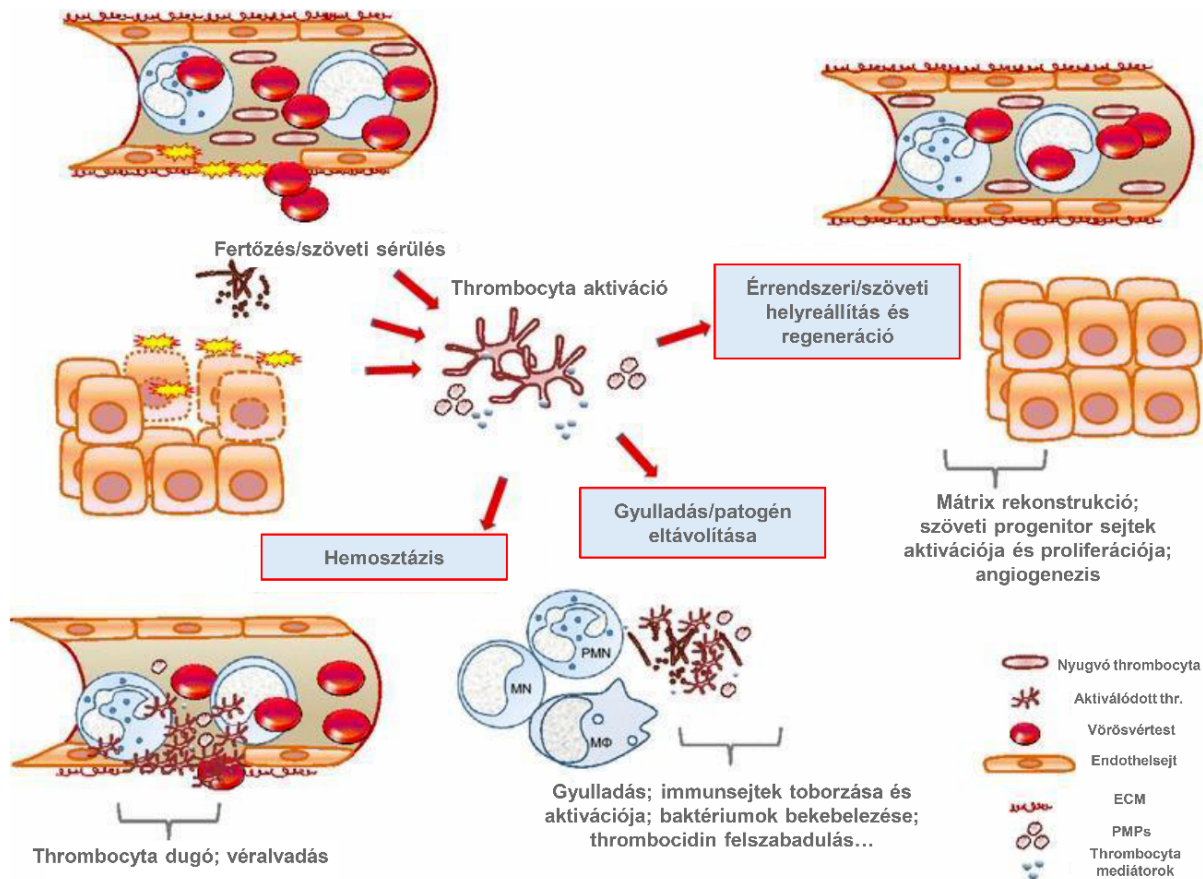
A DM2 kialakulását megelőző obezitás is már együtt járhat kóros vérlemezke aktivációval [53]. Ilyenkor a még relatíve alacsony szintű gyulladás a fokozott lipid peroxidációval TXA₂-dependens thrombocytá aktivációt indukálhat [54, 55]. Ugyanakkor érdemi testsúlycsökkentést követően jelentősen mérséklődtek a thrombocytá aktivációs markerek (pl. CD40L) szintje [56]. Az adipokinek közül a rezisztin tölt be fontos szerepet a gyulladásos folyamatok, az endothélium és a thrombocytá diszfunkció, valamint az oxidatív stressz összehangolt lejátsszódásában. A rezisztin szintje ugyanis jelentősen megnő obezitásban, elősegíti az inzulin rezisztencia súlyosbodását, ráadásul képes direkt módon stimulálni az endothelsejteket. Emelkedett plazma koncentrációja szoros korrelációt mutatott többek között a HOMA index-szel, a plazma CD40L szinttel [55], valamint a szolubilis P-selectin koncentrációval és a thrombocytá mikropartikulaszámmal [57]. A diszlipidémia súlyossága és a vérlemezke aktiváció mértéke közötti összefüggésekről kapott *ex vivo* adatainkat az Eredmények részben ismertetem.

A koleszterin magas koncentrációban önmagában is képes közvetlenül vérlemezke aktivációt indukálni [58], ezért hiperkoleszterinémiában a kóros thrombocytá funkciót tartják az egyik legfontosabb tényezőjének az atherosclerosis és a trombotikus komplikációk kialakulásában [59]. Familiáris hiperkoleszterinémiában a homozigóta betegek az extrém magas koleszterinszint mellett még inkább ki vannak téve az artériás típusú trombózis veszélyének [60]. A fokozott thrombocytá aktiválhatóság egyik magyarázataként a vérlemezke membránban megváltozott koleszterin tartalom áll, ami még több TXA₂ termeléshez vezethet [61]. Amikor a magas koleszterinszintet sikerült effektíven csökkenteni magas denzitású lipoprotein (HDL) segítségével, jelentősen mérséklődött a thrombocytá aktiváció mértéke a membrán koleszterintartalmának csökkentése által [62]. A natív, illetve az oxidált alacsony denzitású lipoprotein (LDL) az ApoE-R2' és a CD36 receptorokon keresztül képes olyan szignál transzdukciót előidézni a p38MAPK foszforiláción keresztül, ami jelentős thrombocytá aktivációhoz vezet [63, 64]. Ugyanakkor a „klasszikus” thrombocytá agonisták által indukált útvonalak aktív szerepét korábban hiperkoleszterinémiában nem vizsgálták. Ezek közül felmerült a P2Y₁₂ receptor által mediált folyamatok involváltsága, mert ennek a receptornak a megfelelő működéshez ún. „lipid tutajra” van szüksége a vérlemezke membránban [65].

2.4 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 [66]. 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) [67]. Ebben a hiperinflammatorikus környezetben óhatatlanul jelentős mértékű endothelsejt károsodás és vérlemezke aktiváció is bekövetkezik, amit tovább fokozhat a thrombocyták patogénnel vagy a kórokozó valamilyen alkotórészeivel való interakciója. A szepsziszhez gyakran társuló csökkent thrombocytaszám és kóros vérlemezke funkció tovább ronthatja a szepszisz kimenetelét [68]. A fentiek eredményeképpen akár rövid időn belül bekövetkezhethet sokszervi elégtelenség, ami a beteg korai halálához vezethet [66].

A thrombocyták aktiválódása központi szerepet játszik a szepszisz indukálta különböző celluláris folyamatok párhuzamos lejátszódásában (**5. ábra**). A reaktív vérlemezkek ugyanis összehangolják a hemosztatikus, a proinflammatorikus, a patogén elleni immunológiai és a szöveti helyreállító folyamatokat [69]. Az aktivált vérlemezkek 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 (lásd később) [69], de jelentősen hozzájárulhat a fokozott thrombin generációhoz és a sokszervi elégtelenség kialakulásához [70]. Ugyanakkor az idő előrehaladtával, különösen szeptikus sokkban - már nagyon súlyos thrombocytopenia jelenlétében - jelentősen lecsökkenhet a vérlemezke-eredetű vezikulák száma [71].



5. ábra A thrombocyták aktiváció központi szerepe a sepszis indukálta celluláris események egyidejű lejátékosításában. A reaktív vérlemezkék összehangolják a hemosztázis, a pro-inflammatórikus, a patogén elleni immunológiai és a szöveti helyreállító folyamatokat. ECM: extracelluláris mátrix, MN: monocyták, PMN: polymorphonuclearis neutrophil, MΦ: macrophag, PMPs: thrombocyták-eredetű mikropartikulák. Forrás: Dewitte és munkatársai 2017-es összefoglaló közleményéből adaptálva [69].

A fenti klinikai tények ellenére a sepszises thrombocyták funkciójára 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 [72]. Ezen eredmények a thrombocyták túlzott aktíváltsági állapotát jelezték, amit mások magas trombospondin szinttel [73], illetve thrombocyták funkciós teszttel (VerifyNow assay) emelkedettnek talált thrombocyták reaktivitási index értékkel is alátámasztottak már a betegség korai szakaszában [74]. A másik oldalról viszont hiporeaktív thrombocytákról számoltak be sepszisben csökkent *ex vivo* aggregációs képességgel, ami a vérlemezkeaktiváció időbeni „kimerülését” jelezte [75, 76]. A sepszis első fázisában tehát a vérlemezkék fokozott aktíváltsági állapota nem kérdéses, amihez több thrombocyták receptor (pl. CD62P, CD63, CD31 stb.) magasabb expressziója, valamint fokozott sejt felszíni fibrinogén köt(őd)és és emelkedett szolubilis GPVI szint is társult [77]. Az eltérő thrombocyták funkciós eredmények hátterében feltehetően eltérő preanalitikai körülmények állhattak.

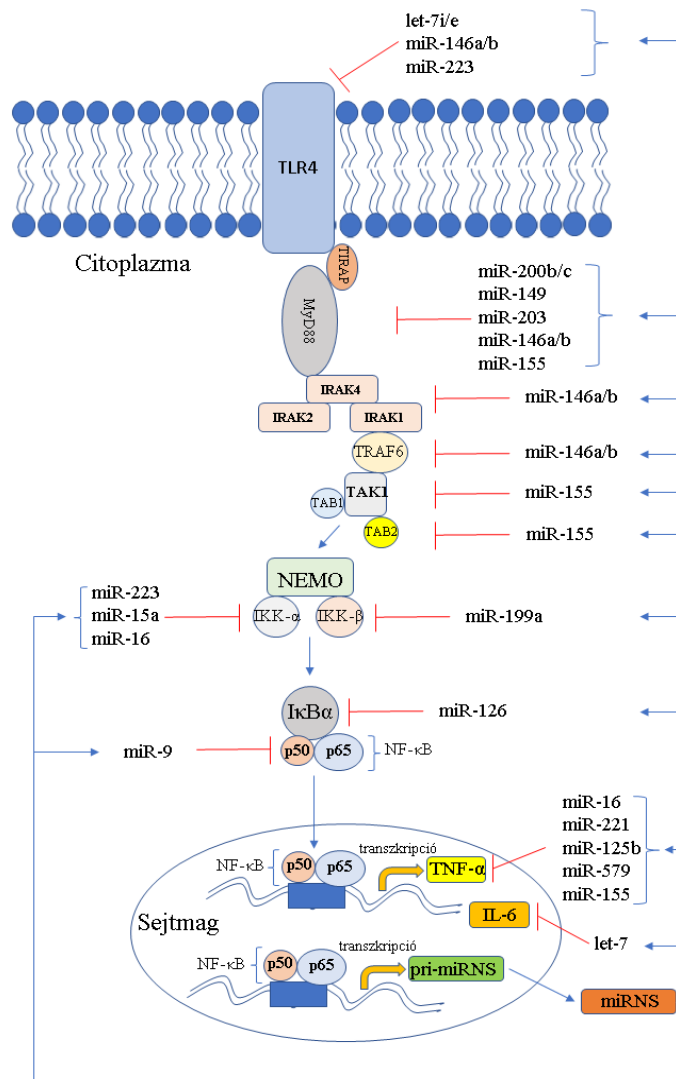
A thrombocyták különböző fehérvérsejt alakokkal kialakított sejt-sejt interakciói tovább segítik szepszisben a proinflammatorikus és protrombotikus folyamatok lejátékozását [78]. A vérlemezkék fokozott P-selectin expressziója magasabb halálozási kockázattal járt különösen az idősebb szeptikus betegek esetében [79], ráadásul a szolubilis formájának emelkedett koncentrációja szoros összefüggést mutatott a szepszishez társult véralvadási rendellenességek gyakoriságával és a kórkép súlyosságával [80]. A fentiek alapján a vérlemezke P-selectin expressziójának változása jelentős hatással bír a szeptikus kórfolyamat lezajlására.

Szepszisben a kórokozók inváziójára első vonalban a veleszületett immunrendszer sejtjei, így a monocyták/macrophagok, a granulocyták és a természetes ölősejtek (NK-sejtek) reagálnak, de a veleszületett immunrendszer részét képezik maguk a vaszkuláris endothelsejtek is [81]. 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) [81], és mindez intracelluláris szignálútvonalak aktiválódásához vezet [82]. Számos funkcionális TLR, pl. TLR4 a vérlemezkéken, sőt a megakaryocytákon is expresszálódik [83]. 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* [83]. 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 [84, 85]. 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 [86]. 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 [87], hanem a thrombopoiesist és a megakaryocyták érését is [88]. Ezen előzetes adatok is azt igazolják, hogy a vérlemezkék mellett maguk a megakaryocyták is aktívan részt vesznek a szepszishez társuló gyulladási folyamatok és következményeik kialakításában [89, 90].

2.5 TLR4 receptoron keresztül bekövetkező NF- κ B-útvonali aktiválás

A TLR-eken keresztül bekövetkező sejtaktiváció és fokozott génexpresszió többek között az NF- κ B (nukleáris faktor kappa B) szignálútvonalon keresztül valósul meg, ami egy szeptikus állapot kialakulása során nagy mennyiségű proinflammatorikus citokinek termelődését indukálja a monocytákban és macrophagokban [91]. A TLR-eknek tíz különböző típusát azonosították eddig az emberi szervezetben (TLR1-TLR10). Ezek a receptorok különféle agonisták hatására aktiválódnak, pl. a TLR2-t a Gram-pozitív baktériumokból származó peptidoglikán aktiválja. A receptorok celluláris elhelyezkedése is eltérő: a TLR2 és a TLR4 a sejtfelszínen, míg a nukleotid molekulákat felismerő TLR3, TLR7, TLR8 és TLR9 intracelluláris vezikulák membránjában helyezkednek el [92].

A szeptikus folyamatokban központi szerepet játszó TLR4 a Gram-negatív baktériumok sejtfalának LPS komponensét ismeri fel. Az agonista bekötődése után a TLR4 intracelluláris részéhez kapcsolódik a MyD88 fehérje. Ezt követően a MyD88 olyan IL-1R-asszociált kinázokat „toboroz” (IRAK4, IRAK1 és IRAK2), amelyek aktiválják és ubiquitinálják a TRAF6-ot. A TAB2 következményes ubiquitinációja miatt a TAK1 aktiválódik. Ezek az események az NF- κ B kináz komplex inhibitorainak az aktivációjához vezet, ami magában foglalja az IKK- α -t, IKK- β -t és az NF- κ B esszenciális modulátort (NEMO), amely foszforilálja az I κ B α -t. Mindez végül felszabadítja a p50 és p65 alegységeket tartalmazó transzkripciós faktort a sejtmagba történő transzlokációhoz. Ez lehetővé teszi a gyulladást fokozó fehérjék expresszióját, így az *IL6* és a *TNF* gének átírását [93]. Fontos hozzátenni, hogy az NF- κ B-útvonali aktiválódása modulálja számos gyulladásfüggő proteint szabályozó mikroRNS (miRNS) szintjét is, amik finomszabályozzák az útvonalban résztvevő különböző fehérjék kifejeződését és működését. A megakaryocytákban [94] és a vérlemezkékben [95] egyaránt funkcionális TLR4 receptor indukált NF- κ B-útvonali legfontosabb jelátviteli eseményeit a **6. ábra** mutatja be.



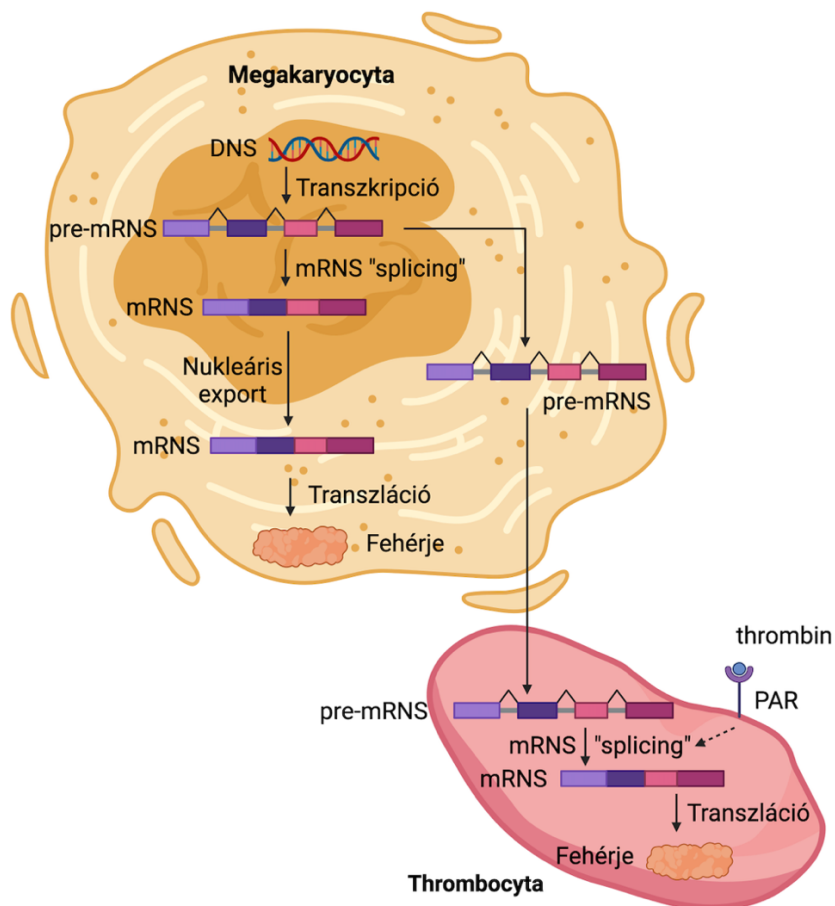
6. ábra A TLR4 receptor indukált NF- κ B jelátviteli útvonal legfontosabb fehérje komponensei és szabályozó miRNS-ei. Az LPS bekötődik a TLR4 receptorhoz és egy komplex intracelluláris szignálút vonalat indít el, amelynek eredményeképpen a p50 és p65 alegységek belépnek a sejtmagba és iniciálják a pro-inflammatórikus gének expresszáldását. Az ábrán feltüntetett intracelluláris miRNS-ek expressziója ilyenkor szintén változik, ami regulálja az útvonal működését a résztvevő fehérjék expressziójának finomhangolásával. Forrás: A disszertáció alapjául szolgáló Szilágyi és munkatársai által írt 2019-es összefoglaló közleményből adaptált ábra.

2.6 A vérlemezkék RNS tartalma és translációs képessége

A keringő vérlemezkék bár sejtmaggal 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 [96]. A thrombocytá RNS-tartalom jelentős része a fiatal, thiazol-narancs pozitív és egyben reaktívabb retikulált vérlemezkékben található meg [97]. Számítások szerint egy vérlemezke átlagos össz RNS tartalma 2,2 femtogramm [98], de a retikulált formákban akár 20-40-szeres mennyiségben is jelen lehet [97]. A leukocytákban kb. 1000-szer több RNS található, ugyanakkor a magas

vérlemezkeszám miatt a thrombocytá-eredetű RNS egy jelentős részét teszi ki a vér alakos elemeiben fellelhető teljes RNS állománynak [98]. 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 [96, 99]. Az 1990-es évek elején az elsők között sikerült igazolni a GPIIb/IIIa (α IIB β 3) receptor két alegységét kódoló transzkriptet (*ITGB3* és *ITGA2B*) [100, 101]. 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 [102]. A „top” transzkriptek közé tartozik a fentebb említett *ITGB3* és *ITGA2B* mellett a *PF4* (thrombocytá faktor 4), a *RANTES* (*CCL5*), a *TUBB-1* (Tubulin beta-1), és a *GP1BB* (GPIb) [103]. A vérlemezékben a megváltozott mRNS profil abból is adódhat, hogy bizonyos thrombocytá transzkriptek és fehérjék a megakaryocytákból eltérő „sorting” mechanizmussal kerülnek be a lefűződő thrombocytákba [104].

A vérlemezékben a kódoló RNS-ek mellett nagy mennyiségben vannak jelen nem kódoló RNS-ek is (lásd 2.8. fejezetet), továbbá olyan megakaryocytá-eredetű sejtalkotók (pl. riboszóma, endoplazmatikus retikulum, translációs faktorok stb.) és enzimek (pl. Dicer, Ago2, TRBP2 stb.), amik lehetővé teszik bizonyos stimulusok hatására a *de novo* fehérjeszintézist [105]. A vérlemezék mRNS tartalma döntően érett formákat foglal magába, mivel a pre-mRNS-ek processzálása döntően a megakaryocytákban játszódik le [99]. Ugyanakkor erős vérlemezke agonisták (pl. thrombin) hatására a pre-mRNS „splicing” is le tud játszódni a thrombocytákban, ami interleukin-1 β (IL-1 β) [106], szöveti faktor (TF) [107] és IL-18 [108] *de novo* szintézishez vezethet (7. ábra). Más thrombin-indukált fehérjék kapcsán, így a plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1) esetében [109] a *SERPINE1* mRNS-ről az RNS-kötő Ago2 és TIA-1 fehérjék disszociálnak, így elősegítve a protein szintézisét [110]. De patogén stimulációk, pl. az *E. coli*-féle LPS IL-1 β [111], illetve TF szintézist [10], míg a Dengue vírus szintén IL-1 β termelődést [112] tudott indukálni mRNS „splicing” útján a humán vérlemezékben.



7. ábra Szignál-dependens pre-mRNS „splicing” mechanizmus és ezáltal transzlációs lehetőség a humán vérlemezkében. A megakaryocyták differenciálódása során a mRNS „splicing” folyamatához szükséges fehérjék bepakolódnak a citoplazmájukba. Thrombopoiesis során viszont ezek a komponensek a pre-mRNS-ekkel együtt bekerülnek a magnélküli thrombocytákba is. Amikor a vérlemezkék stimulálódnak, pl. a PAR receptoron keresztül, képesek aktiválni a „splicing” mechanizmust és így érett mRNS-ek képződnek, amiből fehérje transzláció következhet be. Ez biztosítja a vérlemezkék számára, hogy a megváltozott transzkriptom révén kialakítsák sejtaktivációs profiljukat. Forrás: Weyrich és munkatársai 2009-es összefoglaló közleményéből adaptálva és módosítva [105]. Az ábra a Biorender.com program alkalmazásával készült.

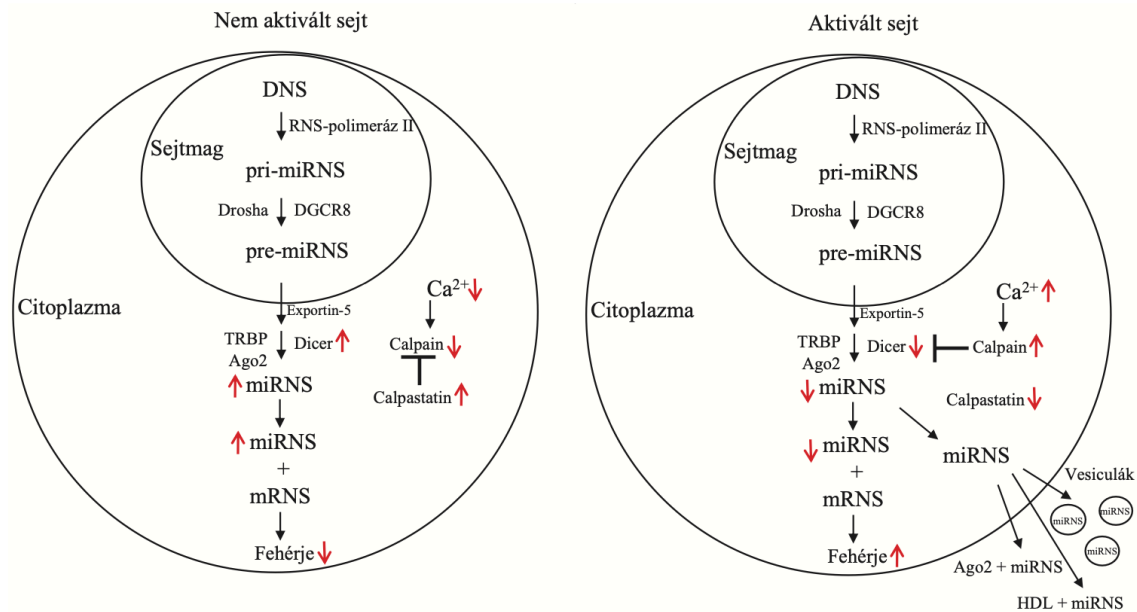
Ezen eredményekből az következik, hogy sejtaktiválódást követően képes a vérlemezke proteom is jelentősen megváltozni, hogy a thrombocyták ily módon (is) reagáljanak az őket ért stimulusokra [105]. Megjegyzendő, hogy az újonnan szintetizálódó thrombocytá fehérjék közül csak néhánynak (pl. Bcl-3) ismert a funkcionális hatása [113]. Nemrégiben igazolták, hogy a thrombocytá *SELP* gén mRNS-e funkcionálisan aktív, és a sejtfelszíni P-selectin receptor expressziót képes befolyásolni [114]. Mindezek alapján került vizsgálataink középpontjába az egyik legfontosabb felszíni receptor, a P-selectin (*SELP*) kifejeződésének analízise, hogy vajon kóros metabolikus, illetve széptikus környezetben képes-e a vérlemezke *de novo* fokozni a *SELP* expressziót - akár megváltozott miRNS szintek révén - ami együtt járhat nagyobb thrombocytafehérje mennyiséggel is.

2.7 A miRNS-ek szintézise és funkciói

A miRNS-ek erősen konzervált, kb. 20-25 nukleotid hosszúságú, egyszálú nem kódoló RNS-ek, amelyek fontos szerepet játszanak a sejtek működéséhez szükséges gének expressziójának finomszabályozásában [115]. A miRNS-eken keresztül megvalósuló génszabályozás egy komplex folyamat, mivel egy miRNS akár több száz cél mRNS működését befolyásolhatja, másrészt egy mRNS-t akár több miRNS is szabályozhat [116]. A miRNS-ek az emberi fehérjéket kódoló gének kb. 60 %-át regulálják a cél mRNS és a kódolt fehérje szintek csökkentése révén [117], és részt vesznek olyan alapvető celluláris folyamatok modulálásában, mint a sejtproliferáció, differenciáció, illetve apoptózis [118]. A miRNS-ek megváltozott expressziója és funkciója döntő szerepet játszik számos betegség, pl. metabolikus, kardiovaszkuláris és daganatos kórkép kialakulásában és progressziójában [119, 120].

A miRNS-ek biogenezise (**8. ábra**) során első lépésben az elsődleges (primer) miRNS (pri-miRNS) kerül átírásra az RNS-polimeráz II aktivitása révén a sejtmagban [121]. Ezt követően a pri-miRNS-ből az RNáz III-as típusú Drosha endonukleáz aktivitásának köszönhetően egy 70 bp-os hajtúszerkezetű miRNS-prekurzor (pre-miRNS) alakul ki, mely reakciót a DGCR8 komplex katalizálja [122]. A pre-miRNS az Exportin-5 transzporter fehérjéhez kötődik, amelynek segítségével a sejtmagból a citoplazmába kerül. Itt zajlik a miRNS-ek második érési folyamata, amelynek során a III-as típusú RNáz Dicer1 endonukleáz enzim a TRBP kofaktor jelenlétében lehasítja a hajtúszerkezetet [123]. Ennek a lépésnek az eredményeként érett miRNS duplexek jönnek létre, amelyek kb. 22 nukleotid hosszúságúak. Ezek közül a vezető szál beépül az ún. RISC komplexbe, amelyet a TRBP, a Dicer1 enzim és az Ago2 fehérje alkot, míg a másik (követő) miRNS szál lebomlik [124].

A miRNS-ek a génexpresszióra kifejtett gátló hatásukat oly módon érvényesítik, hogy bázispárosodással a cél mRNS 3' UTR részéhez kötődnek, ami a 2-8. nukleotid közötti ún. „seed” régió [115]. A cél mRNS „sorsa” ezt követően a komplementaritástól és az Ago2 fehérje aktivitásától függ [125, 126]. Amennyiben a miRNS és a cél mRNS közötti bázispárosodás tökéletesen komplementer és a miRISC komplex tartalmazza az Ago2-t, az mRNS szekvenciafüggően hasítódik úgy, mint a növényekben [127]. Ezzel szemben a nem tökéletes komplementaritás, ahogy általában az állatvilágban és az emberben is jelen van, a transláció gátlásához vagy a cél mRNS Ago2-függő degradációjához vezet [128].



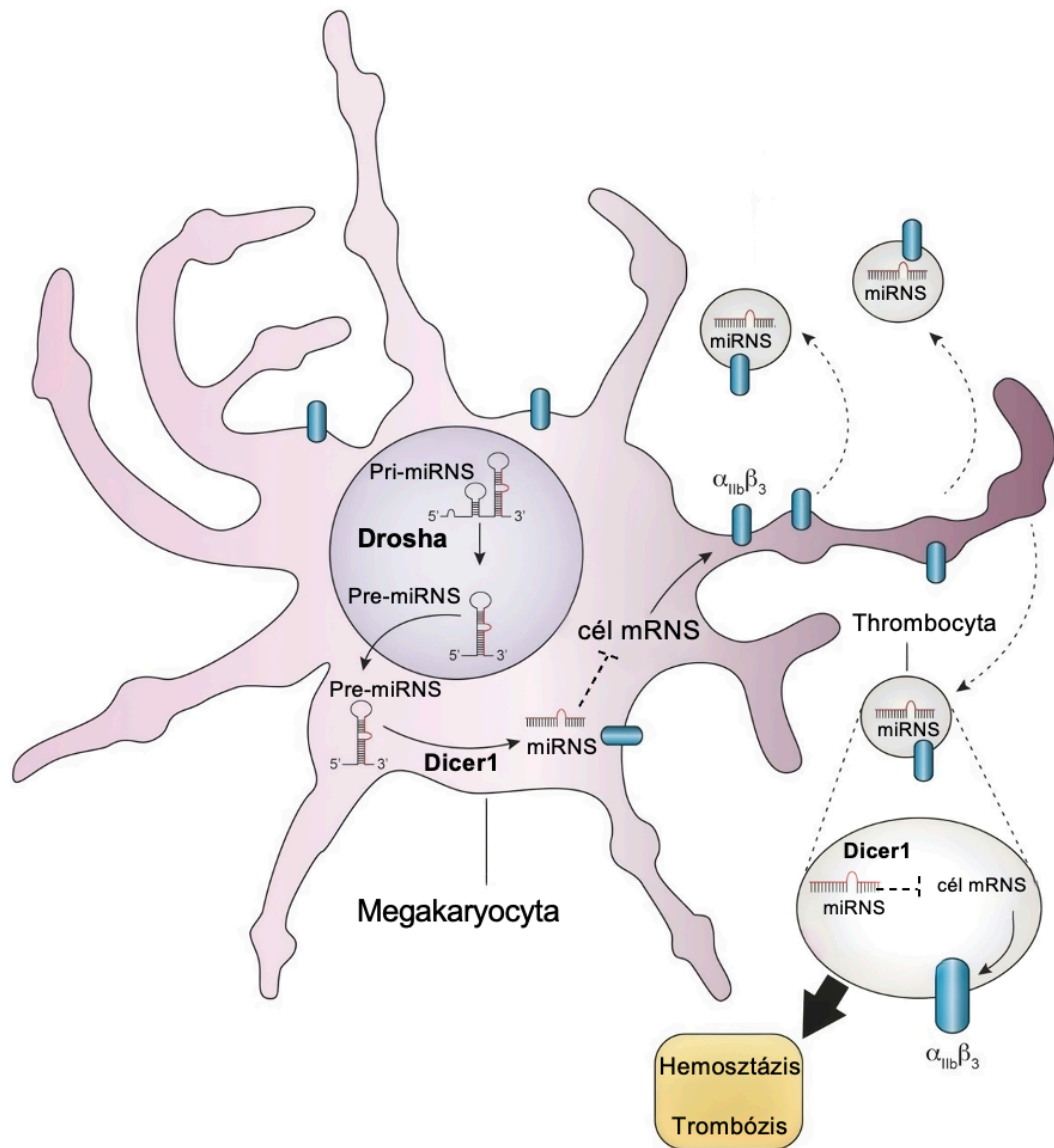
8. ábra A miRNS-ek érési folyamatának főbb lépései maggal bíró sejtekben. A pri-miRNS-ek a sejtmagban termelődnek, majd egy több lépésből álló érési folyamaton mennek keresztül. A nem aktivált sejtekben a miRNS-ek magas expressziója képes gátolni a transzlációt (bal oldal). Ezzel szemben a stimulált sejtekben az aktiválódott Calpain gátolja a Dicer enzim működését, emiatt kevesebb miRNS termelődik, ami elősegíti az mRNS-ről történő fehérjeszintézist (jobb oldal). Az érett miRNS-ek vezikulákba csomagolódva, illetve szabad formában (HDL-hez/Ago2 fehérjéhez kötötten) kikerülhetnek az anyasejtből. Forrás: A disszertáció alapjául szolgáló Fejes és munkatársai által közölt 2018-as összefoglaló közleményből adaptálva.

A miRNS-ek nemcsak intracellulárisan aktívak, hanem kijuthatnak az anyasejtekből a környezetükbe aktív transzport révén exoszómákba és apoptotikus testekbe, a vérlemezkék esetén főként mikropartikulákba csomagolódva szállítódnak [129, 130]. Rendkívül ellenállóak az endogén és exogén RNáz aktivitással, valamint a megváltozott pH és hőmérsékleti viszonyokkal szemben [131]. A miRNS-ek egyik sejtől a másikba történő szállítása történhet RNS-kötő fehérjékhez, pl. Ago2-höz vagy HDL-hez kötötten is [132]. Ezen transzportmechanizmusok révén a miRNS-ek eljuthatnak és bekerülhetnek a környező vagy akár távoli sejtekbe és megváltoztathatják azok működését [130, 133]. Stabilak maradnak a keringésben, így a plazma/szérum mintákban, illetve szabad formában számos egyéb testfolyadékban is detektálhatók, mint például vizeletben, liquorban, nyálban, könnyben, anyatejben és magzatvízben [129]. Ebből kifolyólag a keringő miRNS-ek már alkalmas biomarkereknek bizonyultak különféle betegségekben, így a diabetes és a szepszis diagnosztizálására és monitorozására is [134, 135].

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

A thrombocyták nem-kódoló RNS-ei közé tartoznak az érett miRNS-ek, de riboszómális (28S és 18S) RNS-ek, transzfer RNS-ek, pszeudogének, és hosszú nem kódoló RNS-ek egyaránt jelen vannak [96], amelyek szintén a megakaryocytákból kerülnek a vérlemezkékbe [136] (9. ábra). Mivel a vérlemezkékben nincs transzkripció, úgy tűnik, hogy a nem-kódoló RNS-ek, különösen a miRNS-ek működésének jóval nagyobb szerep jut ebben a sejttípusban, mint a maggal rendelkező sejtekben [52]. Az mRNS-ekhez képest csak jóval később, 2009-ben igazolták a thrombocyta miRNS-ek jelenlétét [137], és relatíve nagyobb is a miRNS/össz RNS arány a vérlemezkékben, mint a fehérvérsejtekben [138]. Több, mint 500 miRNS-t azonosítottak már, közülük a let-7 család adja a teljes miRNS állomány kb. felét [138]. Ezek a miRNS-ek nemcsak a vérlemezke aktivációt elősegítő, de az azt megakadályozó fehérjék expresszióját is befolyásolhatják, így kontrollálva a thrombocyta aktivációs folyamatokat és a vérrögképződést [139, 140]. Következésképpen a miRNS szintek megváltozása jelentősen befolyásolhatja a thrombocyta reaktivitás mértékét.

A legnagyobb mennyiségben megtalálható miRNS-ek közé tartozik a miR-223, miR-142, miR-199, miR-126, miR-26b, let-7, miR-103, miR-185, miR-21, miR-140, miR-23a, miR-22 és a miR-24. Ezek a miRNS-ek a vérlemezkékben meglévő formák közel 80%-át alkotják, így feltehetően ezeknek lehet jelentősebb szerepe a thrombocyta funkció szabályozásában [137, 139-141]. 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 [110, 142]. 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 [143]. Mindez annak volt köszönhető, hogy a Dicer1 enzim ablációja jelentős miRNS expresszió átrendeződéshez, főleg redukcióhoz vezetett, ami lehetővé tette egy-egy fontos cél mRNS és általa kódolt fehérje fokozott expresszióját a vérlemezkékben [143].



9. ábra A miRNS-ek bejutása a megakaryocytákból a vérlemezkékbe. Nemcsak a megakaryocyták, de a vérlemezkék is tartalmaznak miRNS-eket, cél mRNS-eket és azok prekurzorait, továbbá olyan sejtalkotókat (pl. riboszóma), fehérjéket (pl. Ago2) és enzimeket (pl. Dicer1), amelyek lehetővé teszik a *de novo* fehérjék (pl. $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin) szintézisét bizonyos stimulusk hatására. Mindezen komponensek a megakaryocytákból való lefűződés során kerülnek át a thrombocytákba, így befolyásolva a hemosztázist és a trombózis lezajlását. Az emelkedett miRNS szint gátolja az mRNS funkciót (szaggatott vonal). Forrás: Boilard és munkatársának 2016-as közleményéből adaptálva és módosítva [136].

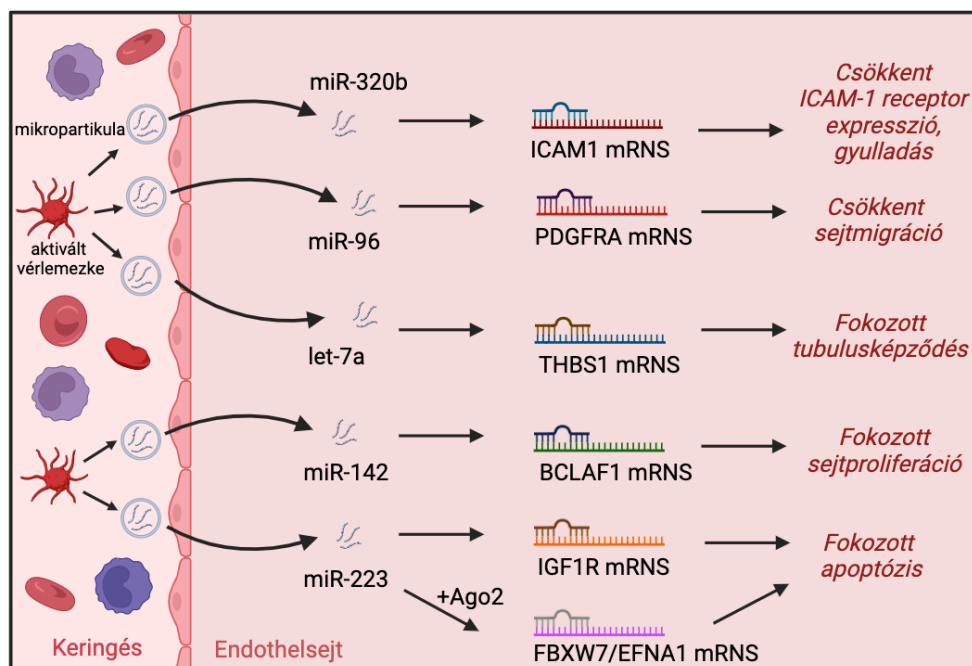
A miRNS-ek a thrombopoiesis és a megakaryopoiesis összetett folyamatában is aktívan közreműködnek. A megakaryocyták differenciálódása és proliferációja során a miR-223 és miR-150 szintje megemelkedik, míg a miR-155 expressziója lecsökken [144-146]. Ezen eredményekből az következik, hogy a thrombocytákban és anyasejtjeikben a miRNS és mRNS szintek, illetve az általuk szabályozott fehérje expressziója nem állandó, hanem a sejtek fenotípusának megfelelően dinamikusan változik [52, 140].

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 [137]. A miR-223 továbbá a β 1-integrin, a kindlin-3 és a FXIII véralvadási faktor A alegységének (FXIII-A) expressziójának regulációjáért is felelős [142]. Ennek köszönhetően a miR-223-depletált egerekben fokozott vérlemezke aggregációt, több, nagyobb méretű vérrögképződését és elhúzódó alvadék retrakciót tapasztaltak [142]. 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 [147]. A megnőtt miR-126 az ADAM9 (diszintegrin és metalloproteináz 9) fehérje expresszióját képes gátolni, így a vérlemezkek I. típusú kollagénhez való adhéziója csökken [148]. A fibrinogén receptor promóter régióját aktiváló transzkripciós faktor (*MAFB*) mRNS szintjét öt különböző miRNS (miR-326, miR-128, miR-331, miR-500 és miR-130a) regulálja [143, 149]. A thrombocyták indokolatlan aktiválódásának megelőzésében a miR-200b lehet az egyik felelős, amely az epinefrin-indukálta vérlemezke aktivációt fokozó *PRKAR2B* gén kifejeződését represszálja [139]. A vérlemezke aktiváció korai szakaszában zajló alakváltozás folyamatához a KLHL5 fehérje és a miR-495 interakciója is hozzájárul [139]. Végül megakaryocita sejtmodelleket használva igazolták, hogy további thrombocyta funkciókat is képesek modulálni a miRNS-ek, így a miR-15a a GPVI-mediált szignálút vonal befolyásolásán keresztül kihat az α IIb β 3 integrin aktivációra és az α -granulum szekrécióra [150]. Ezzel párhuzamosan a miR-126-ról igazolódott nemrégiben, hogy az aktin sejtvázhoz tartozó PLXNB2 fehérje expresszióját is kontrollálja [151]. Predikációs 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 thrombocyta miR-26b szerepét ebben a vonatkozásban az általunk beállított különböző gyulladási körülmények között *in vitro*.

2.9 Vezikulákban történő miRNS transzfer és funkcionális hatásai

A különböző sejteredetű és típusú vezikulák által lejátszódó RNS transzfert először mastocyta sejtekből szeparált exoszómákban igazolták, amik miRNS-eket is tartalmaztak és közvetítettek más mastocytákba [152]. A HUVEC (humán umbilikális véna endothelsejt) sejtek génexpressziójának extracelluláris miR-92a általi szabályozását a K562 sejtek által termelt exoszómákkal igazolták, amely elősegítette a recipiens sejtek migrációját a tubuláris rendszer befolyásolásán keresztül [153]. A monocyta-eredetű miR-150-et tartalmazó exoszómák az

endothelsejtek migrációját fokozták *in vitro* [154]. A gyulladós és trombotikus folyamatokban a vérlemezke aktiváció során képződő mikropartikulák számos megakaryocytarendetű fehérjén, illetve a membránra még nem expresszálódott receptoron túl funkcionális miRNS-eket [130, 155] és mRNS-eket is szállítanak [156] (**10. ábra**). Így a thrombocytamikropartikulák egyfajta vektorként fontos szerepet játszanak az intercelluláris kommunikációban, és részt vesznek más sejtek, pl. endothelsejtek és macrophagok mRNS funkciójának szabályozásában [130, 155], továbbá hatással lehetnek különböző betegségekre, így a kardiovaszkuláris kórképek kialakulására [157] és a szepszis kimenetelére is [158].



10. ábra A vérlemezke miRNS transzfer és annak közvetlen hatásai az endothelsejt működésére. A vérlemezkek által szállított RNS-ek, így a miRNS-ek a sejtaktiváció során lefűződő mikropartikulákon keresztül bejutnak az endothelsejtekbe, és a megfelelő cél mRNS-hez való kötődésük révén befolyásolják a fehérjék expresszióját és számos sejtfunciót. Forrás: Shu és munkatársai 2019-es közleményéből adaptálva és módosítva [155]. Az ábra a Biorender.com program alkalmazásával készült.

A thrombocytamikropartikula által szállított miR-223 az egyik legszélesebb körben vizsgált vezikuláris miRNS, aminek „transzfekciója” hozzájárul a szív- és érrendszeri betegségekben az endothélium diszfunkcióhoz [158], továbbá két gén (*FBXW7*, *EFNA1*) mRNS szintjének modulálásán keresztül az endothelsejt apoptózishoz is [160]. Néhány évvel később a miR-126-t tartalmazó vérlemezke mikropartikulák bejutását igazolták a makrophagokba, amely jelentősen csökkentette a CCL4, a CSF1 és a TNF mRNS és fehérje szinteket, és egyben fokozta a sejtek fagocitáló képességét [130]. Ezért a mikropartikula

miRNS-ek - parakrin hatásuk miatt - fontos terápiás célpontokká válhatnak, ugyanakkor újfajta diagnosztikai markerek is lehetnek a kardiovaszkuláris, valamint a daganatos betegségekben [130]. A miRNS-ek szepszisben betöltött szerepéről a későbbiekben még lesz szó.

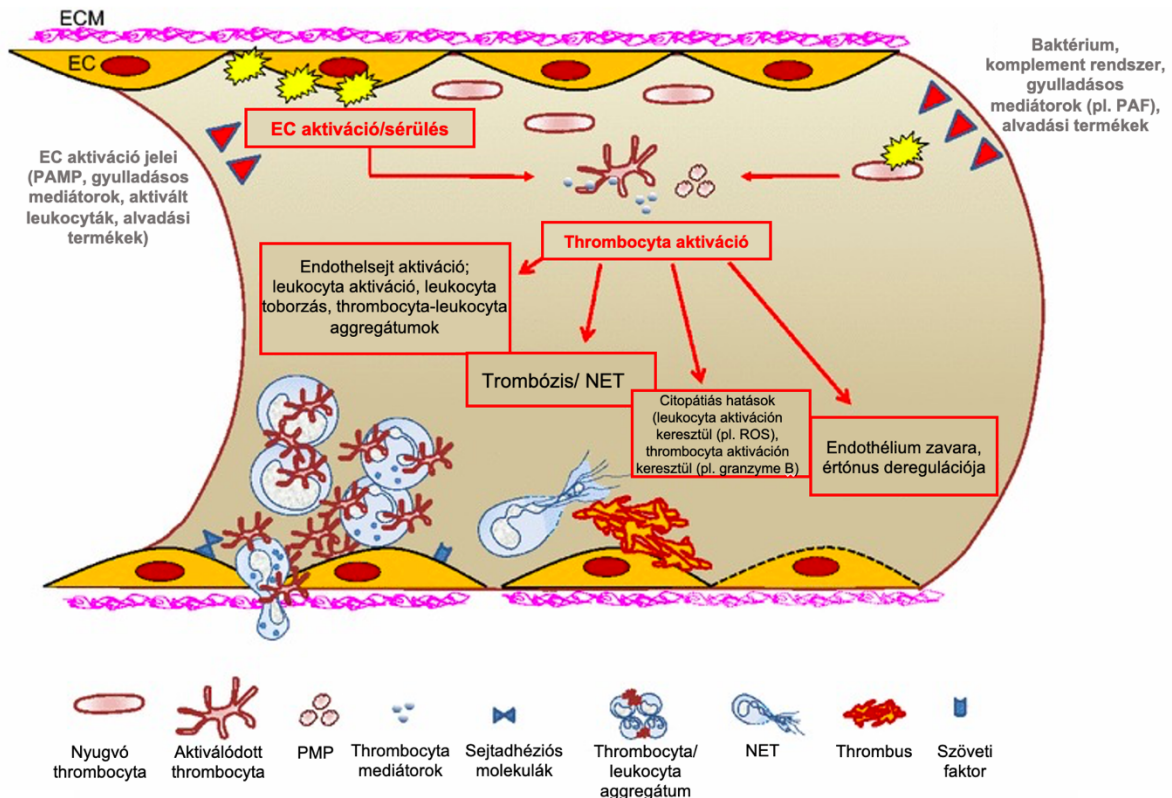
2.10 Vérlemezke miRNS expresszió változások diabetesben és szepszisben

Felfedezésük óta egyre nagyobb érdeklődés irányul a vérlemezkékben azonosítható miRNS-ek expressziójának és szerepének vizsgálatára egyes betegségekben, így DM2-ben is [161]. 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 [142]. A csökkent miR-223 és miR-146a thrombocytá expressziója a diabeteses betegekben szoros összefüggést mutatott a stroke kialakulásának kockázatával [162]. A hiperglikémia szintén mérsékelte a miR-30c expressziót a vérlemezkékben, amely a PAI-1 fehérje expresszió fokozódásához és protrombotikus állapot kialakulásához vezetett [163]. Az alacsony thrombocytá miR-223 szint a P2Y12 receptor expresszió befolyásolásán keresztül ineffektív receptorinhibitor kezelést okozhat, ami magas thrombocytá reaktivitáshoz vezethet és így a kardiovaszkuláris rizikót is növelheti [164]. A prediabetesben csökkenő vérlemezke miR-103b potenciális biomarkerként szolgálhat a jövőben kialakuló DM2 korai előrejelzésében [165]. Emellett jelentősen alacsonyabb a vérlemezkékből kikerülő miR-223, miR-126, miR-24, miR-197, miR-191 és miR-21 plazma szintje DM2-ben, amik a vaszkuláris gyulladás és az atherosclerosis súlyosságával jól korreláltak [134, 166].

Szepszisben elsősorban a keringő miRNS-eket vizsgálták korábban, amiket lehetséges új diagnosztikai markerként analizáltak plazma vagy szérumban mintákban [135, 167-169]. Arról azonban még kevés adat áll rendelkezésre, hogy a „megakaryocytá-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 [170]. Tekintettel arra, hogy a fehérvérsejtek és a thrombocyták nagyon eltérő miRNS repertoárral rendelkeznek [138], ezért további vizsgálatok váltak szükségessé, hogy „tisztított” vérlemezke mintákban is megtörténjen a miRNS-ek analízise szepszisben.

2.11 Endothelsejt károsodás kialakulása és szabályozása szepszisben

Szepszisben a reaktív vérlemezkék számos olyan gyulladáshoz vezető mediátort és citokint bocsátanak ki a környezetükbe, amelyek elsősorban az endothelsejtek és a fehérvérsejtek működésére vannak hatással [69] (11. ábra). Az endothelsejteket ezen felül a PAMP-ok, a szisztémásan felszaporodó gyulladáshoz vezető mediátorok (pl. TNF- α , IL-1 β) és a NET-ek is aktiválják, ami az NF- κ B útvonal mentén transzkripciós folyamatokhoz vezet [171]. Károsodik az endothélium felszíni glyocalyx expressziója is a heparán-szulfátok leválása miatt, ami még kiterjedtebb vaszkuláris gyulladással és permeabilitás fokozódással jár együtt. 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) [172]. Ezek a receptorok nagyban elősegítik a reaktív thrombocyták és leukocyták kitapadását a gyulladt érfalhoz [173]. A vérlemezkék mellett a ROS-t és NET-et termelő aktivált fehérvérsejtek is interakcióba lépnek a károsodott endothéliummal különböző receptorpárokon keresztül: P-selectin/PSGL-1, E-selectin/ESL-1, ICAM-1/ α L β 2 és VCAM-1/ α 4 β 1, ami fokozza a fehérvérsejtek migrációját az érfalon keresztül és egyben rontja a mikrovaszkulúra barrier funkcióját [171]. ROS-t ilyenkor maguk az endothelsejtek is termelnek, ráadásul csökken a protektív NO szintézise és növekszik a reaktív nitrogén termékek szintje. Végül az aggregálódó thrombocyták Weibel-Palade testjeiből kiszabadulnak a prokoaguláns fehérjék (pl. FVIII, vWF, és P-selectin), növekszik az endothelsejtek TF szintézise, valamint csökken az antikoaguláns hatású trombomodulin és az aktivált protein C szintje, illetve a PAI-1 fokozottan termelődik, ami gátolja a fibrinolízist [171].



11. ábra A vérlemezke aktiváció által indukált és az érfalat érintő gyulladási folyamatok sepszisben. Számos celluláris és szolubilis mediátor stimulálja az endothelsejteket, amelyek fő induktora a vérlemezke aktiváció, amit a kórokozó, a gyulladás és az alvadásaktiváció tovább provokál. A kontrollálatlan thrombocyták aktiváció hozzájárulhat az endothélium barrier kiterjedt károsodásához, ami az érintett szövet/szerv elégtelenségéhez is vezethet. Rövidítések: ROS: reaktív oxigénradikál, EC: endothelsejt, NET: neutrophil extracelluláris csapda, PMP: thrombocyták-eredetű mikropartikula, ECM: extracelluláris mátrix, PAMP: patogén-asszociált molekuláris mintázat. Forrás: Dewitte és munkatársainak 2017-es közleményéből adaptálva [69].

Az endothelsejt diszfunkció kialakulásában a miRNS-ek káros expressziója is aktívan részt vesz. Ilyenkor számos fehérvérsejt- és endothelsejt-eredetű miRNS szintje változik meg, amiknek nemcsak biomarker, de patofiziológiai szerepük is van [174]. Ezek közül az egyik legfontosabbnak a miR-126 bizonyult, aminek endothelsejt expressziója jelentősen lecsökkent LPS-kezelte egerekben. Ez fokozott endothelsejt apoptózishoz, csökkent proliferációhoz és migrációhoz vezetett, amit a miR-126 célgénjei közül a *SPRED1* és a *VCAM1* gének fokozott génexpressziójával hoztak összefüggésbe [175].

A fehérvérsejtek kezdeti kitapadásában, az ún. „rolling” lezajlásában az egyik központi receptor az ICAM-1, ami a leukocyták transzcelluláris diapedesisében is fontos [176]. Korábban igazolták, hogy súlyos gyulladásban az ICAM-1 receptor nagy mennyiségben expresszálódik az endothelsejtek felszínén IL-1-függő mechanizmus révén az aktivált thrombocyták jelenlétében [177], ugyanakkor proteolitikus hasításra szolubilizálódik [176]. A

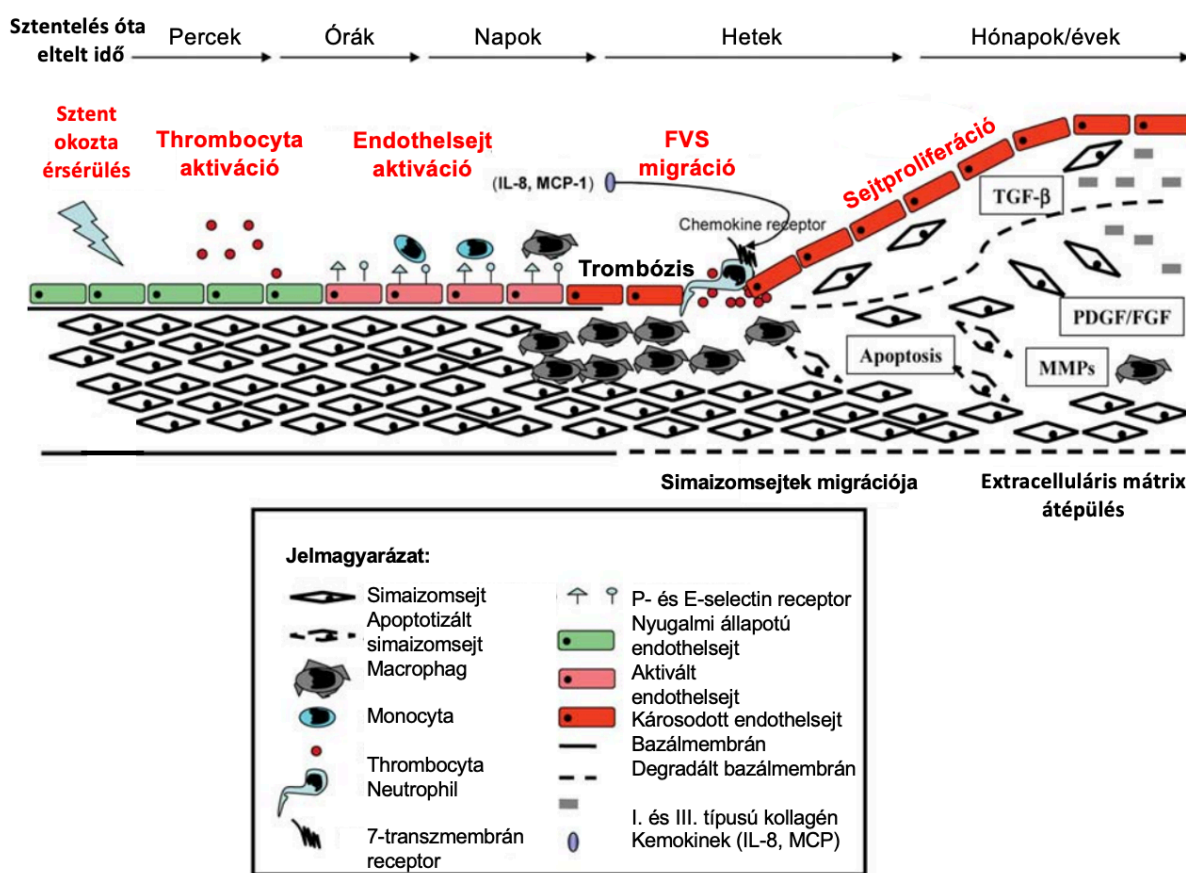
keringő ICAM-1 ráadásul a szepszis egyik megbízható biomarkereként is használható, amely jól korrelál a betegség súlyosságával és a klinikai kimenetellel [178, 179].

Az ICAM-1 receptor expresszióját több miRNS is közvetlenül szabályozza. Gidlöf és munkatársai korábban azt elemezték, hogy 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 [180]. Az ICAM-1 receptor miR-223 általi finomszabályozásával eddig két tanulmány foglalkozott [132, 181], ugyanakkor nem vizsgálták szeptikus viszonyok között. Mivel a miR-223 az egyik legmagasabb expressziót mutató thrombocyta miRNS [138] és a vérlemezke mikropartikulákban is nagy mennyiségben jelen van [130], ezért 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 [155]. Hasonlót figyeltek meg mások miokardiális ischémia-reperfúziós károsodást követően, amikor a miR-141 jelentősen csökkentette az ICAM-1 expresszióját a sérült endothéliumon [182].

2.12 Koronária sztentelést követő endothelsejt diszfunkció és klinikai következményei

Vaszkuláris gyulladással társuló endothelsejt-sérülés nemcsak az előzőekben ismertetett okok (pl. diabetes, fertőzés, súlyosabb esetben szepszis stb.) miatt következhet be, hanem egy invazív terápiás beavatkozás miatt különböző súlyosságú érfalkárosodás jöhet létre, ami korai és késői klinikai komplikációkkal járhat együtt [183]. Ennek következtében percek-órakon belül thrombocyta, majd endothelsejt aktiváció játszódik le (**12. ábra**). Az endothelsejt diszfunkció mellett a mechanikai behatások az érfal médiumában is sérülést okozhatnak, ami számos citokin, növekedési faktor és proteáz felszabadulásához vezethet. A neointima képződés során a gyulladással járó sejtek olyan mediátorokat szabadítanak fel, amely további kemokinek szekréciójához és következményes macrophag infiltrációhoz vezet. Hosszabb távon mindez simaizomsejt proliferációt, migrációt és extracelluláris mátrix átépülést eredményez [184]. 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 [185]. A

diagnosztikus koronária angiográfiával (CA) szemben a PCI egy olyan invazív beavatkozás, ami plakk-rupturát és esetlegesen érfalsérülést okozva jelentősen emelkedett E-selectin és vWF szinthez [186], valamint magas VCAM-1 és TNF- α értékekhez, továbbá csökkent sRAGE („soluble receptor for advanced glycation end products”) plazma koncentrációhoz vezethet [187]. Hasonló összefüggéseket találtunk korábban a thrombocyta aktivációra vonatkozólag: a vérlemezke-eredetű mikropartikulák, a felszíni P-selectin expresszió és a thrombocyta-monocyta aggregátumok mennyisége jóval magasabb volt PCI után, mint CA-t követően [188].



12. ábra Koronárisztentelés okozta akut érfalsérülés után lejátszódó celluláris folyamatok. A vaszkuláris károsodás következtében rövid időn belül thrombocyta és endothelsejt aktiváció következik be, ami többek között fokozott PDGF és P-selectin expresszióhoz vezet a lumenális felszínen. Az endothelsejt diszfunkció mellett a mechanikai behatások az érszakasz médiumában is elváltozásokat okozhatnak, ami számos citokin, növekedési faktor és proteáz felszabadulásához vezet. A neointima képződés, a simaizomsejt proliferáció és migráció, valamint az extracelluláris mátrix átépülés egy lassúbb, akár több hónapig tartó folyamat. Forrás: McDonald és munkatársainak 2012-es közleményéből adaptálva [184].

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 [189, 190]. Trombotikus komplikációkra fokozottan hajlamosító betegségek esetén már a DES-t választják első vonalban, pl. DM2-ben [191, 192]. Klinikai adatok alapján az everolimussal bevont DES megbízhatónak bizonyult AMI-t követően [190], pitvar fibrillációban [193] és stabil anginában [189], 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 szentttrombózis, illetve az ISR kockázata is nagyobb lehet [194]. A DES és a BMS hatékonysága közötti különbségeket számos betegtanulmányban vizsgálták klinikai paraméterekkel, azonban vagy nem vizsgálták közvetlenül a különböző sejtaktivációs markerek szintjét [189, 190, 195-198] vagy a sztentek endothelsejtet aktiváló tulajdonságainak összehasonlításakor eltérő eredményeket kaptak [199-202]. Ezért gondoltuk úgy, hogy további kísérletes adatokra van szükség a kétféle koronáriaszent endothelsejt funkciót befolyásoló hatásának és az ISR új biomarkerekkel való előrejelzésének analízisét illetően.

2.13 Gyógyszeres koronáriaszent 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 [203]. A DES jótékony, ISR-t megelőző hatása a lokálisan egyenletesen felszabaduló gyógyszernek köszönhető, aminek közvetlen, endothelsejt funkciót befolyásoló hatásáról kevés információ állt rendelkezésre [194]. 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 [204]. 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 [205]. Az everolimus analógja a sirolimus (rapamycin) szintén csökkenteni tudta HUVEC sejtekben a TNF- α kezeléssel kiváltott VCAM-1 szintjét az mTORC2 aktivitásának gátlásán keresztül [206]. 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 betegségeken [207], illetve terápiás okokból kialakult érfalsülést követően vizsgálták már [184]. Ezek a miRNS-ek hasznos biomarkernek bizonyultak: a teljes vérben mért miR-1291 és miR-663b mutatta a legnagyobb specificitást AMI-ban a kontroll személyekkel szemben, míg a keringő miR-25, miR-221 és miR-374b a STEMI (ST-elevációval járó miokardiális infarktus) és a NSTEMI (ST-elevációval nem járó miokardiális infarktus) elkülönítésében nyújtott segítséget [207]. A miR-133a, miR-155 és a miR-126 az érfalat érintő különböző celluláris és gyulladós folyamatokban vannak involválva, amelynek köszönhetően potenciális biomarkerek lehetnek a kardiovaszkuláris kórképekben [208, 209]. 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 [210]. 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 [211], amit *in vitro* tovább vizsgáltunk néhány plazma miRNS biomarker szerepének értékelésével együtt.

Az enhanszer RNS-ek (eRNS) a nem-kódoló RNS-ek családjába tartozik [212]. Az eRNS-ek azonosítása RNS szekvenálással történik, míg CHIP szekvenálással az aktív eRNS-eket jelölő markerek (H3K27Ac) és az RNS polimeráz II működése igazolható [212]. 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. Érdekes módon az enhanszer szekvenciák akár több tízezer nukleotid távolságra is lehetnek a kódoló szekvenciáktól az 5' végen [212, 213]. A szekvenálási adatok az NCBI GEO adatbázisában elérhetők és meghatározott génekre fókuszálva újra analizálhatók [214]. 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.

2.14 Krónikus légúti gyulladás által kiváltott bronchiális epithelsejt diszfunkció cisztás fibrózisban

A krónikusan fennálló gyulladásos stimulációknak kitett epithelsejtek vizsgálatára az egyik betegségmodell a cisztás fibrózis (CF). A CF vagy régies néven mucoviscidosis a leggyakoribb életet lerövidítő, autoszomális recesszív öröklődésmentet mutató betegség a kaukázusi populációban, aminek incidenciája kb. 1:2000-1:3000 közé tehető [215]. Az európai populációban a hordozók, vagyis az egészséges heterozigóták aránya kb. 4% [216]. 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 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ioncsatorna, amely a polarizált epithelsejtek apikális membránján helyezkedik el. A szervezet különböző szöveteiben expresszálódik, többek között a tüdőben, a verejtékmirigyekben, a hasnyálmirigyben és az ondóvezetékben [215].

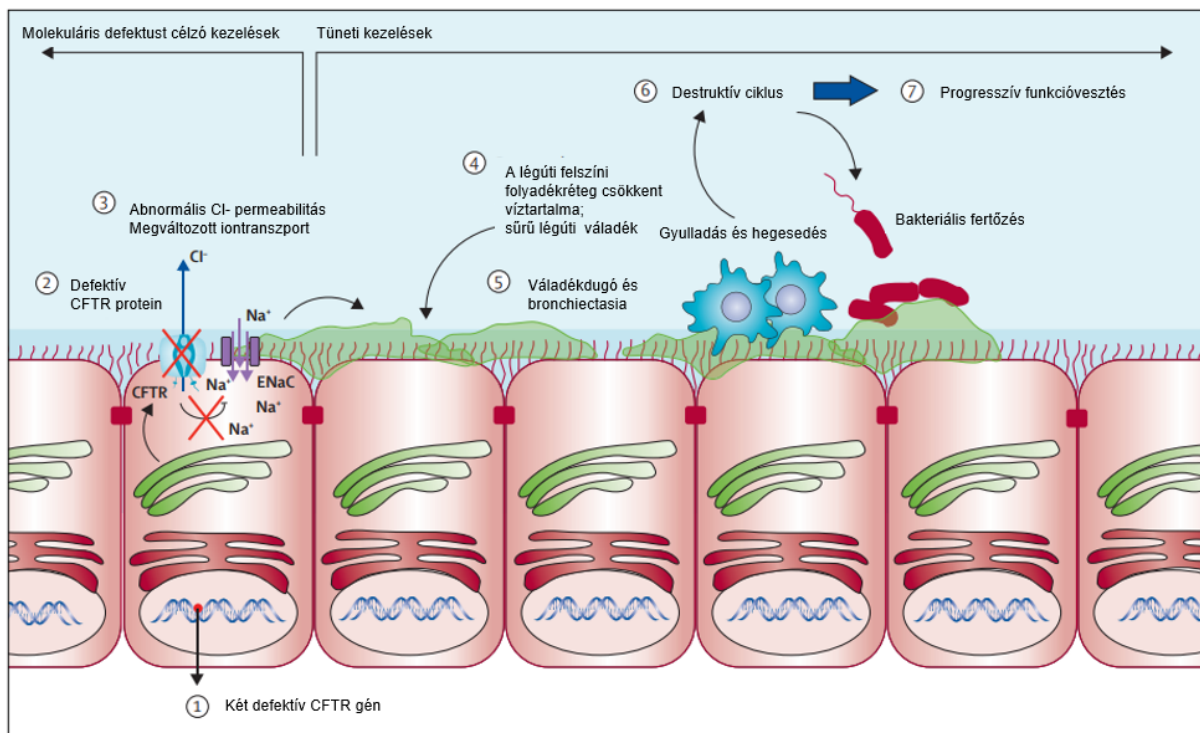
A *CFTR* génnek eddig több, mint 2000 mutációját írták le, és bár nem mindegyikének ismert a klinikai következménye, közülük legalább 1500 bizonyítottan patogén [217]. A legtöbb mutáció igen ritka előfordulást mutat, világszerte csak kb. 20 *CFTR* génmutáció éri el a 0,1%-os gyakoriságot [216]. Az európai, köztük a magyarországi betegpopulációban a leggyakoribb *CFTR* variáns a p.Phe508del (F508del, a régi nomenklatúra szerint delta-F508), amelyet hazánkban a betegek kb. 80-85%-a hordozza homozigóta vagy összetett („compound”) heterozigóta formában [217]. 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 különböző *CFTR* mutációk eltérő mértékben okozhatják a CFTR-csatorna mennyiségi és/vagy minőségi zavarát, ami alapvetően befolyásolja a klinikai tünetek spektrumát és a betegség súlyosságát [218]. A *CFTR* mutációkat funkcionális következményének mechanizmusa alapján jelenleg 7 osztályba soroljuk: az I. és V. osztály mutációi: a CFTR-csatorna csökkent mennyisége, pl. fehérjeszintézis zavara (korai stop kodon, csökkent transzkripció stb.), a II. osztály mutációi: a CFTR fehérje károsodott poszttranszlációs módosítás és a sejtmembránba történő transzportja, a III-IV. osztály mutációi: zavart csatorna nyitási frekvencia, illetve kóros konduktancia normális mennyiségű CFTR-csatorna mellett, a VI. osztály mutációi: fokozott lebomlás miatti instabil CFTR, és végül a VII. osztály mutációi: a CFTR mRNS hiánya [219].

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 (**13. ábra**). 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 [220, 221]. A savas közegben a légúti váladékban lévő mucinok összecsapzódnak CF-ben, ami a víztartalomtól függetlenül is nagy mértékben rontja a légutak öntisztulási működését [215].

A betegség prognózisát, az életminőséget és a mortalitást leginkább a tüdőbetegség súlyossága határozza meg, amelynek folyamatai már csecsemőkorban elkezdődnek [222]. A dehidrált, viszkózus váladék eleinte kislégúti obstrukcióhoz vezet, emellett kedvező környezetet teremt különböző kórokozók megtelepedésének. A leggyakoribb kórokozó fiatal korban a *S. aureus*, az életkor előrehaladtával pedig a progressziót nagymértékben fokozó *P. aeruginosa* kolonizáció válik egyre gyakoribbá [222]. A bakteriális fertőzés gyulladást indukál, amit masszív neutrophil granulocytá beáramlás, valamint a gyulladással kapcsolatos citokinek, úgy, mint az IL-8, IL-6 és TNF- α fokozott expressziója jellemez. A TLR-ek számos bakteriális termék, pl. LPS felismerése révén az NF- κ B jelátviteli útvonalon keresztül közvetítik a gyulladással kapcsolatos aktivációt [223]. A krónikus légúti gyulladás végsősoron a hörgők, majd a tüdőszövet károsodásához vezet, és ez idővel légzési elégtelenséget, valamint a tüdőfunkció végleges leromlását okozza [224].



13. ábra A tüdőbetegség kialakulásának kóroki folyamatai cisztás fibrózisban. A CFTR defektus a légúti hámfelszínen lévő folyadék réteg megváltozott összetételének köszönhetően károsítja a légutak tisztulását és kedvező feltételeket teremt a kórokozók megtelepedésének, ami krónikus légúti gyulladáshoz, végsősoron szöveti károsodáshoz és progresszív funkcióromláshoz vezet. A folyamat elején beavatkozó, a molekuláris defektus helyreállítására törekvő CFTR-specifikus terápiák megelőzhetik a végstádiumú tüdőbetegséghez, a tüdőfibrózishoz vezető progressziót. Forrás: De Boeck és Amaral 2016-os összefoglaló közleményéből adaptálva [224].

Meggyőző adatok utalnak arra, hogy a CF-re jellemző fokozott gyulladáshoz vezető válasz a légutakban nem kizárólag szekunder módon, tehát infekciók hatására alakul ki, hanem szerepet játszanak a defektív CFTR-hez köthető proinflammatorikus folyamatok is. A CFTR diszfunkció számos immunológiai esemény kóros regulációjához vezet, mint pl. az alacsonyabb NO szintézis az alsó légutakban, antiinflammatorikus és antioxidáns mechanizmusok csökkent működése, valamint a macrophagok gátolt sejtölő aktivitása [223]. Ezen túlmenően az epithelsejtekben a MAPK fehérje és az NF- κ B-dependens jelátviteli útvonalak fokozott aktivitása is jellemző [225]. 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 TNF- α által indukált NF- κ B útvonal aktivitására a légúti epithelsejtekben, míg a CFTR-csatorna szelektív funkció gátlása jelentősen növelte az NF- κ B jelátviteli aktivitását. Mindezek alapján a CFTR fehérje gyulladáscsökkentő hatásának kifejtéséhez az ép csatornafunkciója látszik szükségesnek [226]. Ennek is köszönhető, hogy az igen hamar jelentkező pulmonális fertőzések hatására a normálisnál intenzívebb gyulladáshoz vezető válasz alakul ki, amit a neutrophil granulocyták dominanciája és a tüdőkárosodással összefüggő fokozott neutrophil elasztáz (NE) aktivitás jellemez [225].

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 [227]. A tüdőben nagy mennyiségben expresszálódnak, így a tüdő homeosztázisának fenntartásában és a proteolitikus hatások elleni védelemben játszhatnak szerepet [228]. 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 [229]. Az Elafin (WFDC14) szintén a légúti epithelsejtekben és az aktivált macrophagokban expresszálódik, és képes a *P. aeruginosa*-t opszonizálni *in vitro* [229].

A HE4 (másnéven WFDC2) fehérje expresszióját számos egészséges és malignus szövetben előzetesen kimutatták [230]. A klinikumban elsőként ováriumdaganatban [231],

majd endometrium carcinomában [232] és tüdőtumorban [233] 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 [228]. 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*.

2.15 Új biomarkerek tesztelése CFTR moduláló kezelésben részesülő cisztás fibrózisos betegekben

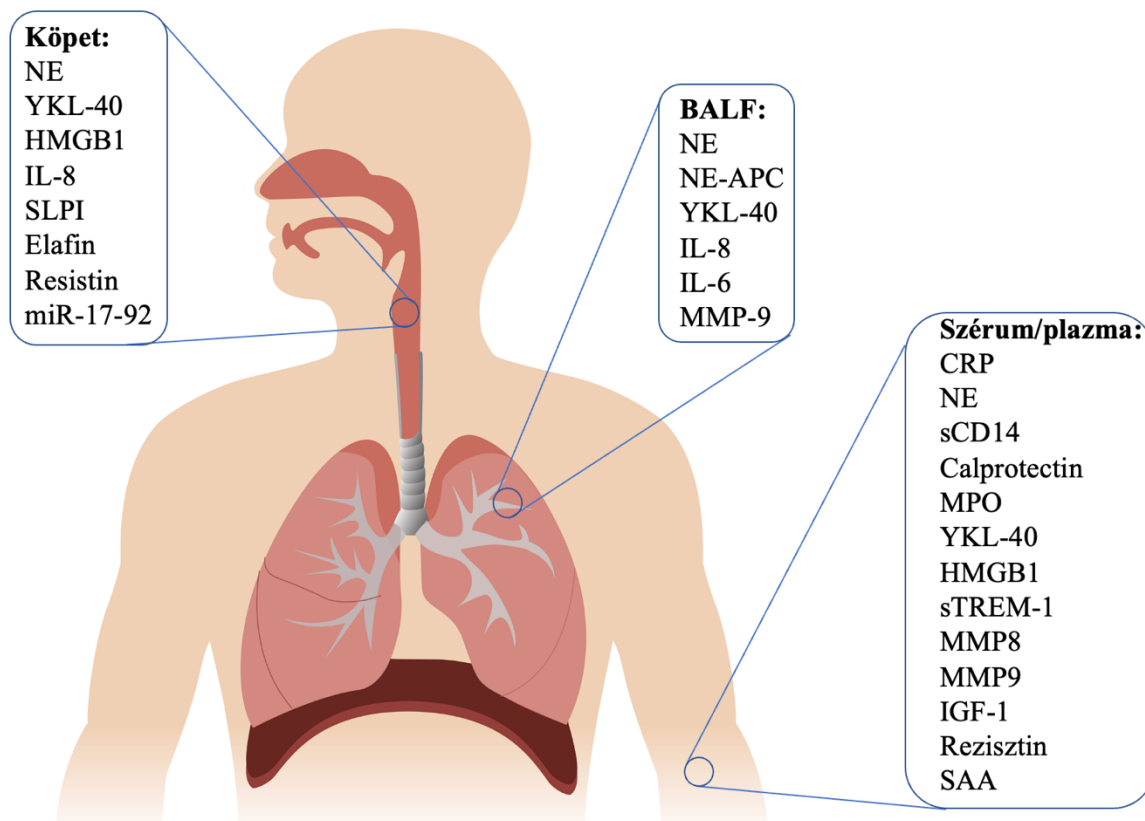
A CF diagnózisának alappilléreit a klinikai gyanú felismerése (klinikai tünetek, családi anamnézis és/vagy az újszülöttkori szűrés pozitív eredménye alapján) és a CFTR diszfunkció bizonyítása jelenti. Ez utóbbi igazolható kórosan magas verejtékklorid koncentráció (> 60 mmol/L) két, egymás utáni időpontban történő mérésével, illetve két *transz*-helyzetű patogén *CFTR* mutáció azonosításával [234]. Mára hazánkban is rutinszerűen történik a teljes *CFTR* gén szekvenálása, ami > 98%-os szenzitivitással képes detektálni a kóros allélpárt [235]. A mutációanalízis kiemelt szerepet kapott nemcsak a végső diagnózis felállításában és a prognózisbecslésben, hanem az új mutációspecifikus gyógyszeres kezelési lehetőségek kiválasztásában is [236].

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 sejtfelszínre már expresszált CFTR ioncsatorna funkcióját (potenciátorok) [237]. A CFTR potenciátor *ivacaftor* (Kalydeco®) a kloridcsatorna nyitási frekvenciáját fokozza, így eredményesen alkalmazható a III. osztályú, ún. kapumutációt (pl. G551D, p.Gly551Asp) hordozó CF-es betegekben [238]. A CFTR korrektorok, mint például a *lumacaftor*, *tezacaftor* vagy *elxacaftor* a csatornafehérje intracelluláris érési folyamatát és a sejtfelszínre 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 [237]. 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 [239-241]. A *lumacaftor/ivacaftor* (Orkambi®) [239] vagy a *tezacaftor/ivacaftor* (Symdeco®) a p.Phe508del

homozigóta betegekben [240], míg a legújabb hármas kombináció, a *tezacaftor/elixacaftor/ivacaftor* (Kaftrio®) [241] 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 bekövetkezése 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 [238-241].

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 FEV₁ % csökkenése prediktív értékkel bír a pulmonális exacerbáció, a bakteriális kolonizáció, és az esetleges elhalálozás előrejelzésében, míg csökkent értéke jól korrelál a tüdőbetegség progressziójával [242]. Ugyanakkor a FEV₁ %-os értéke fiatal CF-es betegekben, valamint enyhe tüdőérintettség esetén nem elég érzékenyen követi az intrapulmonális folyamatok változásait és bizonyos terápiás beavatkozások hatékonyságát, ráadásul kisgyermeknél a spirometria sok esetben technikai nehézségekbe is ütközhet [242]. A CFTR modulátor kezelése alatt a verejték klorid koncentráció gyors csökkenése igazolja a javuló CFTR funkciót [238]. Elegendő mennyiségű verejtekinta gyűjtése csecsemőkorban azonban újabb technikai nehézséget jelenthet. A verejték klorid koncentráció mérés értékelését ráadásul nehezíti a nagymértékű intra- és interindividuais variabilitás [243]. Korábbi CFTR potenciátor kezeléseket vizsgáló tanulmányok *post-hoc* analízise során arra jutottak, hogy a verejték klorid koncentráció változásai populációs szinten ugyan összefüggtek a légzésfunkciós változásokkal, de egyéni szinten nem jósolták meg a CFTR modulátor kezelés hasznosságát [244].

Tekintettel arra, hogy a CF-es légúti betegség patomechanizmusának alapvető folyamatait a krónikus légúti gyulladás jelenti, a betegség követésének egyik fontos lehetőségét adhatja a gyulladáshoz vezető mediátorok detektálása vérből vagy a légúti felszínről származó (köpet és/vagy bronchoalveoláris mosófolyadék, BALF) mintákból (**14. ábra**).

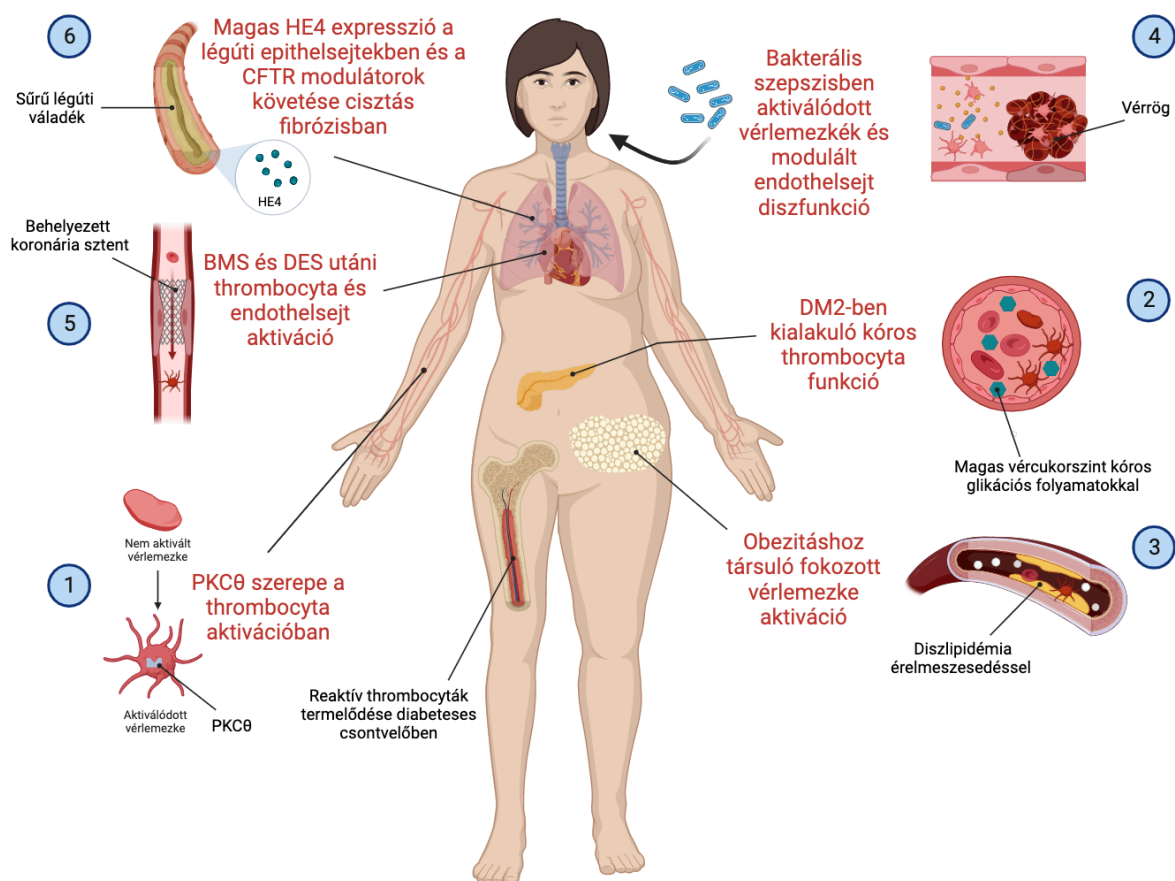


14. ábra A köpet, a BALF és a szérum/plazma mintákban mérhető, a CF-es tüdőbetegség, illetve az ahhoz társuló gyulladásos folyamatok követéséhez ismert biomarkerek a HE4-es vizsgálataink előtt. BALF: bronchoalveoláris lavage folyadék, miR: mikroRNS, NE: neutrophil elasztáz, NE-APC: neutrophil elasztáz antiproteáz komplex, HMGB1: high mobility group box 1 protein, SLPI: secretory leukocyte protease inhibitor, CRP: C-reaktív protein, sCD14: szolubilis CD14, MPO: myeloperoxidáz, sTREM-1: soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1, MMP-8,-9: mátrix metalloproteináz-8,-9, IGF-1: Insulin-like growth factor 1, SAA: serum amyloid A, YKL-1: Chitinase 3-like 1. Az ábra a Biorender.com program alkalmazásával készült.

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 [245]. A légutakban korábban fokozott pozitivitást mutató HE4 fehérjét [228] viszont munkacsoportunk előtt még nem vizsgálták gyulladásos 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 (15. ábra). Ezen sejtes változásokat kívántuk modellezni *in vitro* kísérletsorozattal sejt kultúrát vagy egérmodellt használva, továbbá *ex vivo* betegminták analízisével új biomarkereket értékeltünk.



15. ábra A disszertációban bemutatásra kerülő különböző vizsgálatsorozatok képes összefoglalója. Hat eltérő kórképben vizsgáltuk a gyulladás hatására kialakult sejtaktivációs mechanizmusokat, amelyek egyrészt celluláris diszfunkcióhoz vezettek, másrészt olyan RNS szintű, illetve fehérje expresszió változásokkal jártak együtt, amiket új biomarkerként *ex vivo* betegmintákban is analizáltunk az adott kórkép súlyosságának követésére. A számok az egyes témák ismertetési sorrendjét jelölik. Az ábra a Biorender.com program alkalmazásával készült.

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 aggregáció, az α Ib β 3 integrin aktiváció 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?

- Értékeltek 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 vérlemezkék aktiváltsági állapota obezításban, és a P2Y12 receptor mediált szignálút vonalnak 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 I**II** 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 hiperkoleszterinémiás 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 vérlemezkékben 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 *VCAMI* 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. A használt laboratóriumi módszereket nem közleményenként elkülönítve, hanem egységesítve mutatom be, mivel számos technikai átfedés volt az egyes tanulmányok között.

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 hipertónia definiálása a U.S. National Heart, Lung and Blood Institute által kiadott JNC7 irányelv alapján történt, miszerint a vérnyomás értéke $\geq 140/90$ Hgmm volt és/vagy vérnyomáscsökkentő gyógyszeres kezelés állt fenn. A DM2 diagnózisa az American Diabetes Association 2004-es kritériumrendszere alapján került megállapításra, az éhomi glükózszint $\geq 7,0$ mmol/L, vagy inzulin és/vagy orális antidiabetikumok szedése történt. A diszlipidémia diagnózisa a vizsgálatunk idején használt irányelvek szerint történt: az emelkedett éhomi össz koleszterinszint ($\geq 5,2$ mmol/L), az LDL-koleszterin koncentráció ($\geq 3,4$ mmol/L), és/vagy a lipidcsökkentők rendszeres használata alapján. Az inzulinrezisztencia mértékét a HOMA-IR (Homeostasis model assessment of insulin resistance) kalkulációjával számítottuk ki: $HOMA-IR = \text{glükóz (mmol/L)} \times \text{inzulin (mU/L)} / 22,5$ [246], míg a Plazma atherogén index (PAI) az alábbi képlettel került meghatározásra: $\log(\text{triglicerid (mmol/L)} / \text{HDL-koleszterin (mmol/L)})$ [247]. Kizárási kritériumok közé tartozott a súlyos akut gyulladáshoz, daganatos, autoimmun, valamint a heveny kardiovaszkuláris megbetegedés és trombotikus szövődmények jelenléte, valamint a terhesség. A DM2-ben és obezitásban szenvedő betegek kiválasztásában és a minták eljuttatásában Dr. Káplár Miklós és Dr. Csongrádi Éva (DE Belgyógyászati Intézet) nyújtott segítséget. A carotis IMT meghatározása a klinikus kollégák (Dr. Magyar Mária Tünde, Dr. Oláh László, DE Neurológiai Klinika) által került elvégzésre.

A szepszissel foglalkozó két tanulmányunkba összesen 34 szeptikus beteget válogattunk be. A szepszis és szeptikus sokk diagnózisa az American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus kritériumai alapján történt [248]. 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 thrombocyta funkciógátló kezelés még ne tudja érdemben befolyásolni a vizsgált thrombocyta 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 betegek beválogatásában segítséget nyújtott Dr. Nagy György, Dr. Kerekes György, Dr. Halmi Sándor és Dr. Griger Zoltán (DE, Belgyógyászati Intézet), Dr. Berhész Mariann (DE, Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Klinika), és Dr. Szűcs Ildikó (DE, Tüdőklinika).

A két eltérő koronárisztent-beültetés hatásának összehasonlításához ugyanolyan típusú BMS (n=28) (Integrity[®], Medtronic, Minneapolis, MA, USA) vagy everolimus gyógyszerrel bevont DES (n=21) (Xience[®], Abbott Vascular, Santa Clara, CA, USA) sztentet kapott betegeket válogattunk be. A sztent típusától függetlenül minden beteg 100 mg aszpirin, 600 mg clopidogrel és 100 IU/ testtömegre (kg) számított nem-frakcionált heparin kezelésben részesült az operáció alatt. A sztentelés után a betegek 75 mg/nap clopidogrelt kaptak a BMS beültetés esetén 1 hónapon keresztül, míg DES esetén 1 évig, ami az 1. hónap végéig tartó betegkövetést nem befolyásolta. A betegek beválogatásában Dr. Szűk Tibor nyújtott segítséget (DE, Kardiológiai Intézet).

A három cisztás fibrózis klinikai tanulmányunk közül az elsőbe összesen hat magyarországi CF centrumból (Debreceni Egyetem, Gyermekgyógyászati Intézet, Debrecen; Kenézy Gyula Megyei Kórház, Debrecen; Szent-Györgyi Albert Tudományegyetem, Gyermekgyógyászati Intézet, Szeged; Heim Pál Gyermekkorház, Budapest; Petz Aladár Megyei Kórház, Győr; Markusovszky Lajos Megyei Kórház, Szombathely) 77 gyermekkorú (18 év alatti) CF-es beteget, valamint független kohorszként egy prágai központból (Department of Pulmonology, Charles University, Prága, Csehország) összesen 57 cseh felnőtt CF-es beteget válogattunk be. Mivel a vizsgálataink ideje alatt hazánkban akkor még CFTR specifikus gyógyszerek nem voltak elérhetők, ezért kénytelenek voltunk külföldi kollaborációk keretén belül mintát igényelni a HE4 további tesztelése érdekében. Az *ivacaftor* kezelés hatékonyságát a HE4-en keresztül 60 CF-es beteg mintáinak segítségével értékeltük, akik olyan nagy klinikai vizsgálatokban szerepeltek, mint az amerikai GOAL- és az ír CORK-tanulmány, illetve bevontunk helyben kezelt ausztrál klinikai eseteket is (Adult CF Centre at The Prince

Charles Hospital, Brisbane, Ausztrália). 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 (Bethesda, MD, USA) biobankból kaptuk további vizsgálatra. Az egyes CF-es betegcsoportokban a verejték klorid koncentráció a Sweat-Chek Conductivity Analyzer (Wescor, Logan, UT, USA) segítségével került meghatározásra az egyes centrumokban. A magyar betegek *CFTR* mutációinak detektálása az Elucigene CF29v2Kit (Tepnel-Diagnostics, Manchester, Egyesült Királyság) alkalmazásával történt, kiegészítve a *CFTR*dele2,3 (21kb) „szláv” mutáció vizsgálatával Sanger-szekvenálással. A beválogatott cseh felnőtt CF-es betegek genotípusának meghatározására Elucigene EU v3 assay-t (Tepnel-Diagnostics) és MLPA kitet (MRC-Holland, Amszterdam, Hollandia) használtak. Három magyar CF-es betegtől és három nem-CF-es recidív bronchitistól szenvedő betegtől hörgőnyálkahártya biopsziás mintavétel történt diagnosztikus bronchosopia során (Dr. Bene Zsolt, DE, Gyermekgyógyászati Intézet). Az utóbbi kontroll csoportban a bronchoscopiára a ziháló epizódok háttérének tisztázása és a centrális légúti szűkület kizárása céljából került sor.

Az életkorban és nemből 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. Kizárási kritériumok közé tartozott bármilyen gyulladáso, daganatos, autoimmun, kardiovaszkuláris betegség, valamint a terhesség és az akut trombózis. 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 beleegyező nyilatkozatot töltött ki, hogy részt vesz az adott vizsgálatban.

4.2 Egérmodellek

A *PKC θ ^{-/-}* és a C57Bl/6 WT egerek, valamint az *LDLR^{-/-}* és az ahhoz tartozó C57Bl/6 WT egerek a The Jackson Laboratory-ból (Bar Harbor, ME, USA) kerültek beszerzésre. Az előbbi egértörzseket a Temple Egyetem Központi Állatházában (Philadelphia, PA, USA) tartottuk fenn, míg az utóbbiakat a Jefferson Egyetem Központi Állatházában (Philadelphia, PA, USA) nevelték fel. Mindkét egérmodell esetén a kísérletek előtt az adott Állatház biztosította az állatok genotípusának ellenőrzését. Amíg a *PKC θ ^{-/-}* 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, TD88137) (Harlan Teklad, Madison, WI, USA), vagy iii) „Paigen” diétán (7,5% kakaóvaj, 15,8% telített zsír, 1,25% koleszterin, 0,5% Na-kolát; TD88051) (Harlan Teklad). 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 PKC θ vizsgálatokhoz a perifériás humán vérmintákat a Temple Egyetemen (Philadelphia, PA, USA) dolgozó egészséges önkéntesektől és dolgozóktól gyűjtöttünk össze. A vérminta olyan csövekbe került levételre, amelyek 1:6 arányban tartalmaztak ACD-t (acid-citrát-dextróz) (2,5 g Na-citrát, 1,5 g citromsav és 2 g glükóz 100 mL desztillált vízben). A citráttal antikoagulált teljes vérmintát 230 g-n 20 percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk thrombocyta-gazdag plazma (PRP) kinyerése érdekében. A PRP mintát 1 mM-os acetilszalicilsavval (aszpirin) 30 percig 37 °C-on előkezeltük, majd még 15 percig állni hagytuk. Ezután a PRP mintát 10 percig 980 g-n szobahőmérsékleten tovább centrifugáltuk thrombocyta „pellet” (csapadék) nyerése érdekében. A vérlemezkéket ezután Tyrode pufferben reszuszpendáltuk (138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 3 mM NaH₂PO₄, 5 mM glükóz, 10 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanesulfonilsav) és 0,2% BSA, pH 7,4) 0,1 U/mL apirázzal. A sejtszám meghatározás révén 2×10^8 thrombocyta/mL-re állítottuk a vérlemezkék számát.

Az altatásban lévő egerekből a teljes vérminta a vena cava-n keresztül került levételre olyan csöbe, amely 1:10 arányban 3,8%-os Na-citrátot tartalmazott. A vörösvértesteket centrifugálással (100 g, 10 perc, szobahőmérséklet) eltávolítottuk. A PRP leszívásra került és a „pellet”-et további szedimentációval (400 g, 10 perc) nyertük ki, amit Tyrode pufferben (pH 7,4) 0,1 U/mL apirázzal reszuszpendáltunk, majd beállítottuk a vérlemezkészámot.

4.4 Vérlemezke aggregáció és δ -granulum szekréció vizsgálat

A mosott humán thrombocyták mintánként 500 μ L-t, a mosott egérvérlemezkékből 250 μ L-t használtunk a lumiaggregométeren (Chrono-Log). Az aggregáció mértékét a fénytranszmisszió mérésen keresztül, keveréses körülmények (900 rpm) között 37 °C-on állapítottuk meg. A thrombocyta aggregáció kiváltásához különböző thrombocyta agonistákat használtunk, egyes kísérletekben előzetes inkubáció történt a PKC θ specifikus antagonistákkal RACK vagy kontroll peptiddel 15 percig 37 °C-on. Minden mintát min. 3 percig hagytuk aggregálni. A δ -granulum szekréció mértékét - párhuzamosan az aggregációval - a felszabadult

ATP mennyiségének ($\text{nmoL}/10^8$ thrombocytá) lumineszcenciás mérésével határoztuk meg Lumi-chrome reagenst használva.

Egy másik vizsgáltunkban az LPS okozta vérlemezke aggregáció analízisekor a humán PRP mintákat Re-LPS-sel vagy S-LPS-sel ($0,1\text{--}10 \mu\text{g}/\text{mL}$) önmagában, illetve TRAP-pal ($5 \mu\text{M}$) együtt stimuláltuk és min. 5 percig követtük az aggregáció lejátszódását.

4.5 Humán thrombocytá minták *in vitro* aktiválása különböző agonistákkal

Szepszises körülményeket „mimikálva” egészséges egyének ($n=5$) PRP mintájából készített LDP mintákat LPS-sel (O55:B5, $100 \text{ ng}/\text{mL}$), LBP-vel ($100 \text{ ng}/\text{mL}$) és szolubilis CD14-gyel ($150 \text{ ng}/\text{mL}$) együtt, vagy PBS-sel (negatív kontroll) kezeltük 4 órán keresztül 37°C -on. Pozitív kontrollként TNF- α -val ($100 \text{ ng}/\text{mL}$) stimulált mintákat használtunk. A vérlemezkéket ezután centrifugáltuk (1500 g , 15 perc, szobahőmérséklet), és a vérlemezke pellet-et $750 \mu\text{L}$ TRI reagenssel lizáltuk és az RNS izolálása előtt -20°C -on tároltuk. A mintákból RT-qPCR mérésel IL1B és SELP mRNS szintet vizsgáltunk.

In vitro stimuláltuk a thrombocytákat mikropartikula termelés indukálása céljából, ezért egészséges egyének ($n=6$) LDP mintáit TRAP-pal ($40 \mu\text{M}$) kezeltük 2 órán keresztül 37°C -on. A vérlemezkéket ezután centrifugáltuk (1500 g , 15 perc, szobahőmérséklet), és a vérlemezke pellet-et 1 mL , míg a $250 \mu\text{L}$ thrombocytá felülúszót $750 \mu\text{L}$ TRI reagenssel lizáltuk és az RNS izolálása előtt -20°C -on tároltuk. A mintákból RT-qPCR mérésel miR-223 szintet vizsgáltunk, hogy a TRAP aktiváció hogyan befolyásolta a vérlemezkek és a keletkezett mikropartikulák miRNS tartalmát.

4.6 Trombózis *in vivo* vizsgálata egérmodellben

A PKC $\theta^{-/-}$ és WT egereket intraperitoneálisan beadott pentobarbitállal ($40 \text{ mg}/\text{tkg}$) altattuk. A jobb oldali carotis kireparálása után egy miniatűr Doppler áramlási fejet (Transonic Systems, Ithaca, NY, USA) helyeztünk az artéria felszínére. Először normál sóoldatot helyeztünk a vizsgált területre a Doppler monitorozás megkezdésekor, és a kiindulási véráramlást Transonic T402 áramlásmérővel követtük. 10%-os FeCl_3 oldattal átitatott Whatman filterpapírt ($1 \times 1 \text{ mm}$) (Maidstone, UK) a carotis adventiciális felszínére helyeztük, közvetlenül az áramlási fej mellé. Két 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 ($0 \text{ mL}/\text{min}$) eltelt idő alapján állapítottuk meg. A kísérletek alatt az operátor az egerek genotípusát nem ismerte.

4.7 Immunprecipitáció

A mosott humán thrombocytaikat 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 mintákat ezután centrifugáltuk 10.000 g-n 10 percig 4 °C-on, hogy elkülönítsük a citoszkeletális elemeket. A felülúszó leszívása után a Syntaxin-4 specifikus immunprecipitáló antitestet adtuk a mintához 1:100 hígításban 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 3x mostuk 1x lízis pufferben és a fehérjéket leoldottuk 3x Na-dodecil-szulfát (SDS) mintapufferrel DTT (100 mM) 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 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 (Tris-buffered saline with Tween) (20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1% Tween 20) használtunk 5%-os BSA mellett 60 percig szobahőmérsékleten, majd 4 °C-on inkubáltuk a membránt az elsődleges antitesttel (TBST-ben 5% BSA-val). Elsődleges antitestként foszforilált-(Thr538)-PKC θ , illetve össz-PKC θ ellenes monoklonális antitestet, továbbá foszforilált-(Thr202/Tyr204)-ERK és össz-ERK ellenes antitestet, vagy foszforilált-(Ser473)-Akt és össz-Akt ellenes antitesteket használtunk. Háromszor 5 perces TBST-ben való mosás után a membránt alkalikus foszfatázzal jelölt másodlagos antitesttel (1:10.000 hígítás TBST 5% BSA-val) 1 órán át szobahőmérsékleten kezeltük. A mosási ciklusokat követően a membránt CDP-Star kemilumineszcens szubsztráttal 10 percig inkubáltuk, és az immunreaktivitást Luminescent Image Analyzer model LAS-3000 CH (Fujifilm, Tokió, Japán) készülék segítségével detektáltuk.

A szepszises vizsgálatsorozatban a humán thrombocyta Dicer1 és a P-selectin fehérje mennyiségi változását is western blottal analizáltuk. A szeptikus betegek és egészséges egyének mintáiból szeparált vérlemezkéket egy proteáz-inhibitor keveréket tartalmazó RIPA pufferben lizáltuk. A fehérjéket 7,5%-os poliakrilamid gélen elektroforézissel elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra vittük át. A nem specifikus kötődések elkerülése érdekében (blokkolás) 5%-os BSA tartalmú TBST puffert használtunk. Elsődleges antitestként a Dicer1

vizsgálatakor egy monoklonális anti-humán Dicer1 (1:100) antitestet, a szeptikus és kontroll thrombocyták P-selectin tartalmának detektálásakor egy monoklonális anti-humán P-selectin (1:100) antitestet alkalmaztunk. A különböző minták egységes fehérjefelvitelének igazolásáért anti- β -actin antitestet (1:1000) használtunk egy éjszakán keresztül. Másodlagos antitestként HRP-konjugált egér ellenes antitestet (1:100.000) használtunk és a membránokat 1 órán át inkubáltuk. Az immunreakciót az Immobilon Western Chemiluminescent HRP szubsztráttal tettük láthatóvá. Végül a P-selectin, illetve a Dicer1 fehérjesávok relatív intenzitásának meghatározását a β -actin sávokra történt normalizációval végeztük el.

4.9 Vérlemezke-eredetű mikropartikulák izolálása

A PRP felső részét egy másik csőbe pipettáztuk – közben fokozottan ügyelve a leukocytá kontamináció elkerülésére – és tovább centrifugáltuk (1500 g, 15 perc, szobahőmérséklet), hogy thrombocytá-szegény plazmát (PPP) kapjunk. A PPP-t még tovább centrifugáltuk (13.000 g, 2 perc, szobahőmérséklet), hogy megszabaduljunk a vérlemezkékből származó törmelékektől. Ezt követően a mikropartikulákat két centrifugálási lépéssel (16.100 g, 45 perc, szobahőmérséklet) nyertük ki. A két centrifugálás között a mikropartikula pellet-et PBS-sel mostuk. A thrombocytá mikropartikulák mennyiségét áramlási citometriával határoztuk meg (lásd alább).

4.10 Áramlási citometriai vizsgálatok

A teljes perifériás vérmintákat 0,105 M nátrium-citrátot tartalmazó Vacutainer® csövekbe (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) vettük le. A 40 μ L teljes vért 1 mL 1%-os PFA/PBS oldattal fixáltunk (60 perc, szobahőmérséklet), majd a vérlemezkéké azonosítására FITC-el konjugált CD42a ellenes antitestet használtunk, míg a P-selectin detektálásához a sejteket PE-el konjugált CD62P specifikus antitesttel jelöltük (20 perc, szobahőmérséklet). 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, majd a dupla pozitív események alapján azonosítottuk. Minden előkészített mintából 60 másodpercig gyűjtöttük áramlási citométerrel, majd az FSC-SSC (forward scatter-side scatter) paraméterek alapján történt a kapuzásuk. A mikropartikula számot az egységnyi idő alatt begyűjtött eseményszámból határoztuk meg az össz thrombocytá számra normalizálva. A

humán thrombocyták és mikropartikulák analízisét FC-500 áramlási citométerrel (Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA) végeztük.

A mosott egér thrombocytá mintákat a felszíni P-selectin receptorra specifikus (CD62-FITC antitesttel), valamint az aktivált α IIb β 3 receptor ellenes JON/A-PE antitesttel analizáltuk. A thrombocyták azonosítása az anti-CD61-PE antitesttel történt, és a mintákat az agonista hozzáadása után 15 percig 37 °C-on sötét körülmények között aktiváltuk. A vérlemezkék aktiválásának letelte után a fixálás 1%-os PFA-val történt. Az egér thrombocytá méréseket FACSCalibur áramlási citométeren (BD Biosciences) végeztük el.

4.11 Fehérvérsejt-depletált thrombocyták előkészítése és minőségi ellenőrzése

A fehérvérsejtek eltávolításához CD45-ellenes antitesttel bevont mágneses gyöngyöket használtunk. A PRP mintákat (2 mL) és az antitestet 30 percen keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd 2 x 2 perc mágneses szeparálást végeztünk. Az így nyert vérlemezke szuszpenziót lecentrifugáltuk (1500 g, 15 perc, szobahőmérsékleten) és a thrombocytá „pellet”-et 1 mL trizol reagenssel lizáltuk, majd az RNS izolálásig -20 °C-on tároltuk.

A fehérvérsejt-depletált thrombocytá (LDP) minták tisztaságának ellenőrzése áramlási citometriai (FACS CantoII, Becton Dickinson) és RT-qPCR mérésekkel történt. A fehérvérsejt depletált vérlemezke mintákat (40-40 μ L) FITC-el konjugált CD42a ellenes, CD45 ellenes és IgG₂ (izotípus kontroll) antitestekkel jelöltük (20 perc, szobahőmérséklet), majd kétszer mostuk PBS-el és 1%-os PFA/PBS oldattal fixáltuk (60 perc, szobahőmérséklet). A fehérvérsejt/vérlemezke arányt áramlási citométerrel határoztuk meg, míg az RT-qPCR módszerrel mértük meg a PTPRC (CD45) és ITGA2B (CD41) mRNS-ek expresszióját.

4.12 Különböző sejtvonalak tenyésztése, differenciálódása és kezelése

A megakaryocytá funkciók diabeteses és szeptikus körülmények között történő vizsgálata érdekében a humán megakaryoblastos leukémia sejtvonalat, a MEG-01 sejteket (Cell Applications Inc, San Diego, CA, USA) használtuk hasonlóan több más kutatócsoporthoz az elmúlt években [249-253]. A sejteket 10% FBS-t, 100 U/mL Penicillint, 100 μ g/mL Streptomycint és 2 mM L-glutamint tartalmazó RPMI-1640 médiumban tenyésztettük 37 °C-on, 5%-os CO₂ és 95%-os relatív páratartalom mellett. Az optimális sejtszám az úszó sejtek esetében 0,3 x 10⁶ db sejt/mL volt. A hiperglikémiás körülmények egy korábbi közlemény alapján kerültek kialakításra [254], 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 kísérletsorozatunkban a MEG-01 sejteket LPS-sel stimuláltuk (O55:B5, 100 ng/mL) LBP (100 ng/mL) és szolubilis CD14 (150 ng/mL) jelenlétében 4-24 órán keresztül a szeptikus milieu modellezése érdekében hasonló körülmények között, mint ahogyan egy korábbi vizsgálatban mások végezték [111]. 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 lejártá után a sejteket steril PBS-sel mostuk, majd 750 μ L TRI reagensben lizáltuk és az RNS izolálásáig a mintákat -20 °C-on tároltuk. A gyulladásoos stimulusok hatására az MK-sejtekben bekövetkező NF- κ B-útvonal aktivációját IL1B mRNS szint meghatározással igazoltuk RT-qPCR módszerrel.

Egyes vizsgált thrombocytá miRNS-ek expressziójának Dicer1 függőségét a generált kóros celluláris körülmények külön is megvizsgáltuk a MEG-01 sejtekben. 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 sejt mintákat LPS-sel, LPS-sel és calpeptinnel együtt, valamint a pozitív kontroll mintákat önmagában calpeptinnel kezeltük. A sejtekhez calpeptint (10-40 μ mol/L) adtunk i) a glükóz kezelés előtt, ii) egyszerre a glükózzal és iii) a glükóz kezelés után 24 órán keresztül, 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 (Dr. Varga Tamás felajánlásából, DE Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) is tenyésztettük a fentebb bemutatott médiumban követe korábbi közlemények leírását [255, 256]. Az optimális sejtszám 0,5 x 10⁶ db sejt/mL volt. Ezeket a sejteket első lépésben 7 nap alatt érett megakaryocytákká differenciáltattuk PMA-val (20 ng/mL). A differenciálódási folyamatot áramlási citometriával (FC-500, Beckman Coulter) a felszíni CD41 és CD61 expressziók mérésével követtük [256]. A CD41 és CD61 pozitív sejtek százalékos arányát és az MFI értékeket 100.000 sejt begyűjtésével határoztuk meg. Ezt követően, az érett K562-megakaryocytákat (K562-MK), a MEG-01 sejtekhez hasonlóan, magas glükóz vagy mannitol (kontroll) koncentrációjú médiummal kezeltük. A differenciáltatás után a K562-MK sejteket az egyre magasabb arányban előforduló apoptotikus sejtek miatt legfeljebb 5 napig tudtuk kezelni. A kezelési időt követően a sejteket steril PBS oldattal mostuk, majd 750 μ L TRI reagenssel lizáltuk és az RNS izolálásig -20 °C-on tároltuk.

A szepsziszes körülmények között vizsgált endothelsejt funkciók analízise érdekében humán koronária artériás endothelsejteket (HCAEC, Cell Applications, San Diego, CA, USA) tenyésztettünk használatra kész MesoEndo Cell Growth médiumban (Cell Applications) 5%-os

CO₂ és 95%-os relatív páratartalom mellett 37 °C-os termosztátban hasonlóan, mint korábban mások is tették egyéb vizsgálatokhoz [257]. A 24-lyukú lemezben letapasztott HCAEC sejteket 1×10^5 /lyuk sejtsűrűség mellett ezután szeptikus betegek vagy kontroll személyek plazmájából izolált mikropartikulákkal inkubáltuk 24 óráig. Ezzel párhuzamosan normál vérlemezke mintákból indukált, majd izolált mikropartikulákkal is elvégeztük a HCAEC sejtek inkubációját TNF- α előkezelés után, hogy a szepszises körülményeket biztosítsuk. Kontroll mintának a sejteket 24 órán át csak TNF- α -val (100 ng/mL) kezeltük. A kezelés után a sejteket egyszer steril HBSS oldattal mostuk, majd 1 mL TRI reagensben lizáltuk és -20 °C-on tároltuk az RNS izolálásáig. 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 modellezésére a HCAEC sejteket (3×10^5 sejt/well) 6-lyukú plate-ben (Sigma) 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. Kontroll mintaként a gyógyszer oldószerét (DMSO) használtuk az előzőekhez hasonló kondíciókban. A kezelést követően a sejtek felülcszóját eltettük ELISA mérésekhez (lásd később), míg a sejteket egyszer mostuk steril HBSS oldattal, 750 μ L trizollal lizáltuk, majd RNS-t izoláltunk.

Ezzel párhuzamosan HUVEC sejteket is fenntartottunk 15% FBS-t, 5 U/mL heparint, 7,5 μ g/mL endothelsejt növekedést segítő kiegészítőt, 1% antibiotikumot és antimikotikumot tartalmazó M-199 médiumban, majd kezeltük a fenti módon. A HUVEC sejteket és a médiumot Dr. Jeney Viktóriától és Dr. Balogh Enikőtől (DE, Molekuláris Medicina Kutató Központ) kaptuk.

A CF-es sejt körülményeket biztosító F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁺ sejtek, illetve a vad típusú CFTR-t (wt-CFTR) mutató sejtek Dr. J. P. Clancy laboratóriumából származnak (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA). A sejtek tenyésztéséhez Earl's BSS-t (EBSS) és 1% L-glutamint tartalmazó Minimum Essential Medium Eagle (EMEM) médiumot használtunk 10%-os FBS és 5 μ g/mL Puromycin hozzáadásával. A sejteket 37 °C fokon, 5%-os CO₂ koncentráció mellett inkubáltuk. A CFBE sejteket 6-well plate-ekbe passzáltuk (250.000 sejt/well), majd 37 °C fokon 24 óráig kezeltük TNF- α -val vagy kontrollként 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. Utóbbi esetekben a negatív kontroll mintákban DMSO-t alkalmaztunk. A CFTR-csatorna aktivitást FSK (10 μ M) és IBMX (100 μ M) kombinációjával (FSK/IBMX) fokoztuk mindkét sejtvonal esetén (a CFTR modulátorral kezelt vagy nem kezelt

sejteknel is), míg a CFTR gátlás céljából CFTR_{inh172}-t (20 µM) adtunk a wt-CFTR-t expresszáló CFBE sejtekhez. A kontroll mintákhoz itt is DMSO-t adtunk. Az NF-κB útvonal HE4 expresszióban betöltött szerepének *in vitro* vizsgálata céljából a proinflammatorikus jelátvitelt specifikusan gátlószerrel, a BAY 11-7082-vel (5 µM) 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 egyaránt.

4.13 ELISA mérések

Az egér thrombocytákból felszabaduló TXA₂ méréséhez az izolált egér vérlemezkéket (250 µL) 3,5 percig aggregáltuk, majd szárazjég-metanolos fürdőbe tettük fixálni. A minták mérés előtt felengedtek szobahőmérsékletre, majd egy gyors centrifugálást követően (15.000 g, 3 perc, szobahőmérséklet) a lizált vérlemezke maradványokat eltávolítottuk. A felülúszók 1:50 arányban kihígításra került az assay pufferrel. A stabil TXB₂ koncentrációkat a Thromboxane B₂ ELISA kittel határoztuk meg duplikátumban a gyártó ajánlásai szerint.

A szépszis és kontroll szérum mintákból, valamint a HCAEC sejtek felülúszóiból az ICAM-1 szinteket Szolubilis ICAM-1 ELISA kit segítségével mértük le a gyártó utasításait követve. Ezen kívül a TNF-α szinteket is lemértük a beteg és kontroll plazma mintákban egy TNF-α-ra specifikus Quantikine® ELISA kit segítségével.

A szolubilis P-selectin koncentrációkat 10-10 random módon kiválasztott szépszis és egészséges plazma mintában határoztuk meg a gyártói ajánlásoknak megfelelően. A P-selectin fehérje mennyiségi meghatározására szintén ELISA-t használtunk a DM2 és egészséges kontroll vérlemezke lizátumokban és plazma mintákban. Az intracelluláris P-selectin analíziséhez a vérlemezkéket (1,25 x 10⁸ db sejt/minta) 1%-os TritonX-100 és proteáz gátló tartalmú lízis pufferrel lizáltuk.

A PCI indukálta thrombocyta aktiváció mértékét a plazmák szolubilis P-selectin, CD40L és PDGF-BB koncentrációk mérésével, míg az endothelsejt aktiváció mértékét szolubilis VCAM-1, ICAM-1, E-selectin és TNF-α plazma koncentrációjának analízisével állapítottuk meg ELISA módszerekkel a kitek leírásának megfelelően.

4.14 RNS izolálás

Az RNS tisztításhoz előkészített vérlemezke és plazma mintákból a TRI reagens gyártói ajánlásainak megfelelően totál RNS-t izoláltunk. A biopsziás mintákat az eltávolítás után izotóniás sóoldatban 4 °C-on steril műanyag csőben tartottuk, amíg a laboratóriumba érkezett,

majd 4 °C-on 1500 g-n 5 percig centrifugáltuk, és a sejt pellet-et -70 °C-on tároltuk az analízisig. Az RNS minták tisztaságát és koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) ellenőriztük. Az RNS-mintákat -80 °C-on tároltuk további analízis előtt.

4.15 TaqMan OpenArray

A thrombocytá, 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 TaqMan OpenArray technológiával (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a gyártó protokollját követve. Első lépésben a különböző mintákból izolált össz RNS-ből (100 ng) komplementer DNS (cDNS) mintákat készítettünk reverz transzkripcióval (TaqMan microRNA RT kit, Applied Biosystems) Megaplex primer pool A és B (Megaplex RT Primers Human Pool Set v3.0) felhasználásával. Ezután egy preamplifikációs reakció következett, TaqMan PreAmp master mix (Applied Biosystems) és Megaplex PreAmp primerek (Set v3.0, Applied Biosystems) felhasználásával. Az így kapott terméket és a TaqMan Open Array Real Time PCR Master Mix-et (Applied Biosystems) tartalmazó PCR reakcióelegyet 384-lyukú lemezre vittük fel és az OpenArray AccuFill rendszer betöltötte a mintákat az előkészített TaqMan OpenArray Human MicroRNA panelekre (Applied Biosystems). Végül a méréseket QuantStudio 12 K Flex qPCR készüléken (Applied Biosystem) végeztük a gyártó által megadott beállítások szerint. A kapott adatokat a Thermo Fisher Cloud System (Thermo Fischer Scientific) és az Expression Suite Software v1.0.3 programmal (Applied Biosystems) analizáltuk. Az adatok normalizálásához az RNU-48-at (LDP), illetve a miR-24-et (plazma) használtuk. A legnagyobb változást mutató miRNS-ek expresszióját UPL próba alapú RT-qPCR módszerrel validáltuk. A méréseket Dr. Pólska Szilárd (DE, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) vezetésével végeztük.

4.16 Intracelluláris és keringő miRNS expressziók analízise

A különböző sejtminták és plazma minták miRNS expresszió meghatározását Czimmerer és munkatársai által korábban kifejlesztett RT-qPCR módszerrel végeztük [258]. A reverz transzkripció során az egyes miRNS-ek specifikusan kerülnek átírásra. A cDNS készítéshez reverz transzkripció kitet (TaqMan MicroRNA RT kit, Applied Biosystems), miRNS specifikus „stem-loop” primert (500 nM, Sigma/IDT) és 10 ng össz RNS-t használtunk. A kvantitatív PCR reakcióban miRNS specifikus forward primert (100 µM, Sigma/IDT),

univerzális reverse primert (100 μ M, Sigma/IDT), UPL próbát (10 μ M, Roche Diagnostics), Taq polimerázt (5 U/ μ L, Thermo Scientific) és dNTP-eket (2,5 mM, Thermo Scientific) használtunk. A reverz transzkripcióban alkalmazott „stem-loop” primer tette lehetővé, hogy a miRNS-ek expressziójának méréséhez ugyanazt a reverse primert (univerzális) és UPL próbát (a 21-es számút) használtuk. A méréseket QuantStudio 12 K Flex qPCR készülékkel triplikátumban végeztük és az eredmények normalizálására az RNU-43 referencia gént használtuk. A reakciókban használt primereket a „miRNA Primer Designed Tool” (<http://genomics.dote.hu:8080/mirnadestool>) szoftverrel terveztük [258]. A miRNS kvantálásához használt primerek szekvenciái az eredeti közleményekben olvashatók.

A plazma mintákban keringő miRNS szinteket is vizsgáltunk. A Na-citráttal alvadásgátolt teljes vérből centrifugálás (170 g, 15 perc, szobahőmérséklet) után PRP-t nyertünk. A fehérvérsejt kontamináció elkerülésére ügyelve a felső mintaréteget óvatosan átpipettáztuk egy tiszta csőbe. A maradék PRP mintákat újra lecentrifugáltuk (1500 g, 15 perc, szobahőmérséklet), így PPP-t kaptunk. Az extracelluláris miRNS-ek analíziséhez 250 μ L PPP-hez 750 μ L TRI Reagenst adtunk és az RNS izolálásig -20 °C-on tároltuk. A keringő miRNS szintek kvantálását a fenti metodikai körülmények között végeztük.

4.17 miRNS mimic és inhibitor transzfektálás sejt kultúrákba

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 a sejteket reszuszpendáltuk 3% FBS-t, 100 U/mL Penicillin és 100 μ g/mL Streptomycin antibiotikumot tartalmazó OPTI-MEM médiumban. A miRVana miR-26b és miR-140 mimic-eket (20 pmol, Ambion, Austin, TX, USA) Lipofectamine RNAiMAX transzfekciós reagens (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segítségével juttattuk be a sejtekbe és alkalmaztuk 24 óráig. Ezzel párhuzamosan negatív kontrollként a sejteket NEG-01 mimic-el (20 pmol) transzfektáltuk a fenti körülmények között.

Az anti-miR-26b és az anti-miR-140 inhibitorokat (40 pmol) a glükózzal nem kezelt sejtekbe transzfektáltuk (24 óra) a Lipofectamine reagenssel. Az eredményeket ebben az esetben is negatív kontrollal (NEG-01, 40 pmol) kezelt sejtekhez hasonlítottuk. A kezelési idők

lejárta után RNS-t izoláltunk és a fentebb ismertetett módon mértük a miRNS és mRNS szinteket.

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. A miR-181b mimic transzfekciót a fentebb ismertetett módon végeztük. Ehhez a HCAEC sejteket 3% FBS-t és antibiotikumot (100 U/mL Penicillin és 100 μ g/mL Streptomycin) tartalmazó OPTI-MEM médiumban vettük fel és a miRVana miR-181b mimic (25 pmol) transzfekcióját Lipofectamine RNAiMAX reagenssel (Invitrogen) végeztük. A 24 órás kezelést követően RNS-t izoláltunk és RT-qPCR módszerrel mértük a miRNS és a cél mRNS expresszió változásokat. Az eredményeket negatív kontroll mimic-kel (NEG-01, 25 pmol) transzfektált mintákhoz hasonlítottuk.

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. A komplementer DNS (cDNS) szintézishez a High Capacity cDNA RT kitért (Applied Biosystems, Vilnius, Litvánia) használtuk a gyártói utasításoknak megfelelően. A vérlemezkék esetén 500 ng, a megakaryocyták mintáknál 1000 ng össz RNS-ből indultunk ki. A CF-es vizsgáltunkban a kezdeti RNS minta koncentrációja 200 ng (bronchoszkópos biopsziás minta), illetve 1000 ng (CFBE sejt kultúra) volt. Ezt követően az RNS-ek mennyiségét SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) és az mRNS-ekre, valamint a pre-miRNS-ekre specifikus primer párok (10 μ M, Integrated DNA Technologies (IDT), Leuven, Belgium) felhasználásával határoztuk meg valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR) módszerrel LC-480 qPCR készüléken (Roche Diagnostics). A HCAEC sejtekben a transzkripciót szabályozó enhanszer RNS-ek mennyiségét szintén SYBR Green I festékkel határoztuk meg RT-qPCR reakcióval. Normalizáláshoz az *RPLP0* (*36B4*) referencia gént használtuk. A mRNS, a pre-miRNS és az enhanszer RNS-ek kvantálásához használt primerek szekvenciái az eredeti közleményekben található táblázatokban kerültek összeszedésre.

A HE4 expresszió kvantálása során a biopsziás minták esetén SYBR Green PCR Master Mix-et (Thermo Scientific), a CFBE sejteknél LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics) reagenst, valamint WFDC2-specifikus oligonukleotid primert (10 μ M, Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium) használtunk. A reakció a következő körülmények között zajlott: 10 percig 95 °C-on, majd 40 cikluson át 95 °C-on 10 sec-ig, illetve 60 °C-on 1 percig. Az összes mérést triplikátumban végeztük. Referenciagénként az *RPLP0*

(36B4) gént használtuk. A HE4 expressziós szintet az alábbi formulával határoztuk meg: $\Delta C_q = C_q^{36B4} - C_q^{HE4}$. A HE4 expressziót az mRNS koncentráció meghatározásával monitoroztuk a CFBE sejtekben 1 órától 1 hétig terjedő időintervallumban történő TNF- α stimulációt követően és a kiindulási állapothoz (PBS hozzáadás mellett) hasonlítottuk. A fentiekhez hasonló metodikai körülmények között történt több gyulladás asszociált génexpresszió (*IL6*, *IL8* és *IL1B*) analízise is az mRNS szintek mérésén keresztül.

4.19 RNS szekvenálás és a szekvenálási adatok elemzése

Az LPS-sel kezelt MEG-01 sejtek globális transzkripció adatainak meghatározásához RNS szekvenálást végeztünk az Illumina Sequencing Platformon (Illumina, San Diego, CA, USA). Ehhez a sejteket ($0,3 \times 10^6$ sejt/mL) LPS-sel és negatív kontrollként PBS-sel kezeltük 4 óráig 37°C-on. Ezt követően a mintákból össz RNS-t izoláltunk és az RNS minta minőségét az Agilent BioAnalyzer segítségével ellenőriztük az Eukaryotic Total RNS Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) alkalmazásával a gyártó ajánlása szerint. A minták RNS-integritás (RIN) értéke > 7 volt, amely megfelelt a további lépésekhez. Ezt követően az RNS mintákból (200 ng) könyvtárakat készítettünk NEBNext® Ultra II RNS Sample Preparation Kit for Illumina (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) használatával a gyártó utasítása szerint. Röviden, a poly-A végű RNS molekulákat oligo-dT-vel konjugált mágneses gyöngyökön izoláltuk és 94 °C-on 15 percig fragmentáltuk. Az egyszálú cDNS minták „random priming” reverz transzkripcióval készültek, és a másik szál szintézise is elkészült, hogy duplaszálú cDNS-t kapjunk. A végek javítása után és az adapter ligációs lépést követően ezek a fragmentek amplifikációra kerültek, és végül könyvtárkészítést végeztünk. A 75 ciklusból álló szekvenálást Illumina NextSeq500 készüléken (Illumina) végeztük el Dr. Póliska Szilárd (DE, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) vezetésével.

A nyers szekvenálási adatokat, az úgynevezett fastq fájlokat a HISAT2 algoritmus segítségével összehasonlítottuk a GRCh37 humán referencia genommal. Az elemzést a StrandNGS szoftver segítségével végeztük el. A szekvenált mintákban eltérő mértékben expresszálandó gének azonosításához és elemzéséhez R-programcsomagokat (pheatmap és ggplot2) használtunk. A nem kezelt és LPS-sel kezelt sejtekben mért gének expressziójában lévő különbséget Tukey *post hoc* teszttel kiegészített ANOVA teszttel állapítottuk meg.

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 (ID: S23756, 40–80 pmol) és negatív kontrollként NEG-01 siRNS-t (Silencer Select Negative Control No. 1) (Invitrogen) transzfektáltunk Lipofectamine RNAiMAX transzfekciós reagenssel (Invitrogen) és inkubáltuk vele 24-48 órán keresztül 37°C-on. A MEG-01 transzfekciót 6 lyukú lemezen végeztük és a sejtszámot $0,3 \times 10^6$ /mL-re állítottuk be, míg a HCAEC sejteket 1×10^5 /lyuk sejtsűrűség mellett tapasztottuk le 24 óráig a transzfekció előtt. Az optimális körülményekhez 3%-os FBS-t, valamint 100 U/mL penicillint és 100 µg/mL Streptomycint tartalmazó OPTI-MEM médiumot használtunk. A transzfekció után a mintákból össz RNS-t izoláltunk. A transzfekció hatékonyságát a Dicer1 siRNS szint mérésén keresztül TaqMan siRNA assay-vel (ID: S23756_asy, Invitrogen) 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 P-selectin gén Thr715Pro polimorfizmusát egy korábbi közleményünkben közölt módszerrel végeztük [259]. A DNS-t antikoagulált humán teljes vérmintából izoláltuk QIAamp DNA blood kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével. Az alábbi primereket használtuk: 5'-TTTCTGCAGCTGTGAAATGC-3' és 5'-ATTGTACCTTGGCAGGTTGG-3'. A PCR reakció 50 µL reakcióközegben került lefuttatásra a következő összetevőkkel: 100 ng DNS, 10 pmol mindkét primer, 200 µM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 10% DMSO és 2 U Taq DNS polimeráz (Roche). Restrikciós fragmens hosszúság polimorfizmus (RFLP) vizsgálattal egy kezdeti denaturáció után (94 °C, 5 perc) következett az amplifikáció 40 ciklusing (94 °C, 30 sec, 60 °C, 60 sec és 72 °C 60 sec), majd a végső extenzió (72 °C 10 perc). A kész PCR terméket (198 bp) ezután Eco91I enzimmel (Fermentas, Vilnius, Litvánia) megemésztettük és a keletkezett termékek 3%-os agaróz gélen kerültek megfuttatásra és UV fény mellett került vizualizálásra ethidium-bromidos jelöléssel. Ha a Thr715Pro mutáció jelen volt, egy új (163 bp) DNS termék is detektálható volt.

4.22 Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok

Az NF- κ B-út vonal aktivációját több különböző sejtvonalban is értékeltük a p65 transzkripciós faktor magtranszlokációján keresztül fluoreszcens mikroszkóppal. A szeptikus körülmények között tartott MEG-01 sejteket 6 lyukú lemezben tenyésztettük 2 napig, majd LPS-sel (100 ng/mL) és kontrollként PBS-sel kezeltük 4 órán keresztül 37°C-on. Ezután HBSS oldattal mostuk a sejteket és jég hideg metanol-acetonnal (50 v/v %) fixáltuk 10 percig 4 °C-on. A sejteket ezután steril mikroszkóp üveglemezre vittük át 5×10^4 sejt/lemez sejtsűrűség kialakításával. A nem specifikus antitest kötőhelyeket FBS-el blokkoltuk 15 percig szobahőmérsékleten. Az NF- κ B p65 alegység elsődleges jelölésére nyúlban termelt anti-humán p65 antitestet (100 μ g/mL) használtunk 1 órán keresztül, majd másodlagos antitestként Alexa Fluor 488-konjugált kecskében termelt anti-nyúl IgG (5 μ g/mL) antitestet használtunk szintén 1 órán át.

A Dicer1 fehérjeszint változását szintén fluoreszcens mikroszkóppal végeztük a MEG-01 sejtekben. A szuszpenziós sejtenyészetet 24 órán át LPS-sel és kontrollként PBS-sel kezeltük 37 °C-on. A fixált sejteket egérben termelt anti-humán Dicer1 antitesttel (2 μ g/mL) jelöltük, majd másodlagos antitestként Alexa Fluor 488-konjugált kecskében termelt anti-egér IgG antitestet (5 μ g/mL) alkalmaztunk.

Annak érdekében, hogy megvizsgálhassuk és igazoljuk az izolált thrombocyta eredetű mikropartikulák internalizációját az endothelsejtekbe, a HCAEC sejteket 8-lyukú lemezekben tenyésztettük 2 napig beállítva az optimális sejtsűrűséget ($0,25 \times 10^5$ sejt/lyuk). Ezt követően a sejteket szépsziszes vagy kontroll személyek mintáiból izolált mikropartikulákkal vagy PBS-sel (kontroll minta) kezeltük 24 órán keresztül 37°C-on. A mikropartikulák endothelsejtekbe való bejutásának megakadályozása érdekében a HCAEC sejteket 6 óráig 4 °C-on inkubáltuk a szeptikus plazma mintákból nyert mikropartikulákkal, így megelőzve a PMP-k endocitózist, mint ahogyan mások korábban végezték. [260, 261] A fluoreszcens jelöléshez a HCAEC sejteket anti-CD146-PE antitesttel inkubáltuk 1 órán át, míg a mikropartikulákat anti-CD42a-FITC antitesttel jelöltük.

A leukocyták endothelsejtekhez történő adhéziójának *in vitro* követését fluoreszcens mikroszkópiával végeztük. Ehhez a vizsgálatához a sejteket 8-lyukú lemezekben (Millicell® EZ slide) tenyésztettük 2 napig $0,25 \times 10^5$ sejt/lyuk sejtsűrűséget alkalmazva. A HCAEC sejteket ezután szépsziszes mintából nyert mikropartikulákkal vagy PBS-sel (kontroll minta) előkezeltük 24 órán át 37°C-on. A kísérlethez perifériás mononukleáris sejteket (PBMC) szeparáltunk normál minták „buffy coat” részéből Ficoll-Histopaque-1077 felhasználásával. Az izolált fehérvérsejteket TNF- α -val (10 ng/mL) stimuláltuk 30 percig, majd 1 órán át 37°C-on a

HCAEC sejtekhez adtuk. Az inkubáció után a nem kötődött leukocytákat háromszor mostuk HBSS-sel. A HCAEC sejteket anti-CD146-PE antitesttel, míg a leukocytákat anti-CD45-FITC antitesttel jelöltük.

A koronárisztent okozta - NF- κ B útvonalon keresztül történő - endothelsejt aktiváció vizsgálata érdekében a letapadó HCAEC sejteket 12-lyukú plate-ben elhelyezett steril mikroszkóp lemezekben tenyésztettük 5×10^4 sejt/lemez denzitással. A HCAEC sejteket 1 órán keresztül stimuláltuk TNF- α -val (100 ng/mL) everolimus (0,5 μ M) vagy DMSO (kontroll) jelenlétében. Ezt követően a sejteket kétszer mostuk steril HBSS oldattal és jéghideg metanol-aceton (50 v/v %) keverékkel fixáltuk (10 perc, 4 °C). A nem specifikus antitest kötőhelyeket FBS-el blokkoltuk (15 perc, szobahőmérséklet). A minták további előkészítése és analízise a fentebb bemutatott módon történt.

A CFBE 410⁻ sejtekben az NF- κ B útvonal aktiváltóságát szintén a p65 alegység nukleáris transzlokációjának fluoreszcens festéssel történő vizualizációjával detektáltuk. Ennek érdekében a F508del-CFTR-t és a wt-CFTR-t expresszáló CFBE sejteket 12-well plate-ekben tenyésztettük 5×10^4 sejt/well sejtsűrűség mellett 2 napon keresztül. Ezt követően a sejteket TNF- α -val (100 ng/mL) vagy PBS-sel (kontroll) 4 órán keresztül kezeltük. Annak érdekében, hogy a CFTR modulátoroknak az NF- κ B útvonalra gyakorolt hatását megvizsgáljuk, a CFBE sejteket előzetesen *lumacaftor* (3 μ M) + *ivacaftor* (10 μ M) vagy *tezacaftor* (5 μ M) + *ivacaftor* (10 μ M) kombinációjával vagy DMSO-val (kontroll) kezeltük 24 órán keresztül, majd ezt követően adtuk hozzá a TNF- α -t (100 ng/mL) vagy a PBS-t 4 óráig. A fenti kezeléseket követően a sejteket jéghideg metanol-aceton oldatban (50 v/v%) fixáltuk 10 percig. FBS-t alkalmaztunk 15 percen keresztül a nonspecifikus antitest kötőhelyek blokkolása érdekében. A minták jelölése és analízise a fentebb bemutatott módon történt.

A fentiekben bemutatott összes fluoreszcens mikroszkópos kísérlet során a sejtmagokat Hoechst 33342 festékkel jelöltük. A mintákat minden esetben Zeiss Axio Scope. A1 fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Németország) vizsgáltuk és a képeket a ZEN 2012 szoftver segítségével elemeztük (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Az NF- κ B p65 festésnél kiszámítottuk a sejtmag és a citoplazma fluoreszcencia intenzitásának az arányát. Az LPS-sel és TNF- α -val kezelt megakaryocyták Dicer1 fehérjeszintjét a MEG-01 sejtek citoplazmájában mért specifikus fluoreszcencia intenzitás alapján határoztuk meg. A fluoreszcens mikroszkóppal végzett kísérletek kivitelezését, valamint az eredmények értékelését Dr. Fenyvesi Ferenc, Dr. Váradi Judit és Dr. Rusznyák Ágnes (DE, Gyógyszertechnológiai Tanszék) segítségével végeztük el.

4.23 Patch-clamp technika

A CFBE 41o^- sejtek membránjában a kloridáramot ún. „egész sejt” patch-clamp módszerrel analizáltuk, hasonlóan egy korábban publikált vizsgálathoz [262]. Az alkalmazott extracelluláris oldat tartalma a következő volt: 145 mM NaCl, 4 mM CsCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM D-glucose és 10 mM HEPES (pH 7,4 315 mOsm NaOH-dal titrálva). Az intracelluláris pipettaoldat összetétele az alábbi volt: 113 mM L-aszparaginsav, 113 mM CsOH, 27 mM CsCl, 1 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM etilén-glikol-tetraacetátsav (EGTA), 10 mM HEPES és 3 mM Mg-ATP (pH 7,2 285 mOsm CsOH-dal titrálva). Minden órában friss Mg-ATP oldat került hozzáadásra az intracelluláris oldathoz. Az intracelluláris oldatot jégen tároltuk felhasználás előtt. A FSK/IBMX-et és a CFTR_{inh172}-t közvetlenül a mérés előtt adagoltuk az extracelluláris oldathoz. Az elektrofiziológiai mérésekhez használt mikropipetták boroszilikát üvegkapillárisokból (GC150-TF10, Harvard Apparatus Co., Holliston, MA, USA) kerültek felhúzásra 4 fázisban egy Flaming Brown típusú automata pipetta húzóval (Sutter Instruments, San Rafael, CA, USA). A pipetták hegyátmérője 0,5 - 1 μm volt, ellenállásuk pedig az alkalmazott oldatok esetén 3-10 M Ω . A mérésekhez Axopatch 200B patch-clamp erősítőt (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) használtunk feszültség-zár üzemmódban, ezáltal a vizsgált sejt membránpotenciálja konstans értéken tartható, miközben a sejtmembránon átfolyó áram nagysága meghatározható. A mérések során Burleigh PCS5000 (Thorlabs Inc., Newton, New Jersey, USA) mikromanipulátort használtunk. Az ingerlő feszültség-impulzusokat és az adatgyűjtést IBM kompatibilis személyi számítógép vezérelte Axon Digidata 1440 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) illesztőegységen keresztül a pCLAMP10 programcsomag (Molecular Devices Inc.) segítségével. Az áramgörbékét 3 pólusú Boxcar szűrővel szűrtük. A rögzített áram -40 mV-ra volt állítva, és kétféle feszültség-clamp protokollt alkalmaztunk a CFTR ionáram mérésére. Elsőként 5 másodpercig tartó, -40 mV-ról 0 mV-ra változó egyszeri depolarizációt alkalmaztunk 4-5 percen keresztül az ionáram monitorizálására, és annak igazolására, hogy számottevő elfolyó ionárammal nem kell számolnunk. Az áram-feszültség (I-V) kapcsolat követésére a sejteket -40 mV-os rögzített feszültségen tartottuk és -80 mV-tól +80 mV-ig terjedő feszültség tartományban depolarizáltuk különböző potenciálokkal, 10 másodpercenként történő 20 mV-os lépésekben. A méréseket minden esetben szobahőmérsékleten végeztük. A vizsgálatok kivitelezésében Dr. Szántó Tibor és Prof. Panyi György (DE, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet) nyújtottak segítséget.

4.24 Rutin körülmények között meghatározott laboratóriumi paraméterek

Az EDTA-t tartalmazó Vacutainer® mintavételi csőbe levett antikoagulált teljes vérmintából a fehérvérsejtszámot, a thrombocytaszámot és az átlagos thrombocyta térfogatot (MPV) egy Advia® 2120 Hematology System automatán (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NJ, USA) határoztuk meg. A rutin (immun)kémiai laboratóriumi vizsgálatok szérumból az alábbi készülékeken kerültek lemerésre: szérumból éhomi glükóz, össz koleszterin, HDL, LDL, triglicerid, C-reaktív protein (CRP), procalcitonin (PCT) és IL-6, valamint a vizelet albumin és kreatinin koncentrációk Cobas® 6000 analizátoron, illetve Cobas® e411 automatán (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország), továbbá a szérumból inzulin Liaison® XL készüléken (DiaSorin, Saluggia, Olaszország), a szérumból/plazmából HE4 Architect® i2000SR automatán (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Németország), míg a HgbA1c HPLC módszerrel (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). A fibrinogénszint Clauss módszerrel, illetve a plazminogén aktivátor inhibitor 1 (PAI-1) szint és a FVIII aktivitás Stago® Compact koagulációs automatán (Stago, Asnières, Franciaország), míg a von Willebrand faktor antigén (vWF-Ag), a D-dimer és a fibrin monomer (FM) koncentrációk BCS® XP készüléken (Siemens, München, Németország) kerültek lemerésre. Az aszpirin/clopidogrel kezelés hatékonysága az aktuális ajánlásoknak [263] megfelelően a vérlemezke aggregáció és a VASP (vasodilatator-stimulated phosphoprotein) fehérje foszforiláció áramlási citometriai vizsgálata alapján került megállapításra.

4.25 Statisztikai számítások

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy az adataink normál vagy nem normál eloszlást mutatnak, Kolmogorov-Smirnov tesztet, esetenként Shapiro-Wilk tesztet használtunk. Az eredményeket átlag \pm szórás (standard deviation, SD vagy standard error of the mean, SEM), illetve medián és interkvartilis tartomány (IQR) formában jelenítettük meg. Két csoport összehasonlítására - normál eloszlás esetén - Student-féle t-próbát használtunk, míg nem normál eloszlás esetén Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk. Kettőnél több csoport esetén ANOVA vagy Kruskal-Wallis tesztet végeztünk kiegészítve a releváns *post hoc* teszttel (Bonferroni vagy Dunn's teszt). Amikor kezelés előtti és kezelés utáni mintákat hasonlítottuk össze, párosított t-tesztet vagy Wilcoxon tesztet, illetve párosított ANOVA vagy Friedman tesztet alkalmaztunk. A korrelációs analízisekhez - mivel az adatok nem parametrikus változók voltak - Spearman rho tesztet alkalmaztunk. Egy paraméter diszkriminatív erejét ROC görbe (receiver operating characteristic) analízissel értékeltük az AUC (area under the curve) érték

meghatározásával. A cut-off vagy küszöb értéket a Youden-index maximuma alapján határoztuk meg (szensitivitás, specificitás, PPV, NPV). Többszörös regressziós analízist végeztünk egy külön vizsgált biomarker és egyéb függő változók összefüggéseinek vizsgálatára. Statisztikailag szignifikánsnak tekintettük a különbséget, amennyiben a P érték kisebb volt, mint 0,05 ($P < 0,05$). A statisztikai számítások a GraphPad® Prism szoftverrel (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) készültek.

4.26 Etikai engedélyek

Minden 18 éven felüli beteg, illetve illesztett kontroll személy, valamint a CF-es gyermekek szülei vagy törvényes képviselője írásos beleegyező nyilatkozattal hagyták jóvá a vizsgálatokban való részvételt a tanulmány megkezdése előtt. A vizsgálatokat 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 Helsinki Egyezményben megfogalmazott elvárásoknak megfelelően történtek.

4.27 Finanszírozás, pályázatok

Tudományos kutatómunkámat az alábbi fő pályázatok támogatták:

- OTKA pályázat (K-49392): Thrombocytá aktiváció során bekövetkező változások biokémiai és sejtbioológiai jellemzés. Témavezető: Dr. Kappelmayer János (2005-2008.)
- OTKA pályázat (K-75199): A thrombocytá mint gyulladáshos sejt. Témavezető: Dr. Kappelmayer János (2008-2012.)
- Mecénatúra-pályázat (DE, ÁOK): A PSGL-1 receptor szerepe a melanoma tumorsejtek *in vivo* terjedésében és metasztázis képzésében (2011-2014.) Témavezető: Dr. Nagy Béla
- Bólyai János Kutatási Ösztöndíj (MTA, BO/00522/11.) (2011-2014.)
- "Konvergencia - Magyary Zoltán Posztdoktori Ösztöndíj - 2013/2 (A2-MZPDÖ-13) (2013-2014.) Témavezető: Dr. Nagy Béla
- Szodoray Lajos Ösztöndíj (DE, ÁOK) (2014-2017.)
- Új Nemzeti Kiválósági Program Felsőoktatási Ösztöndíj (EMMI) (ÚNKP-17-4-III-DE-239.) (2017-2018.)

- GINOP-2.3.2-15-2016-00043 pályázat (Szív- és érkeletési 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

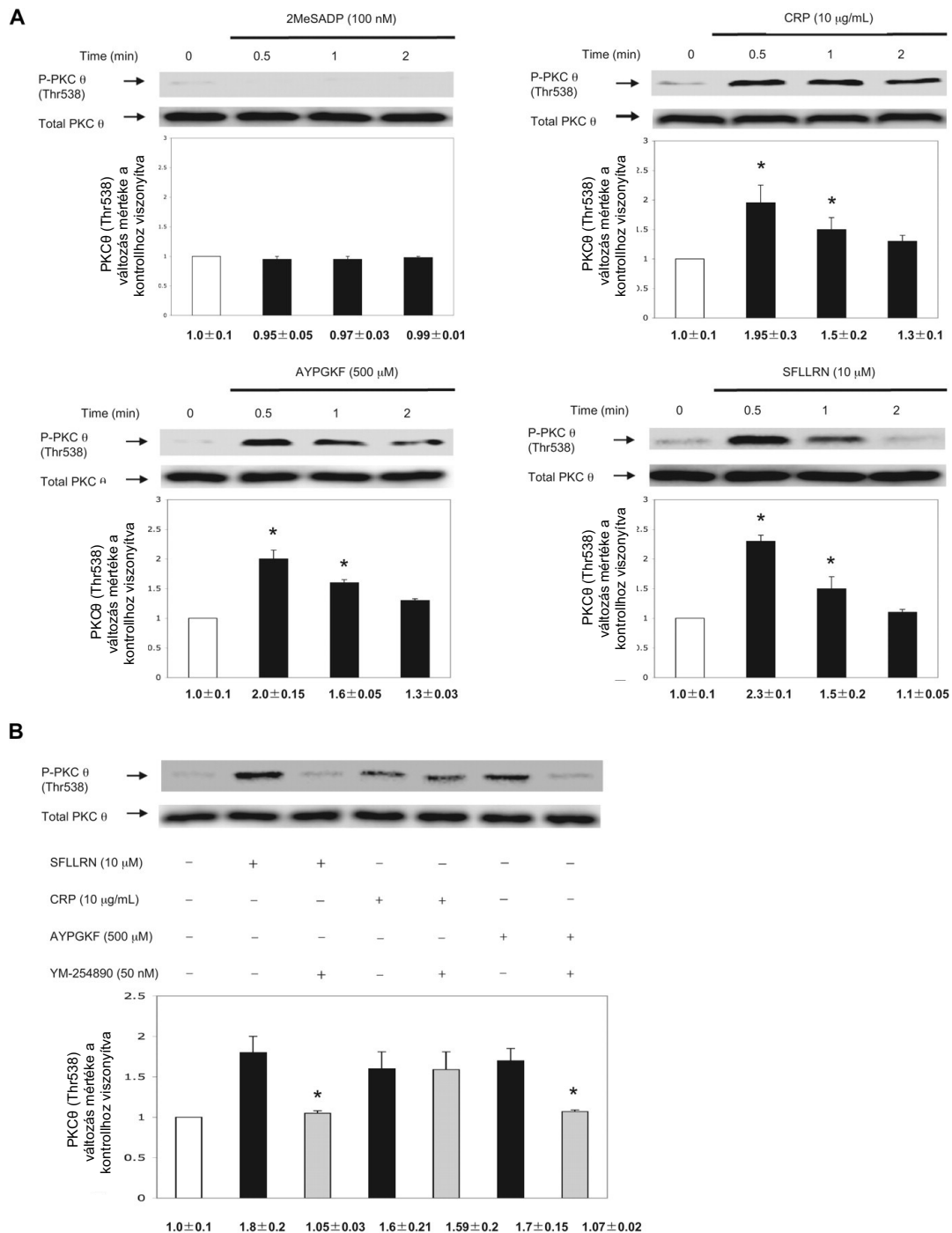
5 EREDMÉNYEK

5.1 A PKC θ szerepe a thrombocyta aktiváció lezajlásában

A gyulladássos kórképekben bekövetkező fokozott thrombocyta aktiváció mechanizmusának jobb megértése miatt fontos ismernünk a vérlemezkék komplex intracelluláris folyamatait. Ennek érdekében a philadelphiai Temple Egyetemen folytatott thrombocyta biokémiai kutatásaim során több „novel” PKC izoenzim funkcióját vizsgáltuk, amelyek közül itt a PKC θ szerepével kapcsolatos eredményeinket mutatom be.

5.1.1 A PAR és GPVI receptor agonisták által indukált PKC θ foszforiláció, valamint kóros vérlemezke aggregáció, α IIB β 3 integrin aktiváció, α - illetve δ -granulum szekréció a PKC θ hiányában

A PKC θ funkcióját különböző thrombocyta agonistával történt sejtaktiváció mellett vizsgáltunk, hogy megtudjuk, vajon mely stimulus vált ki treonin foszforilációt, ami a PKC θ kináz aktivitásához szükséges [264]. Elsőként olyan humán thrombocyta mintákban vizsgáltuk western blottal a foszforiláció mértékét a Thr538 pozícióban, amiket aszpirinnel előkezeltünk megelőzve a TXA₂ felszabadulás okozta további sejtaktivációt. A 2MeSADP kezelés nem vezetett PKC θ foszforilációhoz, míg az erősebb GPVI receptor agonista kollagénszerű peptid (CRP), illetve a PAR1-receptor specifikus SFLLRN peptid és a PAR4-hoz kötődő AYPGKF peptid hatására már 30 másodperc után jelentős foszforilációt detektáltunk (**16/A. ábra**). Míg a CRP és az AYPGKF kezelést követően a foszforiláció 2 perc után is detektálható volt, addig az SFLLRN aktiváció esetén a foszforiláció szintje ekkora jelentősen lecsökkent.

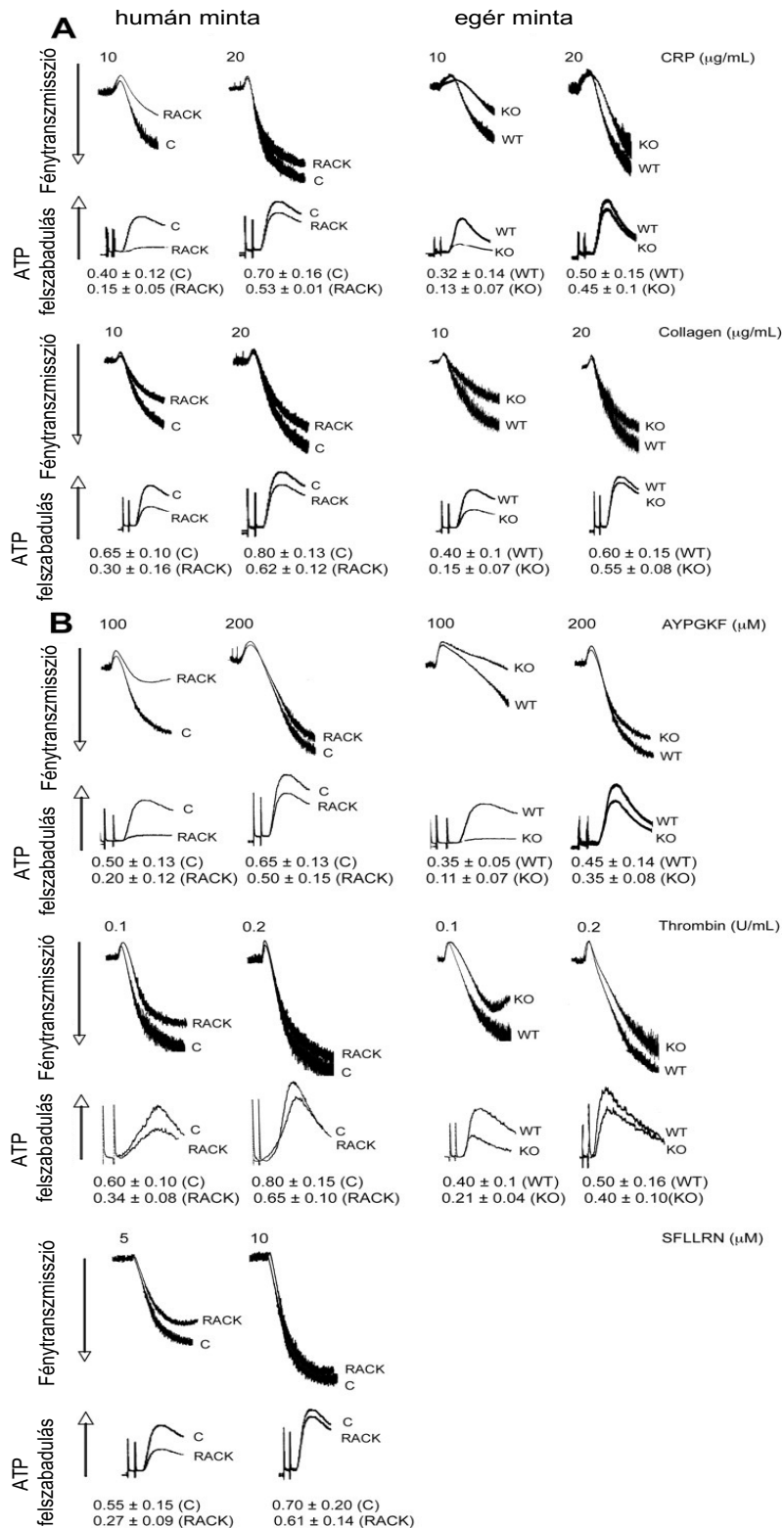


16. ábra A PKCθ treonin foszforilációja különböző thrombocyta agonisták hatására. (A) Aszpirin-kezelt mosott humán thrombocyta mintákat 2MeSADP-vel, CRP-vel és SFLLRN, illetve AYPGKF peptiddel különböző ideig aktiváltuk 37 °C-on. **(B)** Az aszpirin-kezelt mosott humán vérelemezket az SFLLRN és AYPGKF peptiddel, illetve CRP-vel való aktivációja előtt G_q inhibitorral (YM-254890) előkezeltük 37 °C-on. A mintákat a PKCθ treonin foszforilációra vizsgáltuk Western blottal foszforilált-(Thr538)-PKCθ specifikus antitesttel. A minták egyenlő fehérje mennyiséget össz PKCθ ellenes antitesttel jelöléssel ellenőriztük. A foszforiláció mértékét kvantáltuk denzitometriával és meghatároztuk a változás mértékét. Átlag ± SD, 3 különböző kísérletben feldolgozott min. 3 donor adatai alapján). *P<0,05.

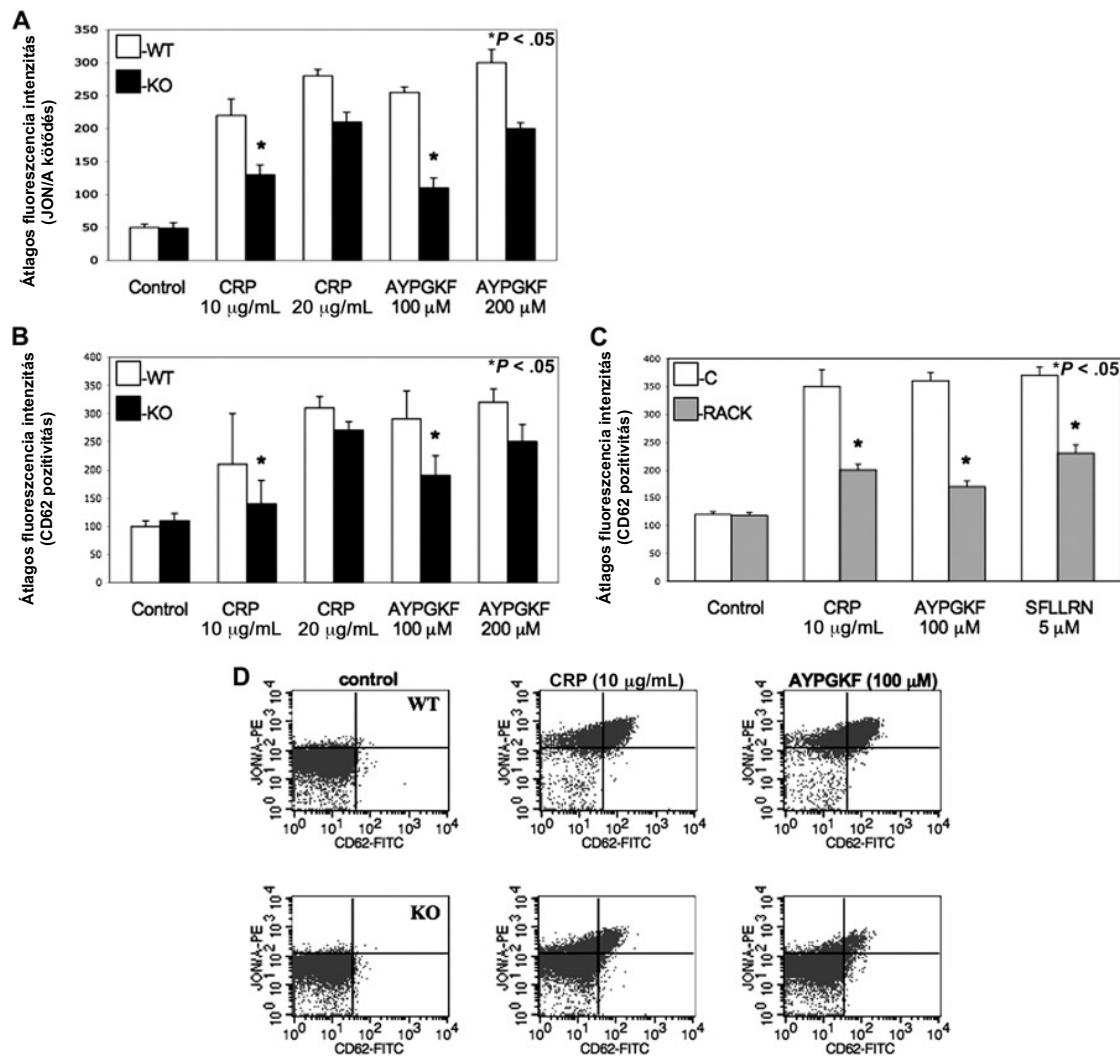
Külön megvizsgáltuk, hogy a PAR-receptorokon keresztül bekövetkező PKC θ aktiválódáshoz szükséges-e mind a G $_q$ és a G $_{12/13}$ mediált útvonal is. Ezért az aszpirin előkezelt mosott humán thrombocytákhoz előzetesen adtunk G $_q$ fehérje specifikus inhibitor (YM-254890) az SFLLRN vagy AYPGKF peptiddel történt vérlemezke aktiváció előtt. Azt tapasztaltuk, hogy az inhibitor hatására teljes mértékben lecsökkent a Thr538 foszforiláció, míg a G $_q$ fehérjéhez nem kötődő GPVI receptor indukálta aktiváció esetén ez a foszforiláció megmaradt (**16/B. ábra**).

Ezt követően részletesen megvizsgáltuk a PAR (SFLLRN, AYPGKF) és a GPVI receptor (CRP) agonisták által indukált vérlemezke aggregációt, az α IIB β 3 integrin aktivációt és az α - illetve δ -granulum szekréción. Ehhez kétféle módszertani megközelítést alkalmaztunk: 1) izoenzim-specifikus RACK peptiddel és egyben aszpirinnel kezelt mosott humán thrombocytákat (**17/A. ábra**), és 2) PKC θ deficiens és WT egér vérlemezke mintákat analizáltunk (**17/B. ábra**). Mindkét kísérletsorozatban a PKC θ funkció hiányában jelentősen csökkent az aggregáció és a szekréció mértéke az alacsonyabb agonista koncentrációk jelenlétében. Ezzel szemben a magas (maximális) koncentrációjú agonisták mellett a különbség már nem volt megfigyelhető. Ebből arra következtettünk, hogy a PKC θ elősegíti mind a PAR, mind a GPVI receptorhoz kötött thrombocytá aktivációt.

Megnéztük, hogy az α IIB β 3 integrin aktivációját közvetlenül elősegíti-e a PKC θ , ekkor áramlási citometriával a JON/A antitest kötődését követtük a konformáció változáson átesett α IIB β 3 integrinhez. Csökkent felszíni pozitivitást láttunk mindhárom alacsonyabb koncentrációjú agonista jelenlétében, ami arra utal, hogy a PKC θ részt vesz az ún. „inside-out” szignalizációban, vagyis az α IIB β 3 integrin aktivációjában (**18/A. ábra**). Az α -granulum szekréció modulálásában szintén van funkciója, mivel a felszíni P-selectin (CD62) pozitívitás hasonlóan alacsonyabb volt a RACK-peptiddel kezelt humán vérlemezkekben, illetve a PKC θ hiányos egér thrombocytákban (**18/B-D. ábra**).



17. ábra A PKC θ funkciója a GPVI és PAR receptorok által mediált vérlemezke aggregációban és szekréción. Aszpirinnel és PKC θ specifikus RACK vagy kontroll peptiddel előkezelt humán thrombocyták, valamint PKC $\theta^{-/-}$ egerekből és WT állatokból izolált, majd (A) CRP-vel, illetve kollagénnel, továbbá (B) AYPGKF peptiddel, thrombinnal, illetve SFLLRN peptiddel 3,5 percig 37 °C-on indukált egér vérlemezke aggregációt és szekréción követünk. A δ -granulum szekréción mértékét a felszabadult ATP mennyisége (nmoL/10⁸ thrombocytá) alapján határoztuk meg. A reprezentatív aggregációs görbék 3 különböző kísérletben feldolgozott min. 3 donor állat eredményei alapján lettek kiválogatva.

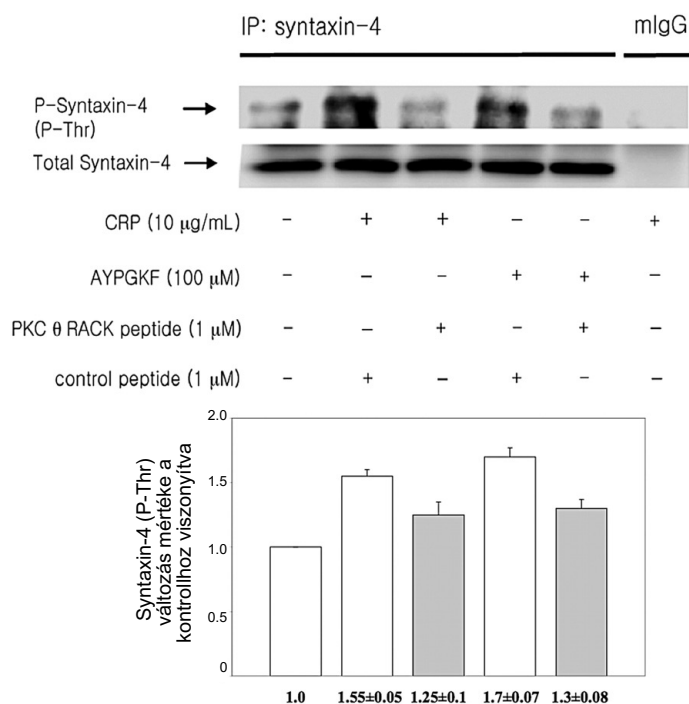


18. ábra A PKC θ szerepe az α IIb β 3 integrin aktivációban és az α -granulum szekrécióban a GPVI és PAR receptor mediált útvonalak mentén. (A) A PKC $\theta^{-/-}$ egerekből (■) és a WT kontroll állatokból (□) izolált thrombocytákat a CRP-vel, valamint az AYPGKF peptiddel stimuláltuk, hogy megvizsgáljuk a JON/A antitest felszíni kötődését. (B) A WT és PKC $\theta^{-/-}$ egér thrombocyták és (C) a mosott humán vérlemezkék PKC θ RACK peptid jelenlétében vagy hiányában CRP-vel, illetve AYPGKF-vel, továbbá SFLLRN peptiddel (csak a humán minták esetén) voltak aktiválva FITC-jelölt P-selectin (CD62) specifikus antitestes jelölés mellett. A mintákat áramlási citometriával analizáltuk. (D) Reprezentatív dot plot ábrák a JON/A kötődésre és a CD62 pozitívításra jelölt mintákból. Átlag \pm SD, 3 különböző kísérletben feldolgozott min. 3 donor adatai alapján. *P<0,05.

5.1.2 A PKC θ funkciója a szekréció és a TXA $_2$ szintézis regulációjában a Syntaxin-4 és az ERK foszforiláción keresztül

A szekréció regulációjában résztvevő SNARE-Syntaxin-4 komplex utóbbi komponensének a foszforilációját vizsgáltuk western blot technikával annak érdekében, hogy kiderítsük, vajon a PKC θ szekréciót befolyásoló hatása a Syntaxin-4 foszforilációján keresztül valósul-e meg. Ehhez immunprecipitáltuk a Syntaxin-4 fehérjét előzetesen PKC θ RACK vagy kontroll peptiddel kezelt mosott thrombocytá mintákban, amelyek később CRP-vel vagy AYPGKF

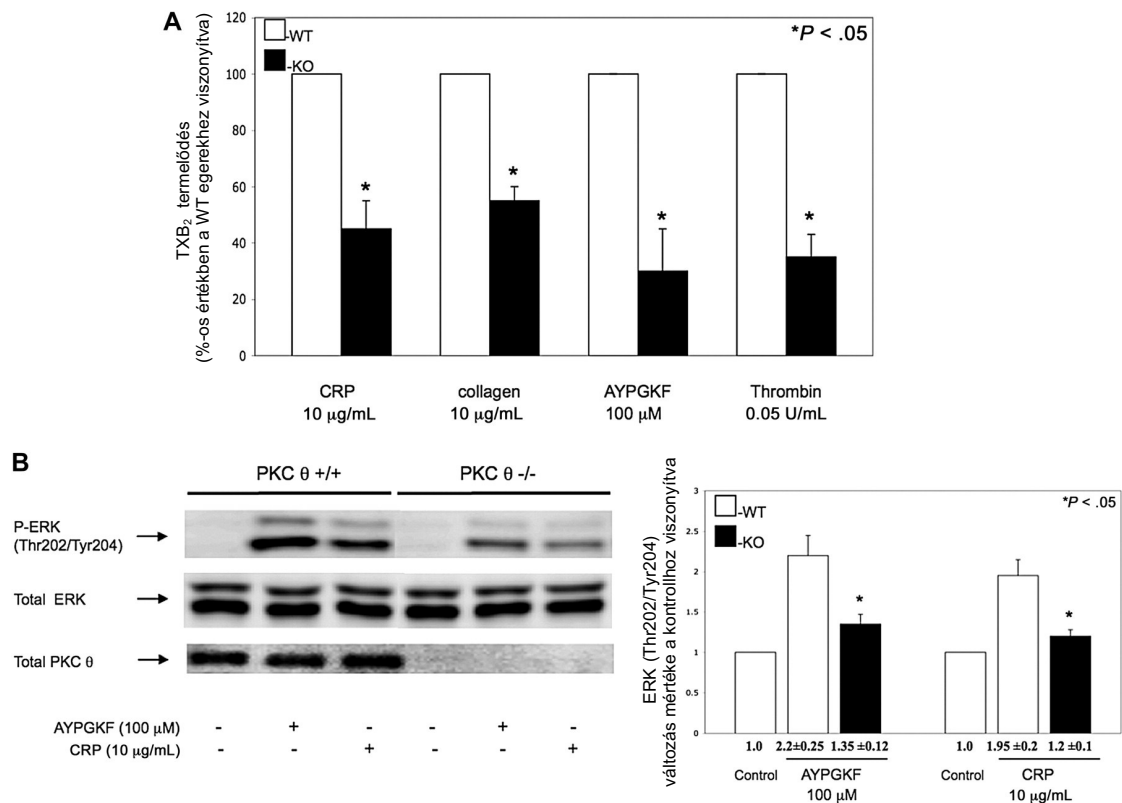
peptiddel voltak stimulálva és azt követően detektáltuk a Syntaxin-4 treonin foszforiláltsági szintjét. Azt láttuk, hogy a RACK peptiddel való kezelés csökkentette a Syntaxin-4 foszforilációt, ami alátámasztja PKC θ és a Syntaxin-4 foszforiláció közötti szoros kapcsolatot (**19. ábra**).



19. ábra A PKC θ befolyásolja a szekréció regulációjában résztvevő Syntaxin-4 foszforilációját. Mosott humán thrombocytá mintákat aktiváltunk CRP-vel és AYPGKF 37 °C-on a PKC θ specifikus RACK vagy a kontroll peptid jelenlétében és immunprecipitációt csináltunk a Syntaxin-4 fehérjére, majd western blottal ellenőriztük a protein treonin foszforilációját. Normál egér IgG volt a negatív kontroll minta. A foszforiláció mértékét kvantáltuk denzitometriával és meghatároztuk a változás mértékét. Átlag \pm SD, 3 különböző kísérletben feldolgozott 3 donor adatai alapján.

A PAR és GPVI receptor mediált vérlemezke útvonal aktiválódása TXA₂ termeléssel jár együtt a maximális thrombocytá aktiváció érdekében. Ezért összehasonlítottuk a TXA₂ koncentrációkat PKC θ deficiens és kontroll WT egér mintákban GPVI és PAR receptor agonista stimulációt követően, és jóval alacsonyabb TXA₂ értékeket kaptunk a PKC θ hiányában függetlenül az agonista típusától (**20/A. ábra**). Amikor a TXA₂ szintézist gátoltunk nem szelektív COX enzimgátló indomethacin segítségével, akkor is pozitív módon befolyásolta a PKC θ a primer vérlemezke szekréciót. Ehhez kapcsolódóan analizáltuk az ERK foszforilációt is, amely a cPLA₂ aktivációján keresztül a TXA₂ termelés szabályozásában vesz részt. Csökkent ERK (Thr202/Tyr204) foszforilációt detektáltunk a PKC θ hiányos állatokban

szemben a WT egerekben (20/B. ábra), ami alátámasztja ezen PKC izoenzim szerepét a TXA₂ szintézisben is.

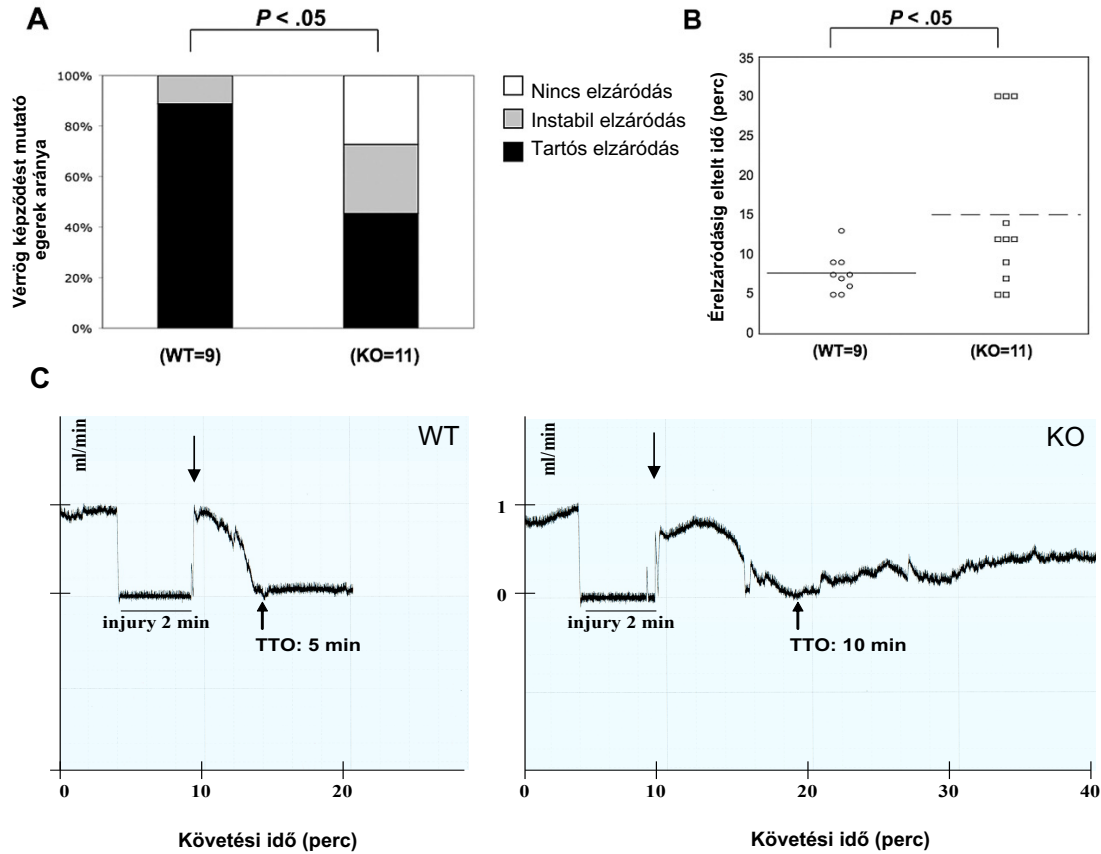


20. ábra A PKC θ szerepe a TXA₂ termelődésben és az ERK foszforilációban. (A) PKC $\theta^{-/-}$ egerekből (■) és WT típusú állatokból (□) szeparált vérlemezke mintákat kollagénnel és CRP-vel, valamint AYPGKF peptiddel és thrombinnal aktiváltuk 3,5 percig 37 °C-on forgatás alatt. Ezt követően megmértük a TXB₂ szintet és a WT kontroll állatok maximális értékeihez viszonyítottuk a PKC θ deficiens állatokban mért eredményeket. (B) A stimulált mosott egér thrombocytákat western blottal is analizáltuk foszforilált-ERK és össz ERK ellenes antitesttel. Az egerek fenotípusát külön is ellenőriztük az össz PKC θ specifikus antitesttel. A foszforiláció mértékét kvantáltuk denzitometriával és meghatároztuk a változás mértékét. Átlag \pm SD, 3 különböző kísérletben feldolgozott 3 donor adatai alapján. *P<0,05.

5.1.3 A thrombocyta PKC θ hiányának hatása az *in vivo* vérrögképződésre

Végül a fenti eredmények alátámasztása érdekében „globálisan” is megvizsgáltuk a PKC θ funkcióját a thrombus képződésben *in vivo*. Párhuzamosan a PKC θ deficiens és a WT egerekben FeCl₃ kezeléssel carotis sérülést és *in vivo* vérrögképződést indukáltunk, amelynek során mértük a 100%-os okklúzió kialakulásig eltelt időt. A minimum 30 percig stabil trombusképződést mutató eseteket számoltuk össze a két genotípus között, és azt találtuk, hogy a PKC θ deficiens egerek több, mint felében (55%) nem tudott stabil thrombus kialakulni (21/A. ábra), valamint a PKC θ hiányában az átlagos érelzáródási idő (átlag \pm SD) 15,7 \pm 3,3 perc volt

szemben a WT egerek eredményeivel ($7,6 \pm 1,1$ perc) ($P < 0,05$). (21/B. ábra). Mindezen adatok alapján a PKC θ izoenzim a vérrög stabilizálásában is aktívan részt vesz.



21. ábra A PKC θ izoenzim hozzájárul a stabil thrombus képződéshez *in vivo*. (A) A FeCl₃ indukálta carotis sérüléssel használt modell alapján (2 percig 10%-os FeCl₃ jelenlétében) vizsgáltuk a stabil vérrögöt mutató egerek arányát, és közben (B) mértük az átlagos elzáródási időt a PKC $\theta^{-/-}$ és a WT típusú egerekben. (C) Repreratív Doppler áramlási görbék az okklúzió nyomán követésére. A PKC $\theta^{-/-}$ egerekben átlagosan 10 perc volt az érelzáródásig eltelt idő, ami együtt járt gyakran instabil vérröggképződéssel, míg a WT (kontroll) egerekben már 5 perc után stabil vérrög alakult ki és tartósan megszűnt a véráramlás. TTO: a teljes érelzáródásig eltelt idő.

Összeségében tehát megállapíthatjuk, hogy a PKC θ izoenzim részt vesz számos fontos vérlemezke aktivációs folyamatot regulációjában, és ezáltal hozzájárul a stabil vérröggképződés kialakulásához.

5.2 A P2Y₁₂ és a P-selectin receptor expresszió miRNS-ek által történő modulálása diabeteses vérlemezkékben

A DM2-re jellemző kóros thrombocytá aktiváció egy sokat vizsgált jelenség. Ugyanakkor a kialakulásában részt vevő finomszabályozó celluláris mechanizmusok a vérlemezkékben és a

megakaryocytákban még kevésbé ismertek. Ezért néhány potenciális miRNS funkcióját vizsgáltuk a két sejttípusban *in vitro* párhuzamosan a diabeteses betegmintákban mérhető thrombocyta expresszió eltérésekkel.

5.2.1 A vérlemezke aktiváltsági állapot és a miR-223, miR-26b és miR-140 expresszió közötti összefüggés vizsgálata DM2 thrombocytákban összehasonlítva obez és egészséges kontroll mintákkal

A DM2 és az obez, nem diabeteses betegek, valamint az egészséges kontroll csoportok a demográfiai paramétereik alapján összehasonlíthatók voltak (**1. táblázat**).

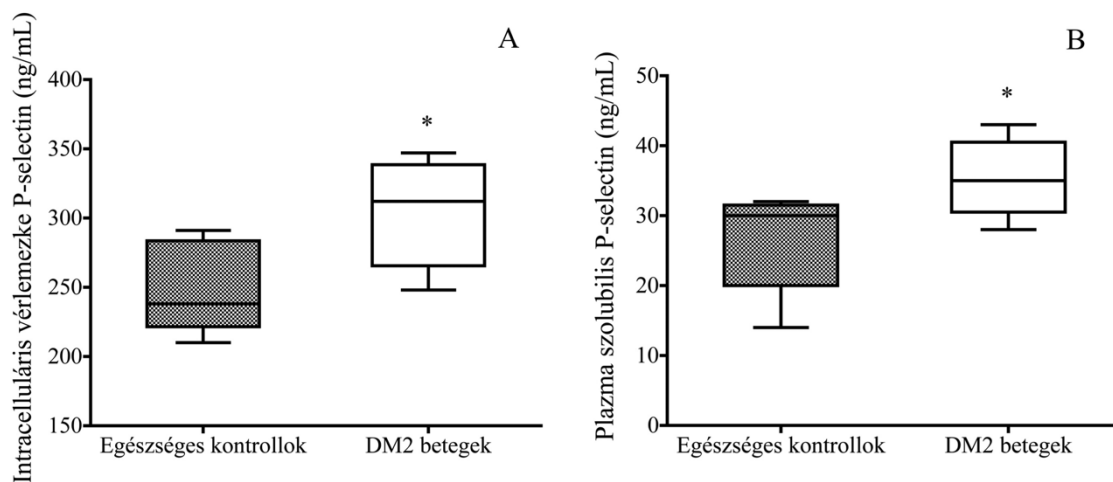
Paraméterek	DM2 betegek (n=28)	Obez, nem diabeteses betegek (n=19)	Egészséges kontrollok (n=23)
Nem (férfi, n (%))	13 (46)	12 (63)	11 (48)
Életkor (év)	53 (50-59)	53 (48-57)	53 (34-60)
DM2 fennállása (év)	10 (8-14,5)	-	-
BMI (kg/m ²)	32,9 (30,3-40,2) ^a	35,8 (31,6-37,3) ^c	24,0 (22,1-25,9)
Éhomi glükóz (mmol/L)	9,8 ± 4,1 ^{a, b}	5,3 ± 0,7	5,4 ± 0,5
HgbA1c (%)	7,5 (7,0-8,8) ^b	5,5 (5,3-5,7)	N.M.
Éhomi inzulin (mU/L)	17,5 (9,9-63,6) ^a	14,3 (7,4-25,2)	8,8 (4,7-20,7)
Proteinuria (vizelet albumin/kreatinin)	2,2 (0,5-10,5)	NM	NM
Triglicerid (mmol/L)	1,9 (1,5-2,6) ^{a, b}	1,4 (1,0-2,0)	1,1 (0,7-1,7)
Össz koleszterin (mmol/L)	4,9 ± 1,3	5,1 ± 1,1	5,0 ± 0,7
LDL-koleszterin (mmol/L)	3,9 ± 1,2	3,4 ± 0,9	3,0 ± 0,7
HDL-koleszterin (mmol/L)	1,1 (1,0-1,3) ^{a, b}	1,3 (1,1-1,5) ^c	1,6 (1,4-2,4)
CRP (mg/L)	2,1 (1,4-6,9) ^a	3,7 (1,9-6,1) ^c	0,8 (0,6-1,6)
Vérlemezke szám (G/L)	231 ± 68 ^b	276 ± 55	270 ± 77
Fehérvérsejt szám (G/L)	8,4 ± 2,4	7,1 ± 1,4	7,1 ± 1,9
PAI	0,19 (0,09-0,39) ^{a, b}	0,02 (-0,19-0,20)	-0,27 (-0,45-0,09)
HOMA-IR	9,4 (4,0-28,1) ^{a, b}	4,1 (1,8-6,6)	2,0 (1,0-5,7)
Felszíni P-selectin (%)	7,2 ± 5,1 ^{a, b}	3,5 ± 1,5 ^c	1,8 ± 0,9

1. táblázat A DM2-s vizsgálat betegcsoportjainak főbb demográfiai és laboratóriumi paramétereit. Az eredményeket átlag ± SD vagy medián (interkvartilis tartomány) formában tüntettük fel. PAI: plazma atherogén

index, HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance. Statisztikai összehasonlítások: $P < 0,05$:
^a DM2 betegek vs. egészséges kontrollok, ^b DM2 betegek vs. obez egyének, ^c obez egyének vs. egészséges kontrollok. NM: nem mért paraméter.

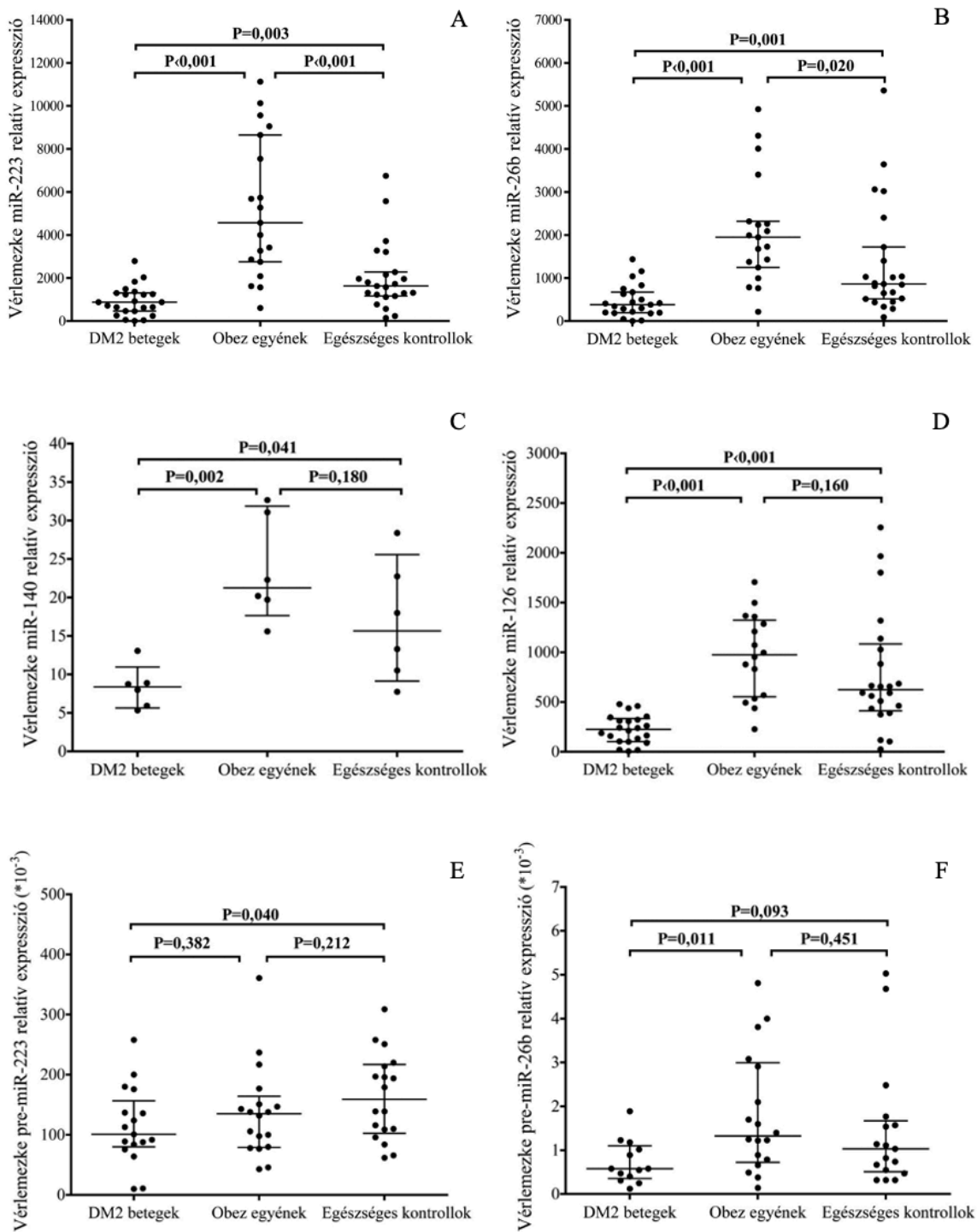
A diabeteses betegekben jelentősen magasabbak ($P < 0,05$) voltak a BMI (body mass index) értékek, az éhomi glükóz és az inzulin koncentrációk, ugyanakkor a HDL-koleszterin szint szignifikánsan csökkent ($P < 0,05$) az egészséges kontrollokhoz képest. Az obez csoportba súlyosan elhízott (BMI: $35,8 [31,6-37,3] \text{ kg/m}^2$), de nem diabeteses beteget vontunk be, amit alátámasztott, hogy a szérum glükóz és a HgbA1c koncentrációk a referens tartományon belül voltak. A DM2 betegeket a plazma atherogén indexszel és az inzulin rezisztenciára utaló HOMA-IR indexszel jellemeztük, amely paraméterek értéke nagymértékű emelkedést ($P < 0,05$) mutatott diabetesben mindkét kontroll csoporthoz képest.

A P-selectin receptor különböző formájának mérésével vizsgáltuk a vérlemezkék általános aktiváltási állapotát. A felszíni P-selectin pozitívitas alapján fokozott vérlemezke aktivációt figyeltünk meg DM2-ben ($7,2 \pm 5,1 \%$, $P < 0,001$), ami már obezitasban is megmutatkozott ($3,5 \pm 1,5 \%$, $P = 0,003$) az egészséges kontrollokhoz ($1,8 \pm 0,9 \%$) képest. A sztatin kezelés mellett a betegek csak enyhe trigliceridszint emelkedést és a normál tartományba eső egyéb lipid paramétereket mutattak, így ebben a kohorszban a thrombocytá aktivációt befolyásoló hiperkoleszterinémia hatását kizárhattuk. A felszíni P-selectin expresszió mellett külön meghatároztuk a lizált vérlemezkékben az intracellulárisan jelenlévő P-selectin protein teljes mennyiségét, valamint a szolubilis formájának koncentrációját is a plazma mintákban. Az egészséges kontrollokhoz hasonlítva a DM2 thrombocytákban szignifikánsan magasabb volt a P-selectin fehérje koncentrációja (250 ± 33 vs. $304 \pm 39 \text{ ng/mL}$, $P < 0,05$) (**22/A. ábra**), míg szintén jelentősen emelkedett szolubilis P-selectin szinteket tapasztaltunk DM2-ben ($26,6 \pm 7,4$ vs. $35,4 \pm 5,6 \text{ ng/mL}$, $P < 0,05$) (**22/B. ábra**).



22. ábra A thrombocyta P-selectin fehérje intracelluláris (A) és plazma (B) koncentrációjának meghatározása DM2-ben. (A) A vérelemek P-selectin fehérje teljes tartalma, valamint (B) a szolubilis P-selectin szintje is szignifikánsan magasabb volt DM2-ben az egészséges kontrollokhoz képest. Az ábrán a medián (minimum-maximum) értékeket jelöltük, $n=5$ /csoport. * $P<0,05$.

Ezt követően megvizsgáltuk a diabeteses betegekben a fokozott vérelemek aktivációhoz köthető néhány kiválasztott miRNS expresszióját. Különböző adatbázisok és korábbi közlemények alapján a legnagyobb mennyiségben megtalálható miRNS-ek közül a miR-223 a P2Y12 receptor [137], a miR-26b és miR-140 a P-selectin (*SELP*) expresszióját befolyásolhatja, valamint a miR-126 szintje is jelentősen összefüggést mutatott a vérelemek aktiváció mértékével [148]. Azt találtuk, hogy a miR-223 ($P=0,003$), a miR-26b ($P=0,001$), a miR-140 ($P=0,041$) és a miR-126 ($P<0,001$) expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt DM2-ben az egészséges kontroll csoporthoz képest (**23/A-D. ábra**). Érdekes módon a miR-223 és miR-26b esetében a BMI-illesztett, nem diabeteses obese személyekben a kontrollokhoz viszonyítva szignifikánsan emelkedett expressziót találtunk. Kíváncsiak voltunk, hogy vajon minden miRNS szintjére hatással van-e a hiperglikémia, ezért kiválasztottunk egy indifferens miRNS-t (miR-107), ami a sejtek cirkadián ritmusában részt vevő CLOCK fehérje expresszióját szabályozása [139]. Nem találtunk szignifikáns különbséget a miR-107 expresszióban (nem ábrázolt eredmény), ami arra utalhat, hogy nem minden miRNS expressziójára van egyforma hatással a diabeteses környezet.

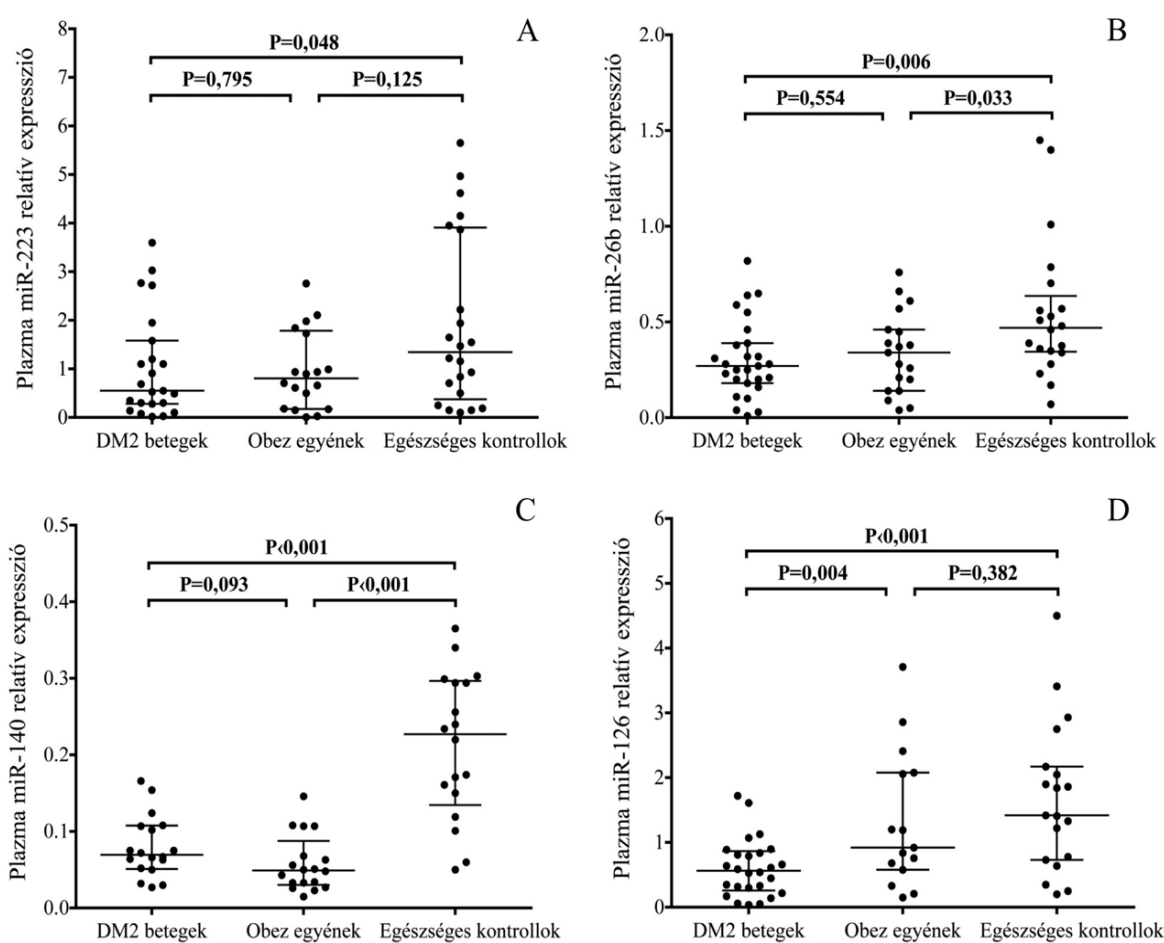


23. ábra A vérlemezkék csökkent miRNS és pre-miRNS expressziója DM2-ben. Az érett miR-223 (A), miR-26b (B), miR-140 (C) és miR-126 (D), valamint a miR-223 és miR-26b előalakjának (E, F) csökkent szintjét találtuk a diabeteses thrombocytyákban szemben az obez és a normál kontrollokkal. A miR-140 szint mérésekor már nem tudtuk minden betegmintát analizálni a limitált RNS minta miatt. Az eredmények medián érték és kvartilisek formájában kerültek feltüntetésre.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy esetleg az érett miRNS előalakjából, a pre-miRNS-ből is kevesebb van-e a diabeteses thrombocytyákban. Ezért két pre-miRNS szintjét kvantáltuk, és azt találtuk, hogy a thrombocyta pre-miR-223 ($P = 0,040$) és a pre-miR-26b ($P = 0,093$)

menyisége csökkenő tendenciát mutatott DM2-ben a kontroll mintákhoz képest (23/E-F. **ábra**), ami akár hozzájárulhat az érett miR-223 és miR-26b alacsony expressziójához.

Mivel az extracelluláris miRNS-ek többsége a vérlemezkékből származik [207], ezért megvizsgáltuk, hogy vajon miként változik-e ezen miRNS-ek szintje a plazma mintákban, mint újfajta biomarkerek. Azt tapasztaltuk, hogy a thrombocytákhoz hasonlóan a keringő miR-223 ($P=0,048$), miR-26b ($P=0,006$), miR-140 ($P<0,001$) és miR-126 ($P<0,001$) szintje is jelentősen csökkent DM2-ben (24/A-D. **ábra**) az egészséges kontrollokhoz képest, míg a miR-107 ez esetben sem mutatott változást (nem ábrázolt eredmény).

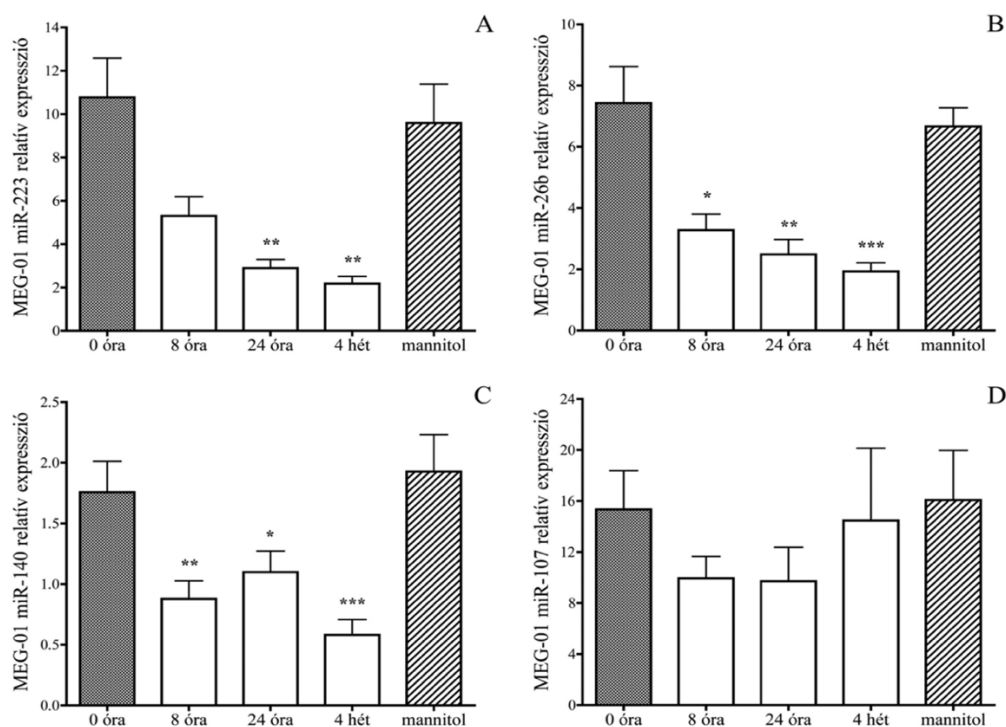


24. ábra A keringő miRNS-ek expressziójának változása DM2-ben. A plazma mintákban - hasonlóan a vérlemezkékben tapasztalt változásokhoz – jelentősen csökkent a miR-223 (A), a miR-26b (B), a miR-140 (C) és a miR-126 (D) expressziója a kontroll csoportokhoz képest. Az eredmények medián érték és kvartilisek formában kerültek feltüntetésre.

5.2.2 A diabeteses csontvelői körülmények modellezése kétféle megakaryocita sejtvonalon, és a hiperglikémia közvetlen hatásának vizsgálata a thrombocyta és megakaryocita miRNS és cél (P2RY12 és SELP) mRNS expresszióra

A DM2-s thrombocyták érett miRNS-einek alacsonyabb szintje több celluláris mechanizmusra utalhat, amit tovább vizsgáltunk. Az egyik lehetőség, hogy már a diabeteses megakaryocytákban is csökkent az expressziójuk és így eredendően kevesebb miRNS kerül át a lefűződő vérelemekbe. Ennek érdekében *in vitro* diabeteses körülmények között, vagyis magas glükóz koncentráció fenntartása mellett kétféle megakaryocita sejtvonal (MEG-01, K562-MK) érett miRNS expresszióit vizsgáltuk rövid (8-24 óra) és hosszútávú (1-4 hét) kezelést követően.

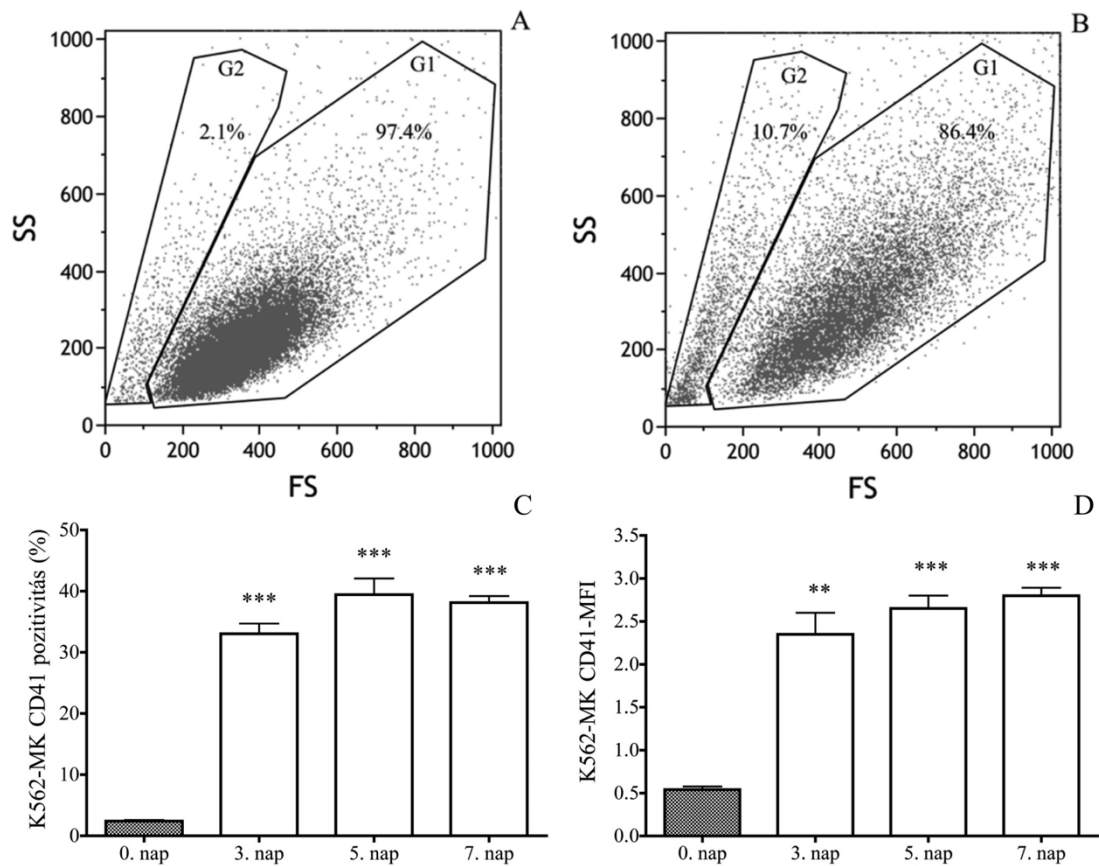
A hiperglikémia hatására csökkenő tendenciát láttunk az érett miRNS expressziókban (25/A-C. ábra), ami 24 óra elteltével már szignifikáns volt (miR-223 és miR-26b esetén $P < 0,010$; miR-140 esetén $P < 0,05$), és a 4 hetes kezelés végére ez a csökkenés még markánsabbá ($P < 0,001$) vált. A mannitollal történt kontroll kezelés nem befolyásolta a miRNS expressziókat, és a miR-107 mennyisége sem változott jelentősen a kezelés hatására (25/D. ábra).



25. ábra A MEG-01 sejtek miRNS expressziójának változása glükóz kezelés hatására *in vitro*. A megakaryocytákat 8 órától 4 hétig különböző időtartamig glükózzal kezeltük és azt követően kvantáltuk a miRNS-ek expresszióját. Negatív kontroll mintaként a mannitollal kezelt sejteket használtunk (csíkos oszlop). Már a 8 órás kezelést követően is csökkent miR-223 (A), miR-26b (B), és miR-140 (C) szintet mértünk, azonban a miR-107 szintje jelentősen nem változott (D) a nem kezelt mintákhoz képest (sötét szürke oszlop). Átlag és SEM értékeket ábrázoltunk, $n=6$ /csoport. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

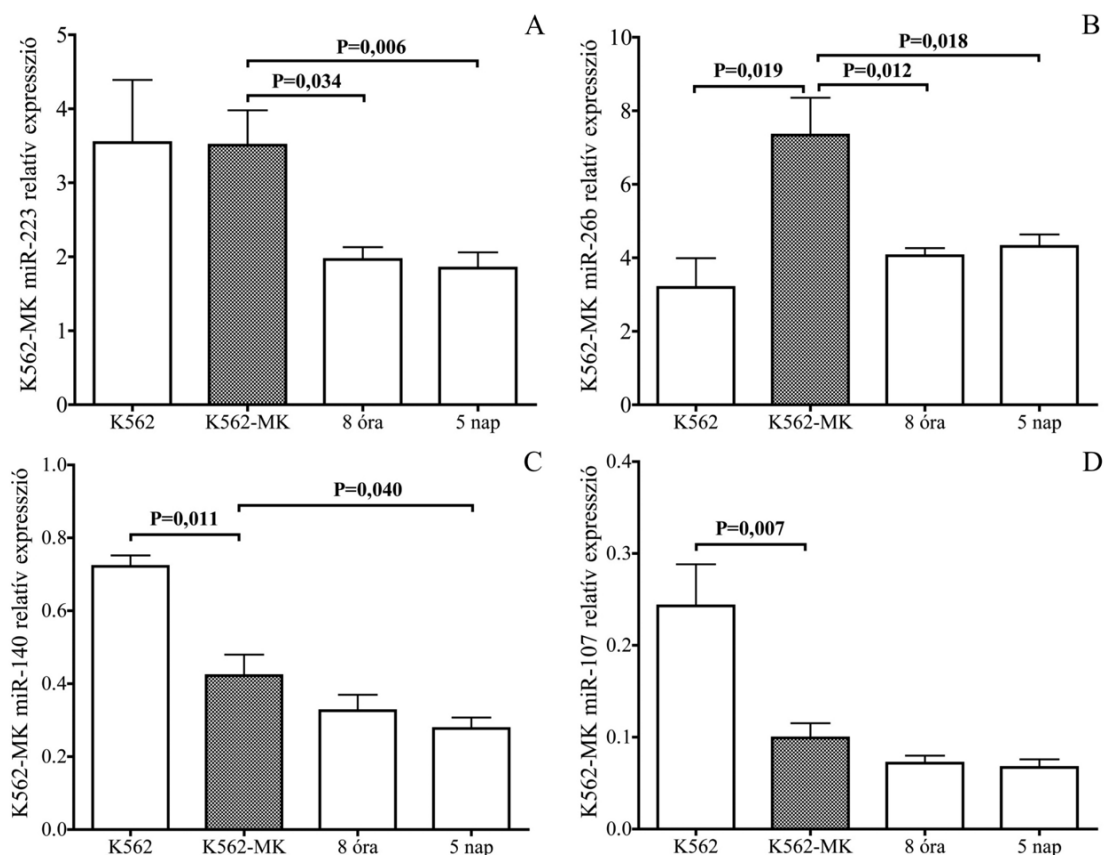
Az érett miRNS expressziók mellett a megakaryocyták pre-miRNS tartalmát is vizsgáltuk, hasonlóan a DM2-s thrombocytákhoz. Meglepő módon az érett miRNS szintekkel ellentétben a pre-miR-223 és pre-miR-26b megakaryocyta expressziója nem csökkent le a hiperglikémia hatására 24 óra elteltével sem, sőt a 4 hetes kezelés végére inkább jelentős emelkedést ($P < 0,05$) mutatott (nem ábrázolt eredmények). Ezek az adatok azt sugallják, hogy a MEG-01 sejtekben az érett miRNS szintek csökkenéséért a megváltozott Dicer1 enzim aktivitás lehet a felelős, hasonlóan, mint ahogy azt a diabeteses vérlemezkékben találták [142].

A diabeteses csontvelői körülményeket K562 sejtekből PMA-val differenciáltatott megakaryocytákban is modelleztük. Az érési folyamatot áramlási citometriai mérésekkel követtük. Az élő sejtek aránya ($85,9 \pm 1,7\%$) magas volt a megakaryopoiesis 7. napján (**26/A-B. ábra**), és a sejtek mérete, valamint granuláltsága is megváltozott az előre (FS) és az oldalra szórt (SS) fénytulajdonságok alapján. A CD41 és CD61 pozitivitása PMA kezelés hatására fokozatosan emelkedett a sejtek felszínén (**26/C-D. ábra**), ami jól mutatta a megakaryocyta irányú differenciálódást. A CD41 expressziója a kezdeti 1-2%-ról közel 40%-ra emelkedett (MFI értékek: $0,54 \pm 0,02$ vs. $2,80 \pm 0,09$, $P < 0,001$), míg a CD61 pozitivitás a sejtek 80-90%-án jelent meg a kezelés végére (MFI értékek: $0,53 \pm 0,03$ vs. $5,60 \pm 0,30$, $P < 0,001$) (nem ábrázolt eredmények). Ezután az érett megakaryocytákat magas glükóz tartalmú médiumban tartottuk különböző időtartamig (8 órától - 5 napig). Az apoptotikus sejtek megjelenése miatt nem tudtuk a differenciálódott sejteket egy hétnél tovább kezelni szemben az immortalizált MEG-01 sejtekkel.



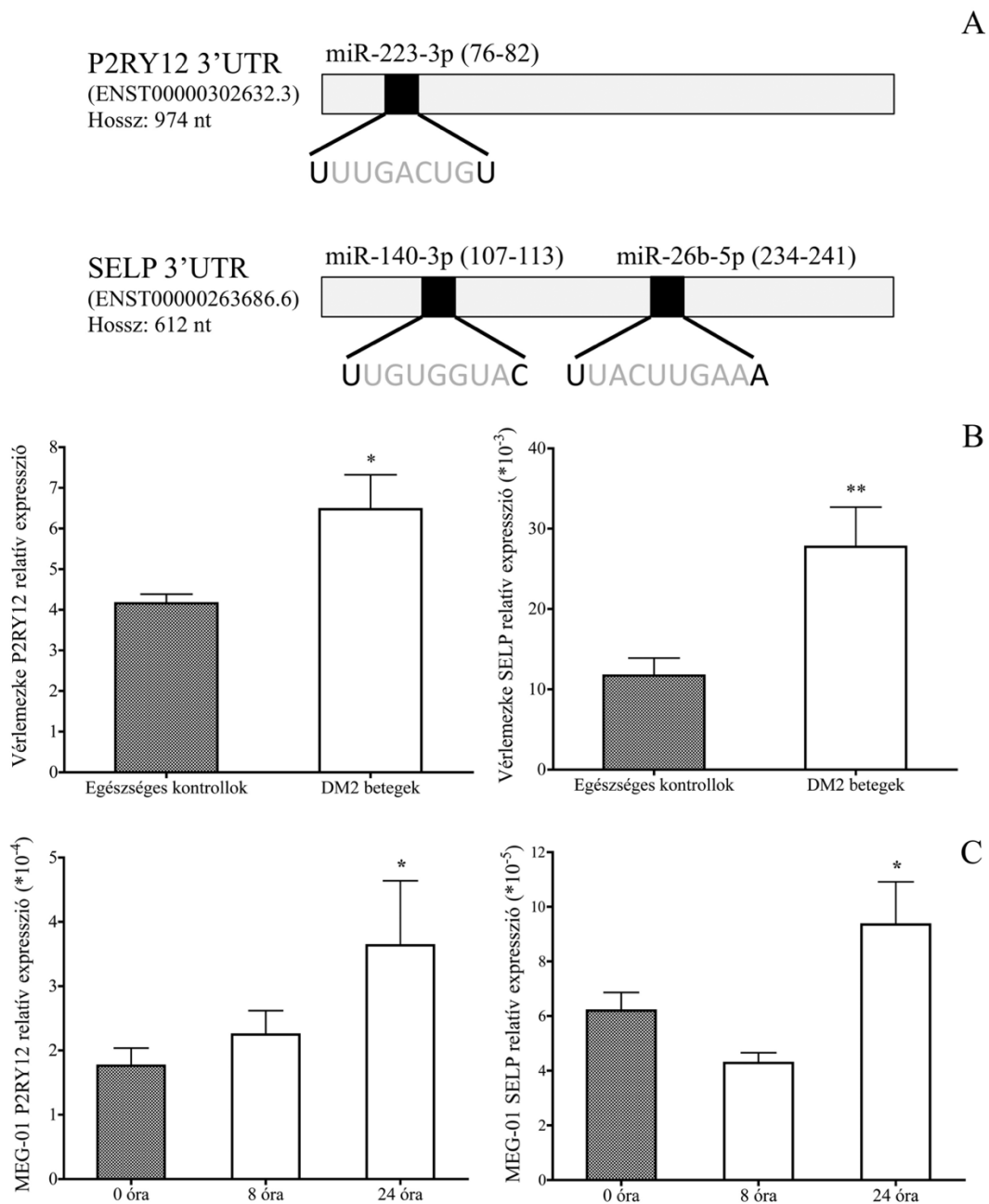
26. ábra A K562 sejtek differenciáltatása érett megakaryocytákká (MK). A kezelés előtti állapothoz képest (A) a PMA-val történt sejtérlelés során a sejtek sejt morfológiai változáson mentek át (B), és fokozatosan expresszálták a CD41-t, ami felszíni %-os pozitívással (C) és az MFI értékkel (D) is jól demonstrálható volt. A kiindulási (nem kezelt) mintákat szürke oszlopokkal jelöltük. Rövidítések: FS: forward scatter, SS: side scatter, MFI: mean fluorescence intensity/átlagos fluoreszcencia intenzitás. Átlag és SEM értékeket ábrázoltunk, n=3-4/vizsgálat. **P<0,01, ***P<0,001.

A MEG-01 sejteknél tapasztaltakhoz hasonlóan a hiperglikémia hatására a miRNS-ek expressziója a K562-MK sejtekben is szignifikánsan ($P<0,05$) csökkentek (27/A-C. ábra). A mannitol kezelés nem befolyásolta a miRNS expressziókat, és a miR-107 mennyisége (27/D. ábra) sem változott jelentősen a kezelés hatására. További érdekességként azt figyeltük meg, hogy maga a megakaryopoiesis során a miR-26b mennyisége jelentősen növekedett, míg a miR-140 és miR-107 szintjei csökkentek (27/B-D. ábra).



27. ábra A miRNS szintek változása a glükózzal kezelt K562-MK sejtekben. A K562 sejtek érett megakaryocytákká (K562-MK) történt differenciáltatása után (szürke oszlop) glükózzal kezeltük 8 órától 5 napig. A miR-223 (A), a miR-26b (B), és a miR-140 (C) szintje jelentősen csökkent a kezelés hatására, míg a miR-107 (D) szintje érdemben nem változott. Átlag \pm SEM értékeket ábrázoltunk, $n=4-8$ minta/kísérlet.

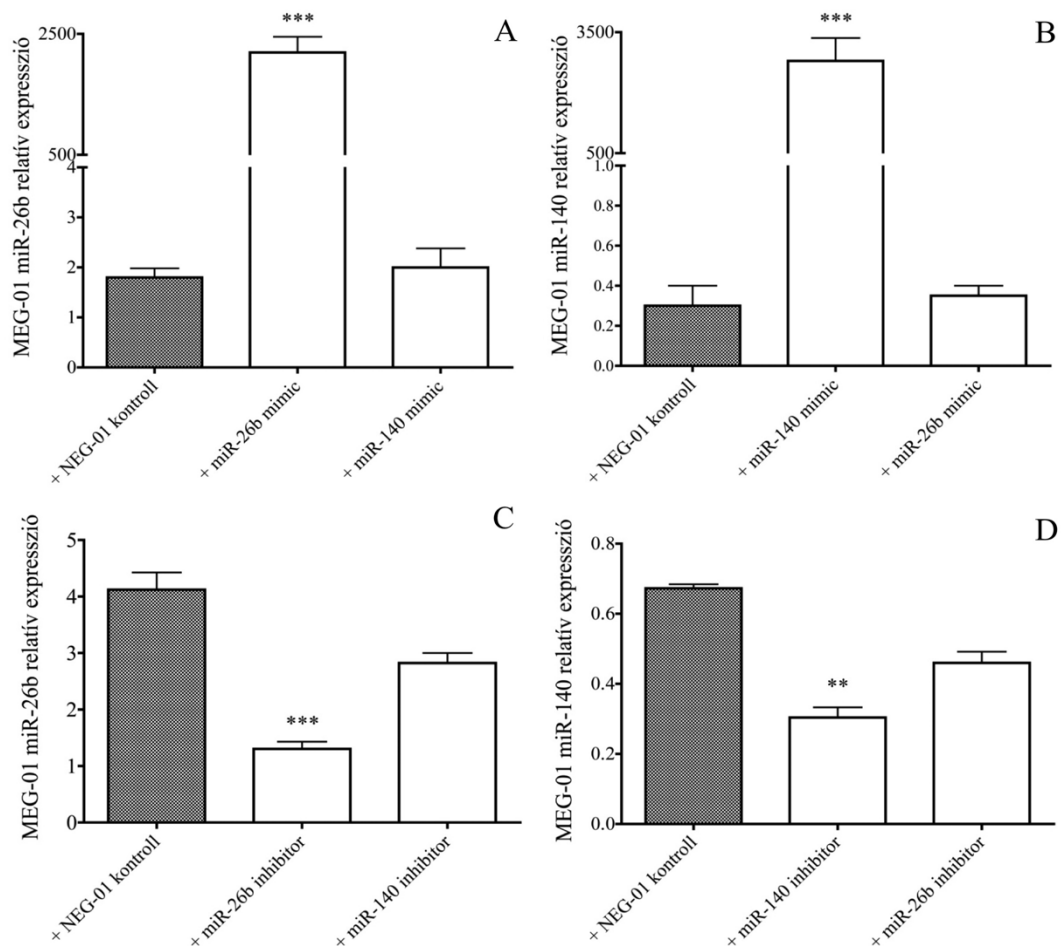
A vérlemezkékben nagy mennyiségben megtalálható miRNS-ek közül a miR-223 a *P2RY12*, míg a miR-26b és a miR-140 *SELP* gén mRNS-ét szabályozhatják a TargetScan humán predikciós program (Release 7.0, www.targetscan.org) alapján (**28/A. ábra**). Ezért megvizsgáltuk, hogy a csökkent miRNS szintek hatására hogyan változott a vérlemezkékben a cél mRNS-ek mennyisége DM2-ben és a glükózzal kezelt MEG-01 sejtekben. A *P2RY12* mRNS szintjében ($P=0,036$) és a *SELP* mRNS expressziójában ($P=0,005$) szignifikáns emelkedést tapasztaltunk diabetesben az egészséges kontrollokhoz képest (**28/B. ábra**). Ezzel párhuzamosan a glükózzal kezelt MEG-01 sejtekben is hasonló mértékű emelkedést ($P<0,05$) detektáltunk mindkét mRNS esetében 24 óra elteltével (**28/C. ábra**). A megváltozott mRNS szintek megalapozhatják a *P2Y12* és a *P-selectin* receptor nagyobb sejtfelszíni kifejeződését, ami hozzájárulhat a fokozott vérlemezke aktiváció kialakulásához DM2-ben.



28. ábra A P2RY12 és a SELP mRNS expresszió változása hiperglikémiás sejtes körülmények között. A predikációs programok alapján a P2RY12 mRNS-t a miR-223, míg a SELP mRNS-t a miR-26b és miR-140 regulálhatja a komplementaritás alapján (A). Ezért ezen miRNS-ek vizsgálata után analizáltuk a DM2 betegek vérlemezkéiben mindkét mRNS szintjét, amelyek jelentősen megemelkedtek az egészséges kontrollokhoz (szürke oszlop) viszonyítva (B). Hasonlóan a glükózzal kezelt MEG-01 sejtekben is megnőtt az mRNS-ek szintje 24 óra elteltével a nem kezelt kontroll mintákhoz (szürke oszlop) képest (C). Átlag \pm SEM értékek, n=6-10 minta/csoport. *P<0,05, **P<0,01.

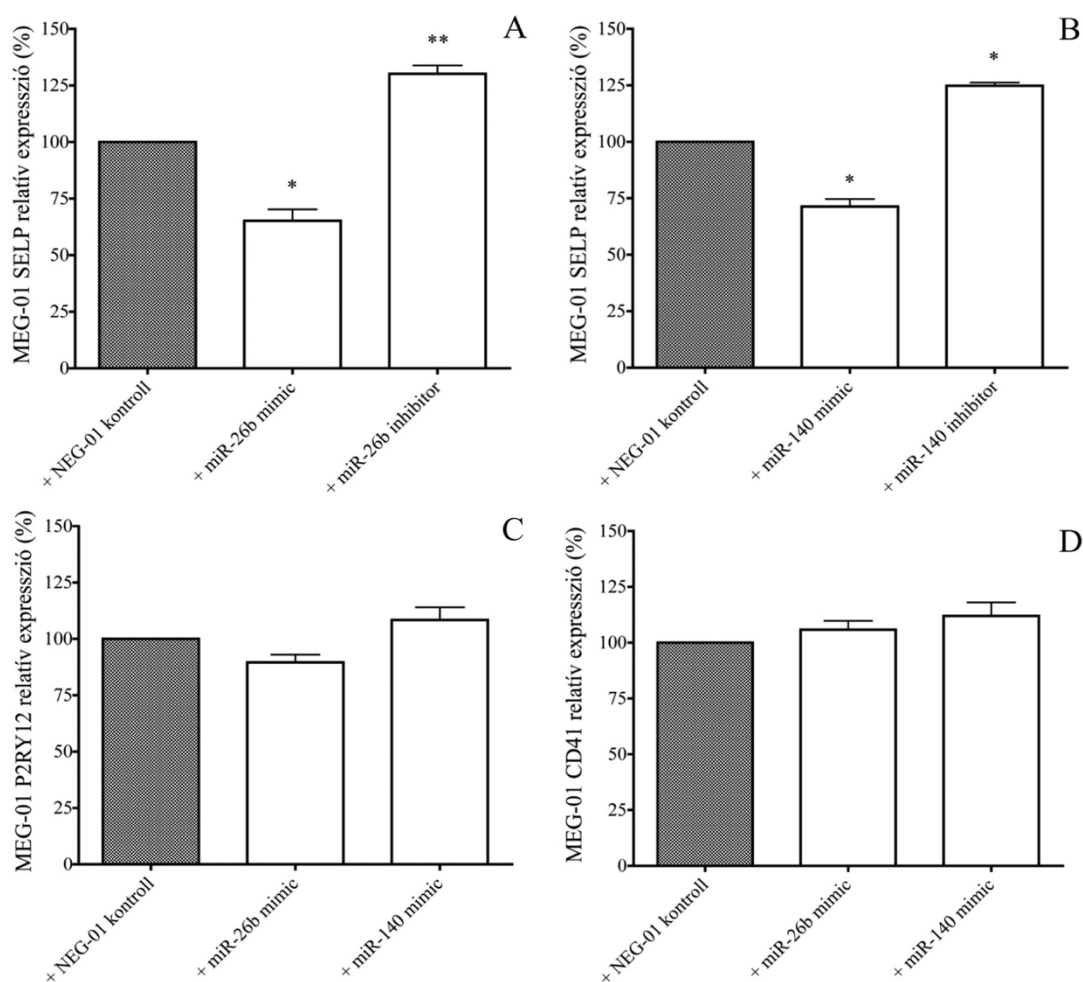
5.2.3 A miR-26b és a miR-140, valamint a SELP mRNS közötti funkcionális kapcsolat igazolása, illetve a csökkent Dicer1 funkció ellenőrzése a megváltozott miRNS szintek kialakulásában

A miR-26b, a miR-140 és a SELP mRNS közötti direkt kapcsolatot miRNS mimic-ek és inhibitor-ok használatával vizsgáltuk a MEG-01 sejtekben. A Lipofectamine reagenssel bejutatott mimic-ek hatására a miR-26b és a miR-140 fokozottan expresszálódott (29/A-B. ábra), míg a miRNS inhibitorok jelentősen gátolták a specifikus miRNS-ek szintjét (29/C-D. ábra), ugyanakkor egymás hatását keresztbe nem befolyásolták a megakaryocytákban (29/A-D. ábra).



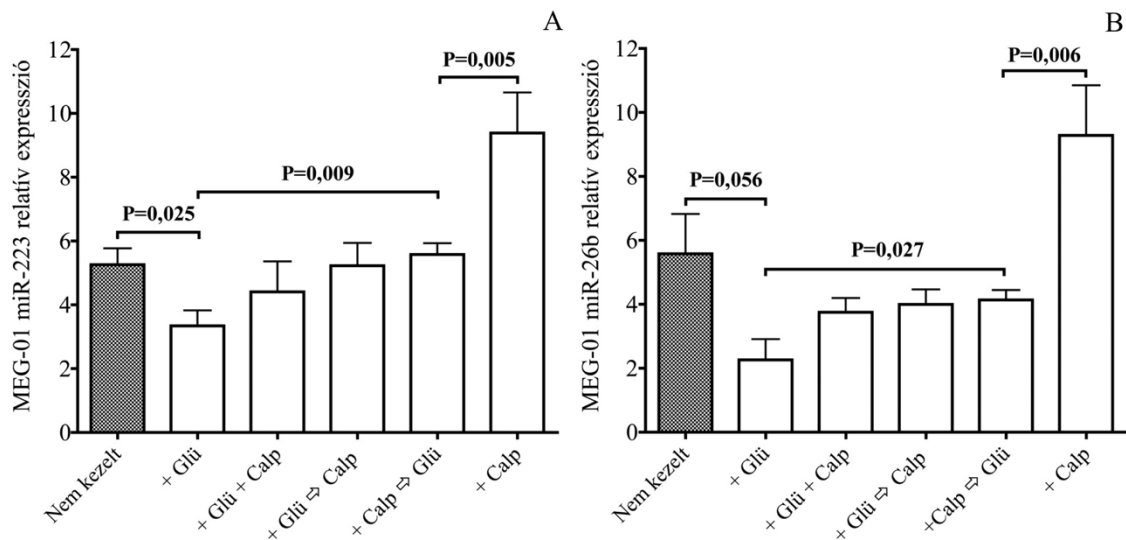
29. ábra A miRNS mimic és inhibitor transzfekció hatékonyságának ellenőrzése a miRNS expresszió mérésével a MEG-01 sejtekben. A kontroll mimic/inhibitor (NEG-01) kezelést kapott sejtmintákhoz viszonyítva (szürke oszlop) a mimic képes volt fokozni a specifikus miRNS expressziót (A, B), míg az inhibitor jelentősen csökkentette a saját miRNS szintet (C, D). Átlag és SEM értékek, n=6/kísérlet. **P<0,01, ***P<0,001.

A miRNS szintek megváltoztatása után megmértük a miR-26b és a miR-140 SELP mRNS-re kifejtett hatását: i) a SELP mRNS mennyisége jelentős mértékben csökkent mindkét miRNS mimic hatására. A negatív kontrollal (NEG-01) transzfektált sejtek SELP mRNS tartalmát 100%-nak vettük, ehhez hasonlítottuk transzfektálás után az MEG-01 sejtek SELP mRNS expresszióját (a miR-26b hatására ez 60%-ra, míg a miR-140 esetén 70%-ra csökkent, $P<0,05$), ii) az anti-miR-26b és az anti-miR-140 a SELP mRNS szignifikáns emelkedéséhez ($P<0,05$) vezetett (**30/A-B. ábra**). Ezekkel a kísérletekkel megerősítettük ezen miRNS-ek és cél mRNS-ük közötti direkt kapcsolatot. Kontrollként 2 másik fontos thrombocyta (P2RY12, CD41) mRNS expresszióját is vizsgáltuk, amikre nem voltak hatással a miR-26b és miR-140 miRNS mimic-ek, ezzel alátámasztottuk a kísérlet specificitását (**30/C-D. ábra**).



30. ábra A SELP mRNS expressziójának változása miR-26b és miR-140 specifikus mimic és inhibitor hatására a hiperglikémiás MEG-01 sejtekben. (A) A miR-26b mimic hatására jelentősen csökkent, a miR-26b inhibitor jelenlétében jelentősen nőtt a SELP mRNS szintje a negatív kontrollal (NEG-01) transzfektált mintákhoz (szürke oszlop) képest. (B) Hasonló változásokat tapasztaltunk a miR-140 expresszió modulálása esetén is. Ezzel szemben a P2RY12 (C) és CD41 (D) mRNS szintek nem változtak a fenti sejtmánipulációk esetén. Átlag és SEM értékeket tüntettünk fel, $n=6$ /kísérlet. * $P<0,05$, ** $P<0,01$.

A diabetesben tapasztalt csökkent celluláris miRNS expressziók hátterében ellenőriztük az alacsonyabb Dicer1 aktivitást. A Dicer1 enzim fontos szerepet tölt be a pre-miRNS - érett miRNS átalakulásban, ezért vizsgáltuk ezt a szabályozó lépést. A Dicer1 működését jelentősen befolyásolják a calpainok, amiket, ha egy specifikus inhibitorral, a calpeptinnel gátoltunk le, akkor megvédtük a Dicer1 enzim funkcióját. A hiperglikémiás MEG-01 sejtekhez adott calpeptin visszaállította a Dicer1 szintet, ami egyben normalizálta a miR-223 ($P=0,009$) és miR-26b ($P=0,027$) expresszióját (31/A-B. ábra).



31. ábra A módosított Dicer1 szint hatásának vizsgálata az érett miRNS expressziók szabályozásában hiperglikémiás MEG-01 sejtekben. A calpeptin (Calp) önmagában szignifikánsan megemelte a miR-223 (A) és a miR-26b (B) szintjét a nem kezelt mintákhoz (szürke oszlop) képest, ugyanakkor a glükóz (Glü) kezelés hatására jelentősen lecsökkentek a miRNS szintek. Amikor a glükóz kezelés előtt calpeptint is adtunk a sejtekhez, megakadályoztuk a miRNS expressziók csökkenését a Dicer1 protektív hatásán keresztül. Az ábrán az átlag és SEM értékeket ábrázoltuk, $n=4-6$ /csoport.

Összefoglalásként megállapítható, hogy DM2-ben a hiperglikémia hatására csökkent Dicer1 enzim funkció okozta alacsonyabb megakaryocita és thrombocyta miR-223, miR-26b és miR-140 expresszió fokozott P2RY12 és SELP mRNS szinthez vezet, amely hozzájárulhat a kóros vérelemzke reaktivitás kialakulásához a diabeteses betegekben.

5.3 Emelkedő thrombocyta aktiválódási szint értékelése obezitásban és a P2Y12 receptor által mediált szignálút vonal ebben betöltött szerepének vizsgálata

DM2-ben a thrombocyta reaktivitásról számtalan adat vált ismerté, ugyanakkor obezitásban a vérlemezke aktivációs markerek szintjének változása, illetve az ebben részt vevő thrombocyta intracelluláris folyamatok korábban egy kevésbé vizsgált terület volt.

5.3.1 Vérlemezke aktiváció specifikus biomarkerek korrelálása a carotis intima-media vastagsággal és egyéb korai atherosclerosis rizikófaktorokkal obez betegekben

Az obezitásban kimutatható thrombocyta reaktivitás vizsgálatára obez betegeket és egészséges kontroll személyeket vontunk be, akik életkorban, nemben és cigarettafogyasztásban nem mutattak különbséget (2. táblázat).

Demográfiai paraméterek és vaszkuláris kockázati tényezők	Egészséges kontroll személyek (n=62)		Obez betegek					
			Összes (n=154)		Atheroscleroticus társbetegség nélkül (n=56)		Atheroscleroticus társbetegséggel (n=98)	
	Átlag ± SD	m (q1-q3)	Átlag ± SD	m (q1-q3)	Átlag ± SD	m (q1-q3)	Átlag ± SD	m (q1-q3)
Életkor (év)	39,7 ± 10,0	39 (31–47)	40,6 ± 11,1	41 (31–50)	40,4 ± 11,8	39,5 (30–51)	40,7 ± 10,7	41 (31–49)
Nem (nő/férfi) (%)	66,1/33,9	61,7/38,3	64,3/35,7	60,2/39,8				
BMI (kg/m ²) _{a,b,c}	22,1 ± 1,96	22,4 (20,6–23,9)	38,2 ± 7,72	37,0 (31,9–43,0)	37,7 ± 8,1	36,4 (31,4–40,7)	38,5 ± 7,54	37,2 (32,0–43,2)
Haskőrfogat (cm) _{a,b,c}	79,5 ± 8,18	79 (73–86)	118,7 ± 18,3	116 (105–128)	117,4 ± 20,6	111,5 (103–123)	119,5 ± 16,8	119 (108–130)
Sohasem dohányzott (%) _e		71		52,6		53,6		52,1
Korábban dohányzott (%) _e		8		27		35,7		21,9
Dohányzik (%) _e		21		20,4		10,7		26
Hypertonia (%) _{a,c,d}		0		49,4		0		77,6
DM2 (%) _{a,c,d}		0		20,1		0		31,6
Dyslipidemia (%) _{a,c,d}		0		55,8		0		87,8
Szisztolés vérnyomás (Hgmm) _{a,b,c}	115,2 ± 9,75	120 (110–120)	128,1 ± 15,8	130 (120–138)	123,6 ± 10,3	120 (120–130)	130,7 ± 17,9	130 (120–140)
Diasztolés vérnyomás (Hgmm) _{a,b,c}	72,7 ± 7,17	70 (70–80)	80,9 ± 7,31	80 (80–80)	79,8 ± 4,53	80 (80–80)	81,5 ± 8,51	80 (80–80)
Carotis IMT (mm) _{a,b,c,d}	0,50 ± 0,08	0,49 (0,44–0,56)	0,58 ± 0,12	0,58 (0,49–0,67)	0,54 ± 0,11	0,53 (0,45–0,64)	0,60 ± 0,12	0,59 (0,50–0,70)

2. táblázat A vizsgálatba bevont összes obez beteg és az egészséges kontroll személyek legfontosabb demográfiai és vaszkuláris rizikó faktorai. Jelmagyarázat: m(q1-q3): medián (1. és 3. kvartilis) ^a Szignifikáns különbség az egészséges kontroll és a teljes obez populáció között. ^b Szignifikáns különbség az egészséges kontroll és atheroscleroticus társbetegséggel nem bíró obez betegek között. ^c Szignifikáns különbség az egészséges kontroll

és atheroscleroticus társbetegséggel bíró obez betegek között. ^d Szignifikáns különbség az atheroscleroticus társbetegség alapján kettéválasztott obez betegek között. ^e Korreláció a dohányzási szokás és az obezitás között.

Az obez személyek rendkívül magas BMI értéket ($38,2 \pm 7,72$ vs. $22,1 \pm 1,96$ kg/m²) és haskörtérfogatot mutattak ($118,7 \pm 18,3$ vs. $79,5 \pm 8,2$ cm) az egészséges kontrollokhoz képest. A carotis intima-média vastagság (IMT) értékei szintén kórosak voltak a kontrollokhoz viszonyítva ($0,58 \pm 0,12$ vs. $0,50 \pm 0,08$ mm). Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy milyen súlyosságú obezitás képes befolyásolni a thrombocyta aktiváció mértékét korai atherosclerosis rizikófaktorok jelenlétében vagy hiányában, a bevont obez betegeket a komorbiditásuk alapján két alcsoportba osztottuk: i) magasvérnyomásban, vagy DM2-ben, vagy diszlipidémiában szenvedők (n=98), és ii) ezektől a társbetegségektől mentes betegek alcsoportjára (n=56). A fenti obez kohorszok között nem volt különbség a BMI-ben, a haskörtérfogatban és a vérnyomás értékekben sem, ugyanakkor szignifikánsan ($P < 0,05$) nagyobb IMT értékeket mértünk a társbetegségek jelenlétében és hiányában ($0,60 \pm 0,12$ vs. $0,54 \pm 0,11$ mm). A dohányzás nagymértékben befolyásolta az eredményeket, mivel a jelenleg dohányzó és egyben komorbiditásokkal kezelt betegekben jóval nagyobb IMT értékek ($P=0,004$) mellett jelentősen magasabb ($P=0,012$) thrombocyta CD62 pozitivitást mértünk szemben a nem dohányzó obez betegekkel (**2. táblázat**).

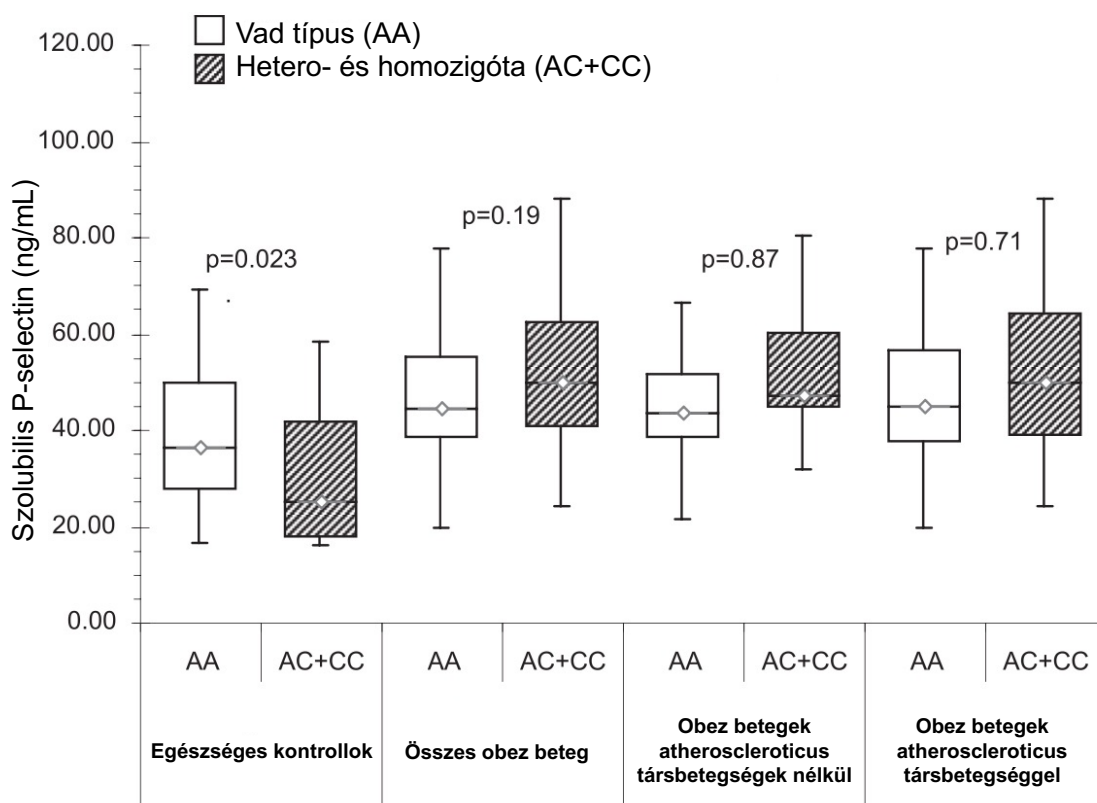
A rutindiagnosztikai paraméterek közül jelentős különbséget ($P < 0,05$) a két obez alcsoport között az éhomi glükózban, a HgbA1C-ben, a trigliceridszintben és az össz koleszterin koncentrációban találtunk (**3. táblázat**). Emellett meghatároztuk a legfontosabb vérlemezke aktivációs markereket is. A P-selectin felszíni és szolubilis formájának szintje jelentősen megemelkedett az egészséges kontrollokhoz képest (felszíni P-selectin: $1,80 \pm 1,68$ vs. $0,94 \pm 0,73\%$; szolubilis P-selectin: $55,1 \pm 34,0$ vs. $37,3 \pm 15,0$ ng/mL). A thrombocyta-eredetű mikropartikulák száma ($543,2 \pm 431,8$ vs. $174,9 \pm 118,7/\mu\text{L}$) a kontroll csoporthoz viszonyítva az összes obez betegben szignifikánsan magasabb volt ($P < 0,05$), ugyanakkor az obez kohorszon belül nem találtunk jelentős különbséget.

Laboratóriumi paraméterek és thrombocytaktivációs paraméterek	Egészséges kontroll személyek (n=62)		Obez betegek					
			Összes (n=154)		Atheroscleroticus társbetegség nélkül (n=56)		Atheroscleroticus társbetegséggel (n=98)	
	Átlag ± SD	m (q1-q3)	Átlag ± SD	m (q1-q3)	Átlag ± SD	m (q1-q3)	Átlag ± SD	m (q1-q3)
Éhomi glükóz (mM) _{a,b,c,d}	4,59 ± 0,54	4,6 (4,3–5,0)	6,23 ± 2,67	5,3 (4,9–6,6)	5,14 ± 0,62	5,1 (4,7–5,4)	6,82 ± 3,13	5,5 (5,0–7,6)
HgbA1c(%) _{a,c,d}	5,43 ± 0,43	5,4 (5,2–5,7)	6,25 ± 1,44	5,8 (5,4–6,4)	5,68 ± 0,54	5,7 (5,3–5,9)	6,56 ± 1,67	6,1 (5,5–6,9)
Éhomi inzulin (mU/L) _{a,b,c}	16,0 ± 7,94	14,9 (10,9–21,1)	42,2 ± 26,3	35,2 (25,1–47,7)	36,4 ± 16,6	34,3 (23,8–41,5)	45,7 ± 30,3	37,6 (26,6–53,3)
HOMA-IR _{a,b,c}	3,19 ± 1,59	2,90 (2,13–4,02)	10,78 ± 8,48	8,37 (6,01–12,51)	8,21 ± 3,89	7,63 (4,64–10,28)	12,25 ± 9,96	9,69 (6,56–13,96)
Triglicerid (mmol/L) _{a,b,c,d}	0,93 ± 0,42	0,9 (0,6–1,1)	1,99 ± 2,16	1,5 (1,1–2,2)	1,32 ± 0,48	1,3 (1,0–1,6)	2,37 ± 2,61	1,8 (1,2–2,5)
Összkoleszterin (mmol/L) _{a,c,d}	4,47 ± 0,67	4,3 (4,0–5,0)	5,22 ± 1,26	5,1 (4,55–5,8)	4,60 ± 0,70	4,7 (4,35–5,0)	5,49 ± 1,37	5,4 (4,6–6,1)
LDL-koleszterin (mmol/L) _{a,c}	2,47 ± 0,77	2,4 (2,0–3,1)	3,0 ± 0,87	2,9 (2,5–3,6)	2,77 ± 0,60	2,8 (2,4–3,2)	3,11 ± 0,95	3,0 (2,5–3,8)
HDL-koleszterin (mmol/L) _{a,b,c}	1,75 ± 0,51	1,7 (1,4–2,0)	1,39 ± 0,39	1,3 (1,1–1,6)	1,43 ± 0,42	1,4 (1,1–1,6)	1,36 ± 0,38	1,3 (1,1–1,5)
Atherogén index _{a,b,c}	2,78 ± 0,72	2,75 (2,25–3,25)	4,08 ± 1,31	4,0 (3,13–4,78)	3,70 ± 0,83	3,68 (3,09–4,34)	4,27 ± 1,47	4,14 (3,21–4,86)
hs-CRP (mg/L) _{a,b,c}	1,51 ± 1,59	0,93 (0,50–2,10)	7,76 ± 7,29	5,09 (2,70–10,34)	7,88 ± 7,59	4,28 (2,57–11,61)	7,69 ± 7,16	5,4 (2,95–9,64)
Fibrinogén (g/L) _{a,b,c}	2,94 ± 0,53	2,95 (2,59–3,28)	4,14 ± 0,90	4,12 (3,38–4,79)	4,13 ± 0,87	4,04 (3,50–4,79)	4,14 ± 0,92	4,23 (3,34–4,79)
FVIII aktivitás (%) _{a,b,c}	165,9 ± 55,7	159 (125–200)	206,1 ± 78,1	190 (146–254)	208,4 ± 82,1	196 (140–254)	204,8 ± 76,0	189 (152–252)
PAI-1 (ng/mL) _{a,b,c}	47,2 ± 14,2	47,5 (36,6–58,7)	83,1 ± 15,7	86,6 (73,5–93,8)	82,0 ± 17,0	84,4 (71,3–93,8)	84,0 ± 14,7	87,4 (74,0–93,9)
Felszíni P-selectin (%) _{a,b,c}	0,94 ± 0,73	0,72 (0,39–1,18)	1,80 ± 1,68	1,30 (0,69–2,26)	1,82 ± 1,80	1,18 (0,68–2,02)	1,78 ± 1,61	1,43 (0,70–2,30)
Szolubilis P-selectin (ng/mL) _{a,b,c}	37,3 ± 15,0	35,7 (25,1–45,9)	55,1 ± 34,0	45,2 (38,7–58,0)	54,9 ± 38,0	44,3 (38,7–54,9)	55,3 ± 31,8	48,0 (38,7–61,1)
PMP (n/μL plazma) _{a,b,c}	174,9 ± 118,7	165 (68–241)	543,2 ± 431,8	392 (234–715)	494,5 ± 368,8	362,5 (236–614,5)	571,1 ± 463,7	407 (227–777)

3. táblázat Különböző laboratóriumi paraméterek és thrombocytaktivációs markerek, amelyek atherosclerosis rizikót jelenthetnek. Jelmagyarázat: m (q1-q3): medián (1. és 3. kvartilis). ^a Szignifikáns különbség az egészséges kontroll és a teljes obez populáció között. ^b Szignifikáns különbség az egészséges kontroll és atherosclerosisos társbetegséggel nem bíró obez betegek között. ^c Szignifikáns különbség az egészséges kontroll és atherosclerosisos társbetegséggel bíró obez betegek között. ^d Szignifikáns különbség az atherosclerosisos társbetegség alapján kettéválasztott obez betegek között.

Külön megvizsgáltuk a P-selectin receptor génjének a leggyakrabban vizsgált polimorfizmusát (Thr715Pro) annak tisztázása érdekében, hogy befolyásolta-e érdemben a plazma P-selectin szinteket ezekben az obez betegekben. A Thr715Pro P-selectin polimorfizmus gyakorisága (A=715Thr; C=715Pro) hasonló volt a két csoport között: 72,6%

AA (n=45), 27,4% AC (n=17) az egészségesekben, és 76,0% AA (n=117), 22,7% AC (n=35), 1,3% CC (n=2) az összes obez betegben. Miután CC genotípusú személy nem volt a kontrollok között és nagyon kevés volt az obez csoportban is, a statisztikai számolások egyszerűsítése érdekében a CC betegeket az AC betegcsoportba soroltuk. Az egészségesek között a szolubilis P-selectin koncentrációk szignifikánsan ($P=0,023$) alacsonyabbak voltak a hetero- és homozigóta személyekben (25,1 [17,9–41,9] ng/mL) szemben a vad típusú kontrollokkal (36,6 [27,8–50,0] ng/mL). Ugyanakkor nem volt különbség ($P=0,190$) az obez betegek között, vagy amikor csoportosítottuk őket a komorbiditások alapján: az AC+CC betegeknél 49,7 (40,7–62,3) ng/mL, míg a AA genotípusúakban 44,3 (38,5–55,1) ng/mL értékeket mértünk (**32. ábra**).



32. ábra A P-selectin gén Thr715Pro polimorfizmusának hatása a szolubilis P-selectin szintekre egészséges kontrollokban és különböző obez betegcsoportokban. Tekintettel a CC genotípusú betegek alacsony számára, összevontuk a hetero- és homozigóta betegeket egymással. Genotípus értelmezése: AA genotípus: Thr715Thr, AC/CC: Thr715Pro/ Pro715Pro.

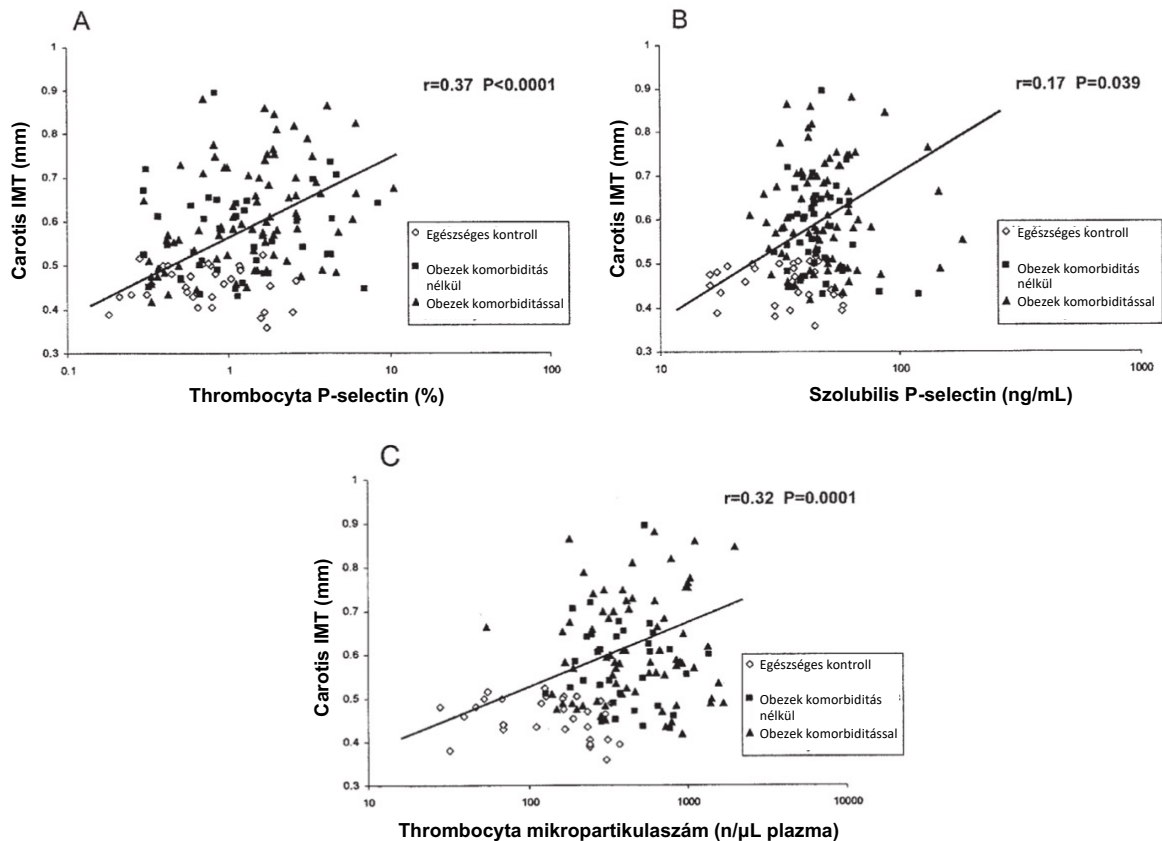
Ezt követően megvizsgáltuk a különböző thrombocytá aktivációs markerek és az atherosclerosis rizikófaktorai közötti korrelációt Spearman teszttel mindkét nagy vizsgálati csoportban (**4. táblázat**).

Klinikai és laboratóriumi paraméterek	Felszíni P-selectin (%)	Szolubilis P-selectin (ng/mL)	PMP (n/μL plazma)
BMI (kg/m ²)	0,25***	0,25***	0,37***
Haskőrfogat (cm)	0,18*	0,16*	0,39***
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	0,26***	0,13	0,17*
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	0,26***	0,13	0,23**
Carotis intima-media vastagság (mm)	0,37***	0,17*	0,32***
Éhomi glükóz (mmol/L)	0,21**	0,14	0,28***
HgbA1c (%)	0,20**	0,13	0,22**
Éhomi plazma inzulin (mU/L)	0,28***	0,27***	0,32***
HOMA-IR	0,32***	0,32***	0,38***
Triglicerid (mmol/L)	0,26**	0,23**	0,30***
Összkoleszterin (mmol/L)	0,26***	0,11	0,14
LDL-koleszterin (mmol/L)	0,18*	0,17*	0,15*
HDL-koleszterin (mmol/L)	-0,16*	-0,23***	-0,20**
Atherogén index	0,23**	0,28***	0,30***
CRP (mg/L)	0,18*	0,23**	0,37***
Fibrinogén (g/L)	0,05	0,15*	0,39***
FVIII aktivitás (%)	0,1	0,06	0,18*
PAI-1 (ng/mL)	0,30***	0,26**	0,48***

4. táblázat Korrelációk a Spearman teszt r értékei alapján a különböző atherosclerosis rizikófaktorok és a thrombocyta aktivációs paraméterek között. A csillagok a szignifikáns különbség különböző fokozatait jelölik: *P=0,05–0,01, **P=0,01–0,001, ***P<0,001.

Szignifikáns, pozitív összefüggést (P<0,010) találtunk az egyes vérlemezke aktivációs markerek és a BMI, az éhomi inzulin, a HOMA-IR és PAI indexek, a triglicerid koncentráció, és a PAI-1 szint között. Különösképpen a thrombocyta eredetű mikropartikulák mennyisége mutatott szoros összefüggést a legtöbb atherosclerosis rizikót jelentő paraméterrel, nevezetesen a BMI-vel (r=0,37), a haskörtérfogattal (r=0,39), az éhomi glükóz koncentrációval (r=0,28), a HOMA-IR indexszel (r=0,38) és a trigliceriddel (r=0,30). A felszíni és a plazma P-selectin értékek szignifikáns (P<0,001) pozitív összefüggést mutattak a BMI-vel (r=0,25), az éhomi inzulinnal (r=0,28), a HOMA-IR indexszel (r=0,32), a PAI indexszel (r=0,23) és a PAI-1 koncentrációval (r=0,30). Egyedül a HDL-koleszterin mutatott erős fordított összefüggést

($P < 0,05$) az egyes thrombocyta aktivációs paraméterekkel. Külön vizsgáltuk a carotis IMT és az egyes vérlemezke markerek közötti relációt is: a thrombocyta P-selectin expresszióval ($r=0,37$; $P < 0,0001$), a szolubilis P-selectin szinttel ($r=0,17$; $P=0,039$) és a vérlemezke mikropartikulák mennyiségével ($r=0,32$; $p=0,0001$) pozitív szignifikáns kapcsolatot mutatott az IMT, amikor a 2 obez és a kontroll vizsgálati csoportokat egybe vettük (**33/A-C. ábra**).



33. ábra Korreláció vizsgálata a carotis IMT értékek és a felszíni P-selectin pozitivitás (A), a szolubilis P-selectin koncentráció (B), és a vérlemezke mikropartikulák mennyisége (C) között. A különböző geometriai sémák egy-egy beteg/kontroll személy eredményét reprezentálják. Az ábrán a Spearman teszttel meghatározott r koefficiensét és P értéket ábrázoltuk.

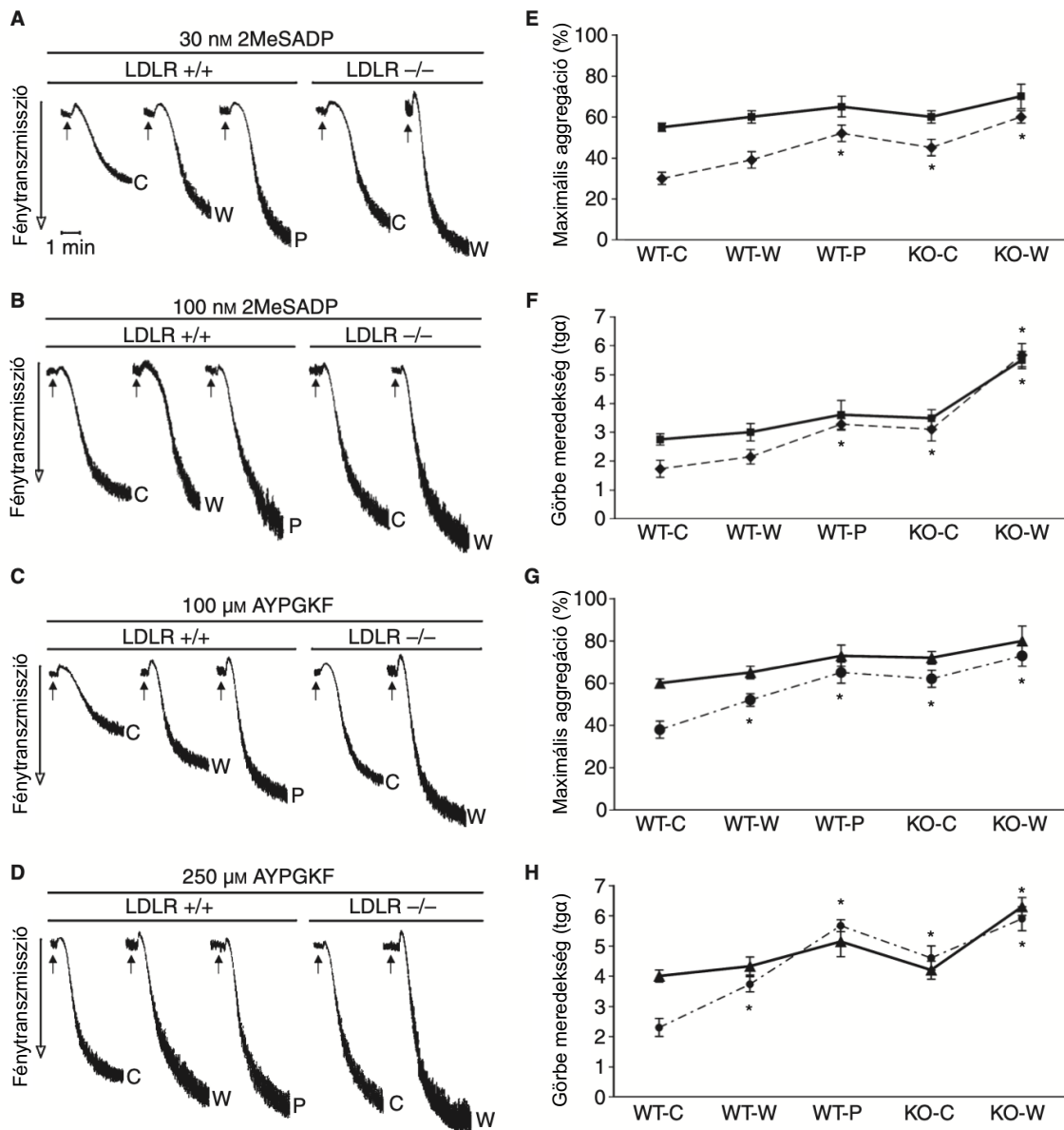
Végül többszörös regressziós analízis segítségével külön is megvizsgáltuk a thrombocyta aktivációs markereket, hogy vajon független paraméterként továbbra is mutattak-e összefüggést a különböző atherosclerosis rizikófaktoral, miután korrigáltattuk a kiindulási demográfiai és laboratóriumi változókra. Azt tapasztaltuk, hogy a thrombocyta mikropartikulák a BMI-vel ($P < 0,0001$), a plazma P-selectin a fibrinogén koncentrációval ($P=0,007$), míg a felszíni P-selectin pozitivitás értéke a PAI-1 koncentrációval ($P=0,009$) és a carotis IMT-vel ($P=0,012$) továbbra is szignifikáns, független összefüggést mutatott (nem ábrázolt eredmények).

5.3.2 *Thrombocyta funkciós vizsgálatok normál és magas zsírtartalmú diétán tartott LDL-receptor hiányos és vad típusú egerekben*

Az elmúlt években a különböző súlyosságú lipidanyagcsere zavarban mért, különösen sejtaktivációval összefüggő *ex vivo* klinikai adatok mellett relatíve kevés *in vitro* eredmény volt ismert, amelyek segítették volna a kóros intracelluláris folyamatok jobb megismerését. Ezért tartottuk fontosnak az egyik központi thrombocyta receptoron (P2Y12) keresztül indukálódó vérlemezke aktivációs változások feltérképezését egy diszlipidémiás egérmodellben.

A vizsgálatunkat megelőzően az LDLR^{-/-} és WT egereket normál, illetve kétféle magas zsírtartalmú (Western vagy Paigen) diétán tartottuk 8 hétig, és meglehetősen eltérő össz koleszterinszintet mutattak: a Western, valamint a Paigen diétán lévő WT egerek kb. 2-2,5x-es össz koleszterinszint emelkedést mutattak (125 ± 17 mg/dL vagy $3,23 \pm 0,44$ mmol/L, illetve 185 ± 15 mg/dL vagy $4,78 \pm 0,39$ mmol/L), míg az LDLR^{-/-} egerekben már normál tápon is kb. 3-szor (191 ± 23 mg/dL vagy $4,94 \pm 0,59$ mmol/L) nagyobb össz koleszterin értékeket mértünk szemben a standard diétán lévő WT típusú egerek (69 ± 10 mg/dL vagy $1,78 \pm 0,26$ mmol/L). Ugyanakkor a Western diétán az LDLR^{-/-} egerekben extrém magas koncentrációjú koleszterin koncentrációkat (1011 ± 185 mg/dL vagy $26,14 \pm 4,78$ mmol/L) mértünk. Az állatok neme nem befolyásolta ezen értékeket. Kiemelendő, hogy a fenti koleszterin értékek gyakorlatilag megfelelnek obezításban, illetve familiáris hiperkoleszterinémiában mérhető humán eredményekkel, ezért ezek az egerek megfelelő állatmodellt jelentettek arra, hogy *in vitro* megvizsgáljuk enyhe és súlyos hiperkoleszterinémiában a vérlemezke aktiváció mértékét, különös tekintettel a P2Y12 receptor mediált útvonalra vonatkoztatva.

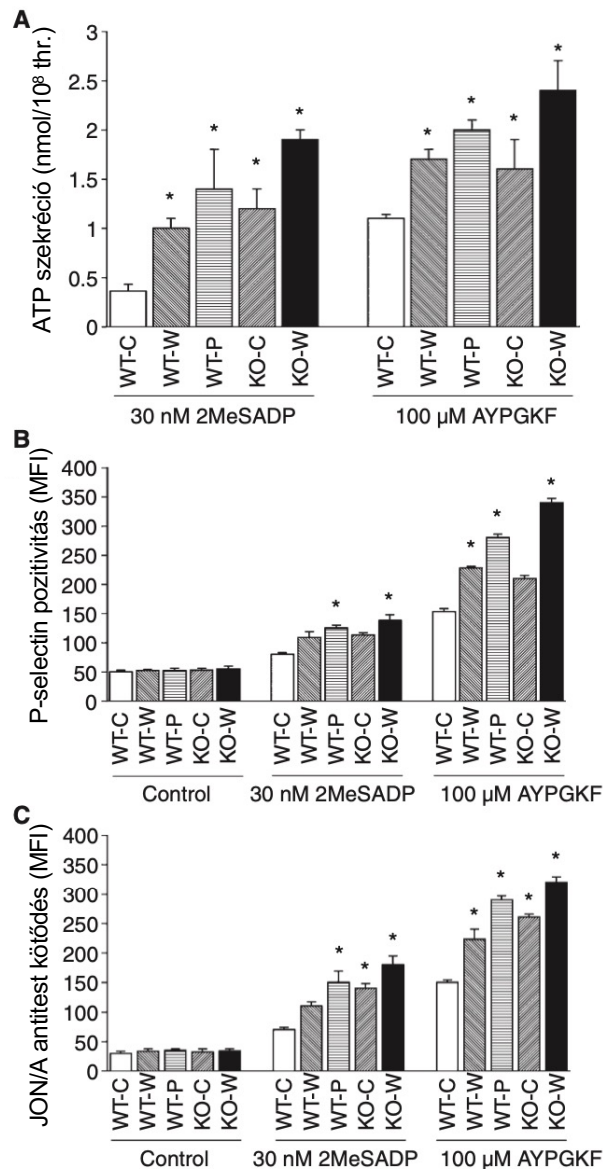
Elsőként alacsony, illetve szubmaximális koncentrációjú ADP-receptor agonistát (2MeSADP) és PAR4-t aktiváló AYPGKF peptidet használtunk a G_i protein közvetített aggregációhoz (**34/A-H. ábra**). Azt tapasztaltuk, hogy mindkét alacsony koncentrációjú agonista hatására fokozatosan, szignifikáns módon ($P < 0,05$) nőtt a maximális aggregáció mértéke (**34/A, C. ábra**) és az aggregációs görbe meredeksége a 2,5-szeres koleszterinszintet mutató egerekben szemben a normokoleszterinémiás állatokkal. Ugyanakkor a magas agonista koncentráció mellett nem kaptunk jelentős különbséget a különböző egércsoportok között (**34/B, D. ábra**). Ezen eredmények alapján tehát erős pozitív korreláció látszódott a P2Y12 receptor indukálta vérlemezke aggregáció mértéke és a magas koleszterinszint között.



34. ábra 2MeSADP és AYPGKF-indukált vérlemezke aggregáció értékelése standard/„chow” (c), Western (w), illetve Paigen (p) diétán tartott LDLR^{+/+} (WT) és LDLR^{-/-} (KO) egerekben alacsony és szubmaximális koncentrációjú agonisták hatására. Az izolált egér thrombocytákat 2MeSADP-vel (A, B), illetve PAR4 agonista AYPGKF peptiddel (C, D) 3,5 percig 37 °C-on aggregáltuk indomethacin előkezelés nélkül. A reprezentatív aggregációs görbék 3 különböző kísérletben feldolgozott min. 3 donor állat eredményei alapján lettek kiválogatva. A maximális aggregáció mértéke (E, G) és a görbék meredeksége (F, H) külön is kiértékelésre került. A „folyamatos” vonal a szubmaximális agonista koncentrációval, míg a „szaggatott” vonal az alacsony agonista koncentráció mellett kapott aggregációt jelöli (2MeSADP: E,F; AYPGKF: G,H). *P<0,05 vs. normokoleszterinémiás egerek. Az adatok átlag ± SEM formában vannak ábrázolva.

Az aggregációval párhuzamosan az ATP szekréció mértéke is szignifikánsan magasabb (P<0,05) volt a különböző hiperkoleszterinémiás egerekben összehasonlítva a kontroll egerekkel (35/A. ábra). Az ATP szekrécióhoz hasonlóan az α -granulum szekréció változása is hasonló tendenciát mutatott. A P-selectin expresszió is különbözött az eltérő lipid értékek

mellett mindkét (alacsony koncentrációjú) agonista aktiváció után: a normál koleszterinszinttel bíró egerekhez képest a (nagyon) magas zsírtartalmú diétán tartott állatokban nőtt jelentősen a CD62 pozitívitas ($P < 0,05$), bár a WT állatok között a Western és normál diéta mellett ($P = 0,064$), illetve a standard (chow) tápon lévő LDLR^{-/-} és WT egerek között markáns, de nem szignifikáns ($P = 0,057$) különbség volt látható. A nem aktivált, de eltérő eredetű thrombocytá minták között különbség nem volt (35/B. ábra).

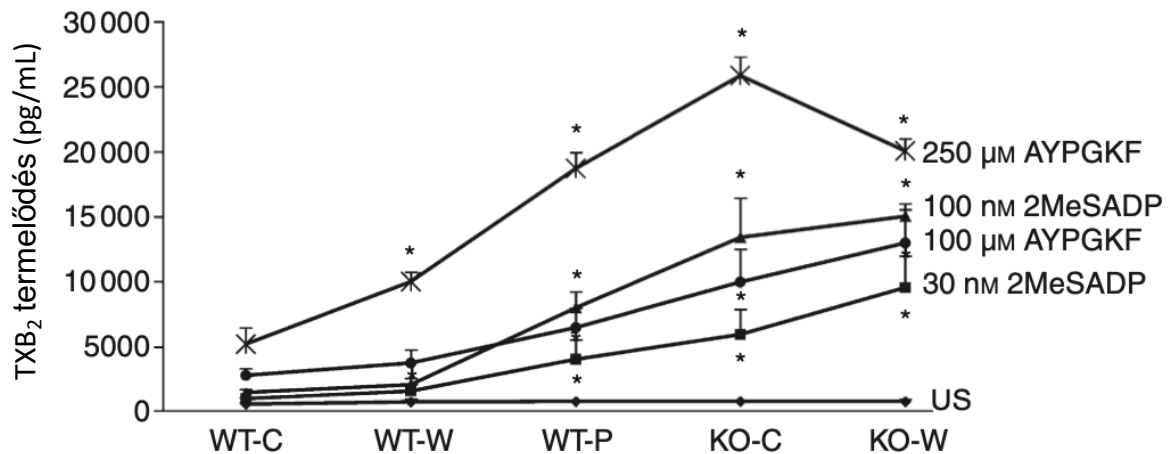


35. ábra A δ - és α -granulum szekréció, valamint az α IIB β 3 receptor aktiváció összehasonlítása a P2Y12 receptor mediált vérolemezke aktiválódáskor standard/„chow” (c), Western (w), illetve Paigen (p) diétán tartott LDLR^{+/+} (WT) és LDLR^{-/-} (KO) egerekben alacsony és szubmaximális koncentrációjú agonisták jelenlétében. (A) A δ -granulum szekréció mértékét a felszabadult ATP mennyisége alapján határoztuk meg. (B) A P-selectin pozitívitas mértékét a FITC-jelölt P-selectin (CD62) ellenes antitesttel vizsgáltuk, míg (C) az α IIB β 3 receptor aktivációt a JON/A antitest kötődésén keresztül analizáltuk. * $P < 0,05$ vs. normokoleszterinémias egerek. Az oszlopok min. 3 minta eredményeit demonstrálják. Az értékek átlag \pm SEM formában vannak kifejezve.

Az α IIb β 3 integrin aktivációját áramlási citometriával a JON/A antitest kötődésével követtük, ami szintén fokozatosan nőtt a súlyosbodó diszlipidémiával társult kóros vérlemezke funkcióval. Megjegyzendő, hogy a magas agonista koncentrációk esetén az aktivációs folyamatokban látott különbségek az egyes fenotípusok között már eltűntek (35/C. ábra).

5.3.3 A P2Y12 receptor mediált útvonal szerepének vizsgálata a kóros vérlemezke reaktiválásban, illetve a thrombocyta ERK és Akt foszforiláció változása különböző súlyosságú hiperkoleszterinémias egerekben

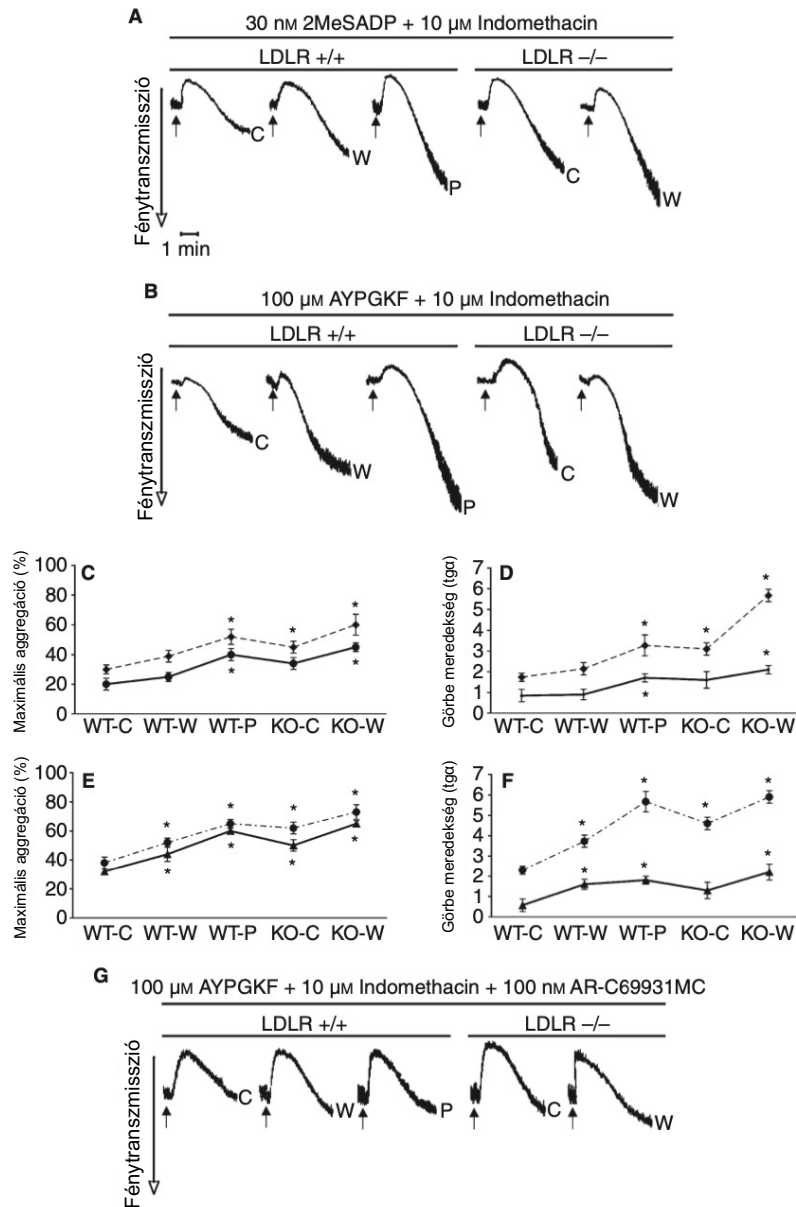
Ezt követően a TXA₂ szintézis is vizsgáltuk ADP-receptor és a PAR indukálta vérlemezke aktivációt követően, illetve a különböző lipidanyagcsere eltérések jelenlétében (36. ábra). A kiindulási TXB₂ szintekben nem találtunk különbséget a nem kezelt különböző minták esetén. Ugyanakkor fokozatosan növekedett a TXB₂ szint (P<0,05) függetlenül attól, hogy alacsony vagy szubmaximális koncentrációjú agonistával történt az indukció. Érdekes módon a Western diétán tartott LDLR^{-/-} (KO) egerek nem mutattak még magasabb TXB₂ értékeket, mint a normál („chow”) étrendű LDLR^{-/-} (KO) egerek a 250 μ M AYPGKF-val történt stimuláció után.



36. ábra A TXA₂ szintézis követése a TXB₂ szint vizsgálatán keresztül standard/„chow” (c), Western (w), illetve Paigen (p) diétán tartott LDLR^{+/+} (WT) és LDLR^{-/-} (KO) egerekben alacsony és szubmaximális koncentrációjú 2MeSADP és AYPGKF jelenlétében. A 3,5 percig aggregométerben stimulált vérlemezkéket szárazjég-methanolban lefixáltuk és a TXB₂ szinteket ELISA-val megmértük. *P<0,05 vs. normokoleszterinémias egerek. Az értékek átlag \pm SEM formában vannak kifejezve min. 3 minta/csoport eredményei alapján.

Vizsgáltuk továbbá, hogy a P2Y12 receptor mediált szignalizációnak mekkora szerepe lehet a vérlemezkek aktiválásában a TXA₂ szintézis hiányában, ezért az egér thrombocytákat indomethacinnal előkezeltük a folyamatokat befolyásoló TXA₂ termelődés megakadályozása

érdekében. Hasonló különbséget találtunk az egyes fenotípusok között, mint a TXA₂ jelenlétében az alacsony koncentrációjú 2MeSADP és az AYPGKF stimuláció után (37/A-B. ábra). Ahogyan erre számítottunk, a maximális aggregáció és a görbék meredeksége is jelentősen lecsökkent a TXA₂ hiányában szemben az indomethacinnal nem kezelt mintákkal (37/C-F. ábra).

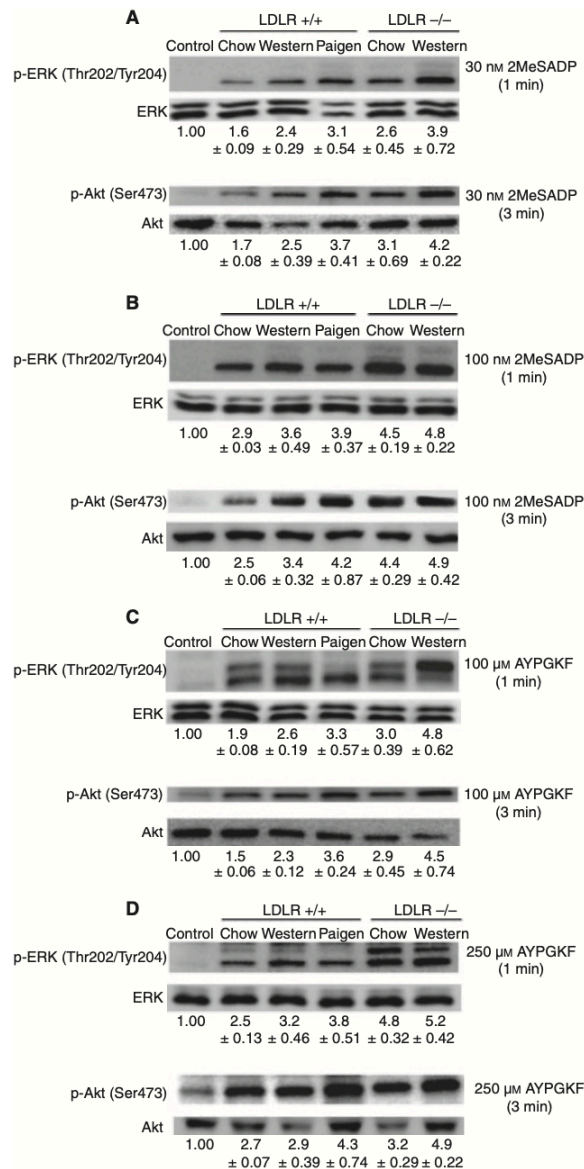


37. ábra Vérlemezke aggregáció összehasonlítása standard „chow” (c), Western (w), illetve Paigen (p) diétán tartott LDLR^{+/+} (WT) és LDLR^{-/-} (KO) egerekben 2MeSADP (A) és AYPGKF (B) aktiváció után indomethacinnal (A-G), illetve AR-C69931MC inhibitorral (G) történt előkezelés után. A maximális aggregáció (C, E) és a görbék meredeksége (D, F) külön is kiértékelésre került. A „szaggatott” vonal TXA₂ termelődés mellett, míg a „folyamatos” vonal a TXA₂ szintézis blokkolása mellett történt aggregációt jelöli (2MeSADP: C, D; AYPGKF: E, F). A reprezentatív aggregációs görbék 3 különböző kísérletben feldolgozott min. 3 donor állat eredményei alapján lettek kiválogatva. *P<0,05 vs. normokoleszterinémias egerek. Az adatok átlag ± SEM formában kerültek ábrázolásra.

Ezen túlmenően egy specifikus P2Y12 receptor antagonistával (AR-C69931MX) is kezeltük az indomethacinnal már előkezelt vérlemezke mintákat aggregáció előtt. Jóval kisebb mértékű aggregációt tapasztaltunk az alacsony AYPGKF stimuláció hatására, amikor a TXA₂ szintézis és a P2Y12 receptor-indukált szignalizáció is gátolt volt, viszont az aggregáció mértéke közötti különbségek már eltűntek a különböző koleszterinszintet mutató állatok között (**37/G. ábra**). Ezek az eredmények alátámasztják, hogy az emelkedett TXA₂ termelődés döntően, de nem kizárólag járul hozzá a hiperkoleszterinemiában látott fokozott vérlemezke funkcióhoz, és a P2Y12 receptor mediált útvonal aktív szerepet játszik ennek kialakításában.

Végül megvizsgáltuk, hogy a P2Y12 receptorhoz kapcsolt útvonal fokozottabb ERK és Akt foszforilációt indukál-e a magasabb koleszterinszintet mutató egerekben. Alacsony koncentrációjú 2MeSADP (**38/A-B. ábra**) és AYPGKF (**38/C-D. ábra**) hatására egy fokozatos emelkedés volt megfigyelhető az ERK foszforiláció szintjében párhuzamosan a diszlipidémia súlyosságának növekedésével. Ezzel szemben a szubmaximális agonista koncentrációk alkalmazásakor lényegi különbség az ERK foszforiláltsági állapotában már nem látszódott.

Ezzel párhuzamosan az ADP agonista által közvetlen módon, illetve a PAR-stimuláció hatására szekretálódó ADP által indirekt módon stimulált P2Y12 receptorhoz kötött G_i proteinen keresztül aktiválódó Akt fehérje foszforilálódását is detektáltuk western blot segítségével. A foszforilált-(Ser473)-Akt mennyisége különösen az alacsony koncentrációjú 2MeSADP és a magasabb koncentrációjú AYPGKF peptid (PAR4) aktiváció után emelkedett meg a kontroll egerekhez képest, főleg azokban az állatokban, akiknek nagyon magas volt a koleszterinszintje (**38/A-D. ábra**). Mindkét vizsgálatsorozatban a vérlemezkék indomethacinnal voltak előkezelve annak érdekében, hogy a TXA₂ termelődést megelőzzük, így mindkét protein eltérő foszforilációs mintázata a primer receptor szignalizációnak volt köszönhető.



38. ábra Az ERK és Akt fehérje foszforiláció vizsgálata 2MeSADP és AYPGKF stimulációt követően normo- és hiperkoleszterinemiás egerekben. A standard/„chow” (c), Western (w), illetve Paigen (p) diétán tartott LDLR^{+/+} és LDLR^{-/-} egerek izolált vérlemezkéit indomethacinnal előkezeltük, majd a mintákat 1 percig aktiváltuk az ERK, és 3 percig az Akt foszforiláció vizsgálata érdekében, amiket western blot technikával vizsgáltunk foszforilált-(Thr202/Tyr204)-ERK és foszforilált-(Ser473)-Akt ellenes antitest felhasználásával. A minták fehérjetartalmának összehasonlításához össz ERK és össz Akt ellenes antitestet használtunk. A foszforiláció mértékét kvantáltuk denzitometriával és meghatároztuk a változás mértékét a kontrollhoz képest. Átlag ± SEM, 3 különböző kísérletben feldolgozott min. 3 minta eredményei alapján.

Összességében tehát megállapíthatjuk, hogy obezitásban fokozatosan nő a vérlemezke aktiváció szintje, és a P2Y₁₂ receptor indukálta útvonal jelentős mértékben elősegíti ezt TXA₂-függő és TXA₂-független módon - indukált ERK és Akt foszforiláció révén - nemcsak extrém hiperkoleszterinemiában, hanem már mérsékelt emelkedett koleszterinszintek jelenlétében is.

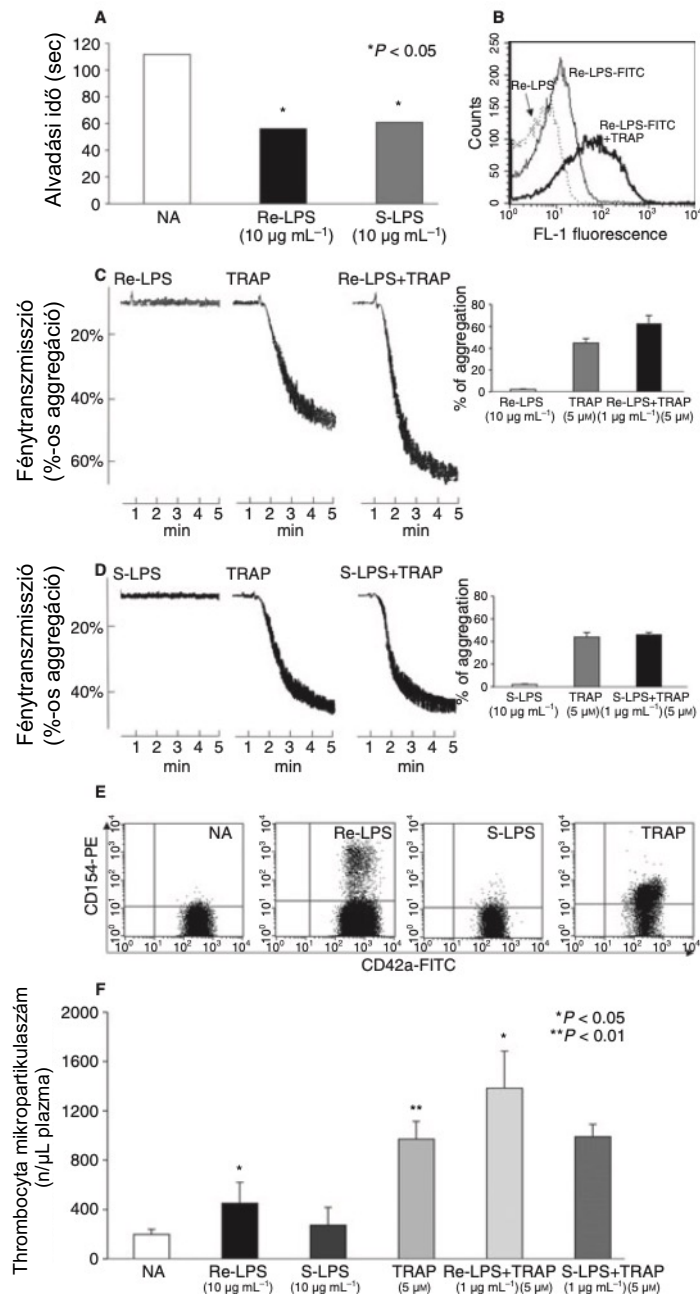
5.4 A megakaryocita-thrombocyta eredetű miRNS-ek szerepe a kóros vérlemezke funkció kialakulásában és a túlzott mértékű endothelsejt aktiváció modulálása szepszisben

Régóta ismert tény a szepszisben kialakuló fokozott vérlemezke reaktivitás és endothélium diszfunkció, jelentős mértékben hozzájárulva a betegség mortalitásához. Ugyanakkor a kóros thrombocyta és endothelsejt aktiváció háttérében álló finomszabályozó mechanizmusok még kevésbe voltak ismertek.

5.4.1 Különböző típusú LPS-ek direkt thrombocyta aktiváló hatásának vizsgálata in vitro, valamint szепtikus betegek vérlemezke miRNS profiljának és a miR-26b expressziójának további analízise a betegség lefolyásának függvényében

Elsőként értékeltük a különböző típusú LPS-ek thrombocyta funkcióra kifejtett biológiai aktivitását, de előtte teszteltük a prokoaguláns tulajdonságukat recalcifikált LPS-stimulált mononukleáris fehérvérsejt szuszpenzióban. Az Re-LPS és S-LPS (10 µg/mL) szignifikánsan ($P < 0,05$) csökkentette az alvadási időt (átlagosan 56,0 és 60,8 sec-ra) összehasonlítva a nem aktivált kontroll mintákhoz (111,7 sec) (**39/A. ábra**). Az LPS közvetlenül kötődött a normál vérlemezkekhez, amit FITC-cel jelölt Re-LPS kötődési vizsgálattal ellenőriztünk áramlási citometriával. Az interakció eredményeként jelentősen emelkedett FL-1 MFI értéket kaptunk a pozitív sejteknél (MFI: $49,7 \pm 8,3$; $P = 0,01$) szemben a nem-jelölt Re-LPS-sel kapott kontroll értékkel (MFI: $10,2 \pm 2,4$). Ez jelentősen tovább növelhető volt (MFI: $112,4 \pm 31$) TRAP (10 µM) aktiváció jelenlétében (**39/B. ábra**). A kapott eredmények valódiságát ellenőrizve a kötődést jelző MFI értéket minimalizálni tudtuk a kb. 20x-os többletben használt nem jelölt Re-LPS segítségével, illetve a TLR4 és P-selectin ellenes antitestekkel is jelentősen csökkentettük (nem ábrázolt adatok). Ezután megvizsgáltuk, hogy az Re-LPS és a S-LPS hogyan befolyásolta a vérlemezke aggregációt egészséges személyektől vett mintákon (**39/C-D. ábra**). Önmagában egyik LPS forma (0,1–10 µg/mL) sem tudott thrombocyta aggregációt kiváltani még 10-60 perces előkezelést követően sem, vagy akár közvetlenül az aggregációt megelőzően a PRP mintákhoz adva. Ezzel szemben, 1 µg/mL Re-LPS fokozta a szubmaximális koncentrációban használt TRAP (5 µM) indukálta vérlemezke aggregációt, míg az S-LPS nem befolyásolta. Párhuzamosan követtük a felszíni CD62P és CD40L pozitivitást egészen a 10 µg/mL koncentrációban használt Re-LPS és S-LPS mellett. Nem tapasztaltunk P-selectin expresszió emelkedést egyik LPS forma hatására sem összevetve a nem kezelt mintákkal ($9,0 \pm 4,0\%$, $9,5 \pm 5,0\%$ vs. $7,6 \pm 3,0\%$; nem ábrázolt adatok). Ugyanakkor szignifikánsan emelkedett CD40L

expresszót detektáltunk ($2,7 \pm 1,9\%$; $P < 0,05$) magas MFI értékek mellett ($172,5 \pm 80,0$; $P < 0,001$), de csak magas, $10 \mu\text{g/mL}$ Re-LPS hatására szemben a negatív kontroll mintákkal ($1,3 \pm 0,2\%$; MFI: $21,0 \pm 8,0$). Érdekes módon, az S-LPS nem fokozta a CD40L expressziót ($1,40 \pm 0,43\%$; MFI: $22,0 \pm 3,0$), míg a pozitív kontroll agonistaként használt TRAP stimulációjára szintén jelentősen nőtt a CD40L pozitivitás ($33,6 \pm 4,9\%$; MFI: $33,6 \pm 4,7$) (39/E. ábra).



39. ábra Két különböző típusú LPS vérlemezke aktivációt moduláló hatásának *in vitro* vizsgálata. Az Re-LPS és a S-LPS prokoaguláns hatásának (A), az Re-LPS thrombocytákhoz való kötődésének (B), a két LPS forma vérlemezke aggregációt befolyásoló hatásának (C és D), valamint az LPS-indukálta felszíni CD40L (CD154) expresszióinak (E) és a thrombocytá eredetű mikroparticulák mennyiségének (F) vizsgálata áramlási citometriával.

Végül meghatároztuk áramlási citométerrel a thrombocyta-eredetű mikropartikulák mennyiségét is, és jelentősen többet ($P < 0,05$) mértünk az Re-LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) hatására ($450 \pm 170/\mu\text{L}$ plazma), ugyanakkor az S-LPS a mikropartikula mennyiségét (273 ± 144 vs. $227 \pm 95/\mu\text{L}$ plazma) a kontrollhoz képest nem befolyásolta. Megjegyzendő, hogy ezek az abszolút értékek jóval alatta maradtak a TRAP-aktivált ($5 \mu\text{M}$) minták értékeinek ($970 \pm 145/\mu\text{L}$ plazma) (**39/F. ábra**). Arra is kíváncsiak voltunk, hogy az Re-LPS akár alacsony koncentrációban tudja-e fokozni a mikropartikula termelődést TRAP-pal ($5 \mu\text{M}$) való együttes aktiváció során. A mikropartikulák mennyisége jelentősen emelkedett már $1 \mu\text{g/mL}$ Re-LPS + TRAP jelenlétében ($1384 \pm 299/\mu\text{L}$ plazma; $P < 0,05$ szemben a csak TRAP-pal kezelt mintákkal). Továbbá az S-LPS-nek sem szinergista, sem gátló hatása nem volt a mikropartikula szintekre ($983 \pm 120/\mu\text{L}$ plazma). Végül az S-LPS még magas koncentrációban sem volt képes modulálni az Re-LPS hatását. Ezek alapján a két különböző típusú LPS eltérő módon kerül interakcióba a vérlemezkékkel.

Az Re-LPS kötődésének egyéb körülményeit külön is értékeltük: vajon ez az LPS forma képes-e interakcióba lépni a thrombocyta TLR4 receptorral CD14 nélkül. Ehhez plazma proteinektől mentesített gél-filtrált vérlemezke mintákat aktiváltunk Re-LPS-sel ($1 \mu\text{g/mL}$) és TRAP-pal ($5 \mu\text{M}$) visszaadott fibrinogén (2 g/L) mellett LPS-kötő fehérje (LBP) és szolubilis CD14 jelenlétében vagy hiányában. Azt tapasztaltuk, hogy az Re-LPS és TRAP stimulálta vérlemezke aggregáció nem fokozódott az LBP és szolubilis CD14 előkezelés után. Így az Re-LPS-nek nem szükséges CD14, hogy aktiválja a thrombocytákat.

A fentiekben ismertetett *in vitro* vérlemezke kísérleteinek mellett septicus betegek *ex vivo* mintáinak analízise révén tovább vizsgáltuk a szepszisben kialakuló kóros thrombocyta funkciót és annak miRNS-ek általi finomszabályozását. Ennek érdekében 21 septicus beteg és 21 életkorban és nemből illesztett kontroll személy mintáit gyűjtöttük össze. A szepszises mintákban a gyulladáshoz laboratóriumi paraméterek úgy, mint a fehérvérsejtszám, szérum CRP és PCT szintek szignifikánsan emelkedettek voltak a kontrollokhoz képest (**5. táblázat**).

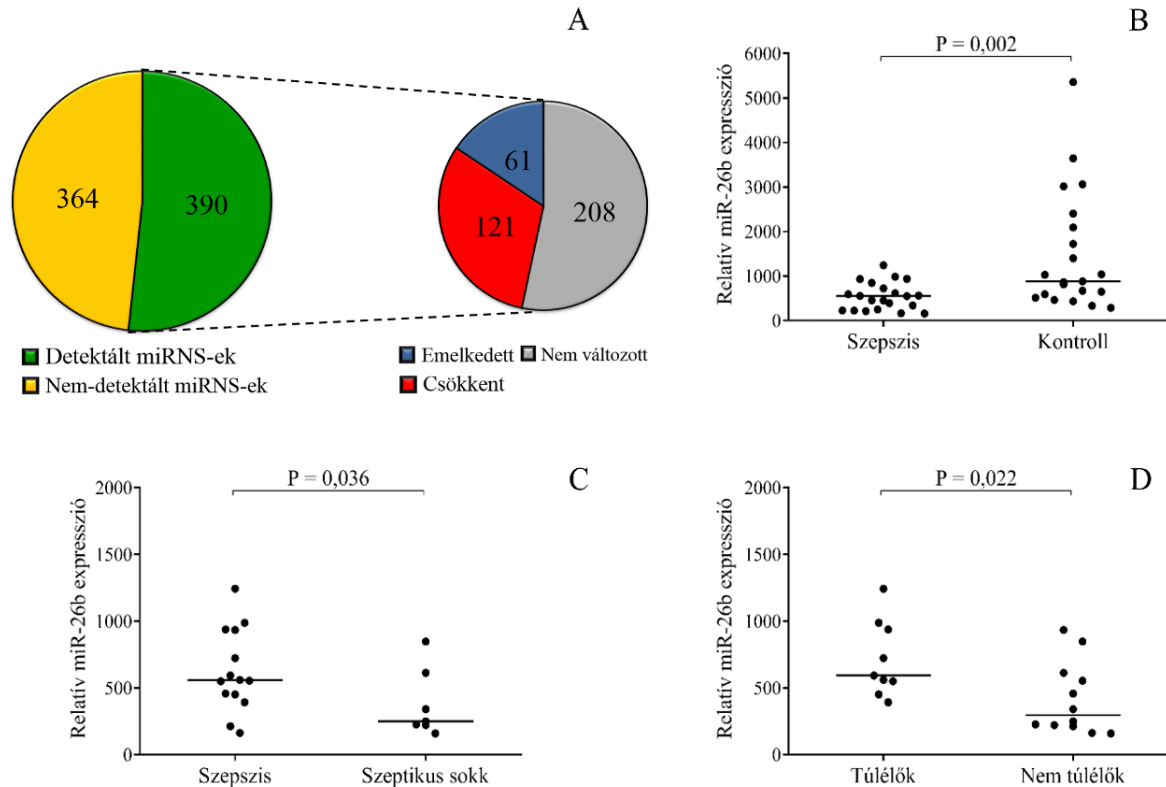
Paraméterek	Szeptikus betegek (n=21)	Kontrollok (n=21)	P-érték
Kor (év)	64 (51-70)	58 (42-65)	n.s.
Férfi/nő (n)	16/5	14/7	n.s.
Fehérvérsejtszám (G/L)	11,4 (8,3-16,2)	7,6 (6,2-8,9)	P<0,001
Thrombocytaszám (G/L)	218 (175-264)	332 (290-365)	P<0,01
Szérum CRP (mg/L)	210,5 ± 98,2	1,4 ± 1,0	P<0,001
Szérum PCT (µg/L)	27,4 ± 11,7	n/a	-
SOFA-score	12,1 ± 2,6	n/a	-
Szepszis/szeptikus sokk (n)	14/7	n/a	-
Intenzív osztályon töltött idő (nap)	25,1 ± 14,4	n/a	-
28 napos halálozás (n)	9	n/a	-
Infekció eredete – pneumónia (n)	18	n/a	-
Infekció eredete – urogenitális traktus (n)	3	n/a	-
Gram-pozitív baktérium fertőzés (n)	6	n/a	-
Gram-negatív baktérium fertőzés (n)	12	n/a	-
Azonosítatlan infekció (n)	3	n/a	-
Thrombocyta funkció gátló terápia (n)	16	12	n.s.

5. táblázat A szepszises betegek és a klinikai kontrollok legfontosabb demográfiai és klinikai jellemzői. A klinikai állapot súlyosságának jellemzésére SOFA-score került alkalmazásra. Az adatokat medián (IQR) formában vagy átlag ± SD értékkel fejeztük ki. Rövidítések: n.s.: nem szignifikáns; n/a.: nem elérhető adat.

A 21 beteg közül tizenhét szenvedett tüdőgyulladással járó szepszisben. A thrombocytaszám szignifikánsan alacsonyabb volt a szepszises csoportban (P<0,01). Kiemelendő, hogy a két csoport között nem volt különbség a vérlemezkefunkciót gátló gyógyszerek (pl. aspirin, clopidogrel stb.) használata tekintetében. A szeptikus betegcsoporton belül a 21-ből 7 esetben szeptikus sokk alakult ki. A kontroll személyekben a gyulladásozó folyamatok nem játszódtak le a mintavétel időpontjában, amit a laboratóriumi paraméterek alátámasztottak. Fokozott vérlemezke aktivációt észleltünk a szeptikus betegekben a magas felszíni P-selectin expresszió (7,12 ± 4,1 vs. 2,04 ± 1,07%, P<0,0001) és az emelkedett szolubilis P-selectin plazmakoncentrációk (27,4 ± 15,8 vs. 17,6 ± 2,9 ng/mL, P<0,0001) alapján szemben az egészséges kontrollokkal. Ezen kívül megnövekedett átlagos thrombocyta-térfogat (MPV) értékeket (11,4 ± 0,9 vs. 8,7 ± 1,8 fL, P<0,0001) is mértünk a szeptikus csoportban a

normál kontrollokhhoz képest, ami szintén a reaktív vérlemezke fenotípusra utal (nem ábrázolt eredmények).

A szeptikus betegek thrombocyta mintáinak további analíziséhez a vérlemezkek miRNS profilját tanulmányoztuk, hogy az aktiválódott thrombocytákban vajon melyek azok a miRNS-ek, amelyek a legnagyobb mértékű expresszió változást mutatják. A miRNS-ek átfogó elemzését TaqMan OpenArray segítségével végeztük. Random módon kiválasztottunk 3-3 RNS mintát mindkét vizsgálati csoportból annak érdekében, hogy értékeljük, mely vérlemezke miRNS-ek expressziója változott meg szignifikánsan szepszisben a kontroll egyénekhez képest. Azt tekintettük jelentős eltérésnek, ha legalább 1,5-szeres változást tapasztaltunk. Az array használatával a 754 detektálható miRNS-ből 390 miRNS-t tudtunk kimutatni ezekben a mintákban. Ezek közül 121 miRNS szintje jelentősen csökkent, míg 61 expressziója szignifikánsan emelkedett (**40/A. ábra**). Jelentősen csökkent az expressziója többek között a miR-221-nek, a miR-223-nak, a miR-30b-nek, és a miR-26b-nek is, amit később tovább vizsgáltunk a betegség súlyossága és kimenetele szempontjából. Ugyanakkor emelkedett szintet mutatott többek között a miR-155, a miR-133a, és a miR-96. Mint ahogyan az előző vizsgálatunkban is tapasztaltuk, mivel a miR-26b egyik cél génje a *SELP*, és diabeteses környezetben a miR-26b befolyásolta a *SELP* mRNS szintjét és ezen keresztül a P-selectin fehérje expresszióját (**28. és 30. ábra**). A vérlemezke miR-26b szintjét szepszisben korábban mások még nem vizsgálták, ezért minden beválogatott szeptikus beteg és kontroll LDP mintájában külön kvantáltuk. A betegkohorszban szignifikánsan csökkent expressziót ($P=0,002$) tapasztaltunk a kontrollokhhoz hasonlítva megerősítve a TaqMan OpenArray mérések eredményét (**40/B. ábra**).

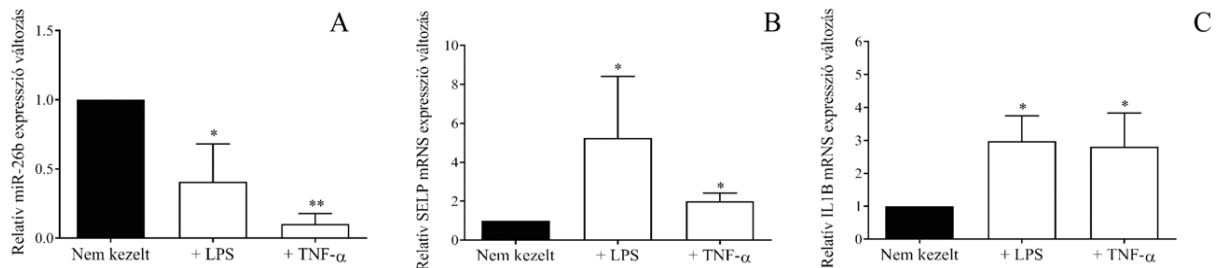


40. ábra A sepszis által indukált vérlemezkek miRNS profil változás analízise. A vérlemezkek miRNS profilját TaqMan OpenArray módszerrel három septicus és három kontroll LDP mintában (A) vizsgáltuk. Validálás céljából a miR-26b expresszióját (B) mindkét vizsgálati csoportban meghatároztuk (n=21/csoport). A miRNS expressziójának változását a sepszises csoportban tovább korreláltattuk a betegség súlyosságával (C), és a sepszis miatt bekövetkező halálózással (D). Az ábrán a medián értékeket (vízszintes vonal) tüntettük fel.

Ezt követően elemeztük, hogy a csökkent thrombocyta miR-26b szint összefügghet-e a sepszis súlyosságával és a betegség kimenetelével a magas P-selectin expresszió jelenlétében. Szignifikánsan még alacsonyabb miR-26b expressziókat mértünk azoknál a betegeknél, akiknél septicus sokk alakult ki szemben a sepszises betegekkal (P=0,036) (40/C. ábra). Amikor a teljes betegkohorszt túlélőkre (n=9) és elhunytakra (n=12) osztottuk a 28 napos mortalitási adatok alapján, szintén alacsonyabb thrombocyta miR-26b expressziókat (P=0,022) mértünk azoknál a betegeknél, akik belehaltak a betegségbe szemben a túlélőkkel (40/D. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a súlyosabb stádiumú és kimenetelű sepszisben a vérlemezke jelentős fenotípusváltozása következik be, ami kifejezett miRNS expresszió átrendeződéssel jár együtt, így a miR-26b expresszió jelentős csökkenésével is.

A septicus állapot által indukált megváltozott vérlemezke miR-26b expresszió további igazolására egészséges személyek tisztított vérlemezke mintáit LPS-sel *in vitro* aktiváltuk LBP és szolubilis CD14 jelenlétében vagy PBS-sel a negatív kontroll mintában 37 °C-on 4 órán keresztül. Pozitív kontrollként TNF- α -t alkalmaztunk a vérlemezkek aktivációjához. A miR-

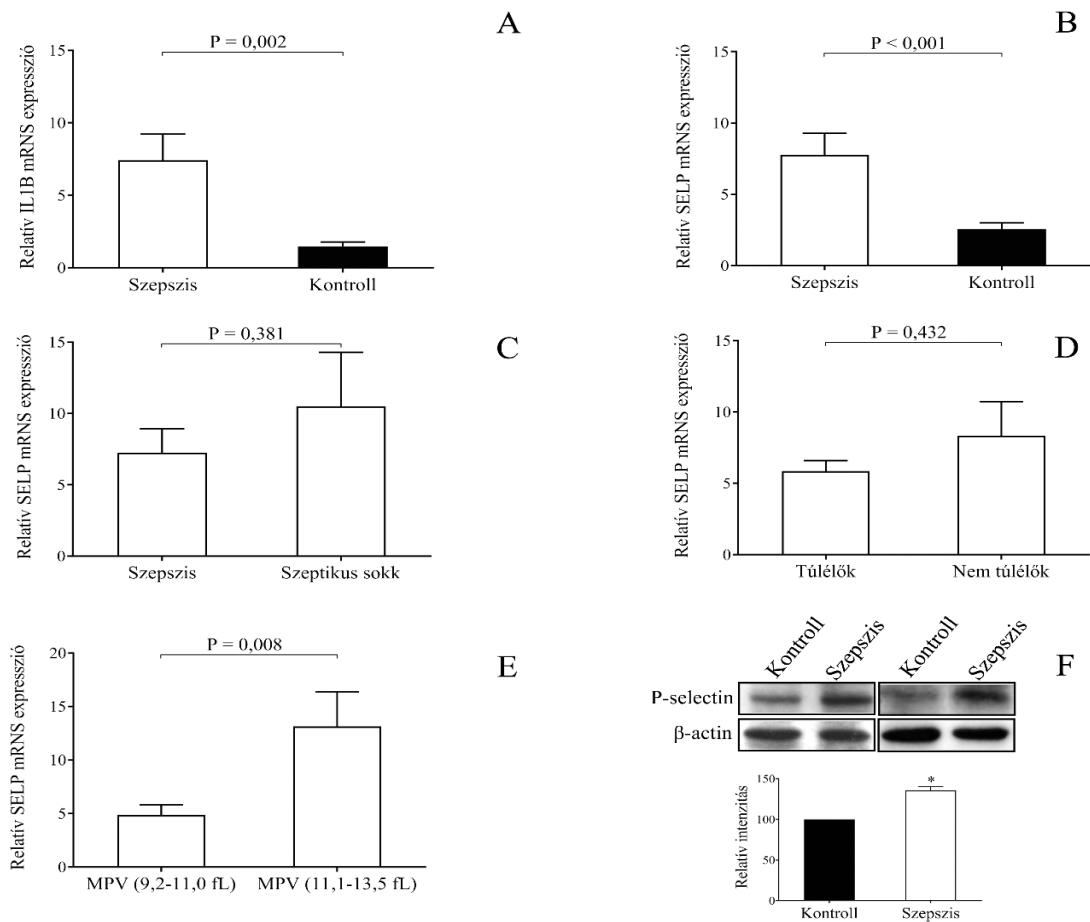
26b expressziója a vérlemezkékben jelentősen csökkent mindkét agonista hatására (**41/A. ábra**). Ezek az eredmények összhangban vannak az előbbi *ex vivo* miRNS eredményekkel, amiből arra következtetünk, hogy az LPS képes modulálni az aktiválódott vérlemezke RNS-ek expresszióját.



41. ábra LPS-sel és TNF-α-val *in vitro* aktivált thrombocyták RNS expressziójának vizsgálata. A miR-26b (A), a SELP mRNA (B) és az IL1B mRNA (C) expresszió analízise LPS, illetve TNF-α kezelés után normál vérlemezke mintákban (n=4–6 minta/körülmény). Átlag ± SEM-et ábrázoltunk, *P<0,05, **P<0,01 vs. nem kezelt kontroll minták.

Ezt követően vizsgáltuk azt is, hogy a miR-26b cél mRNA expressziójának változása is bekövetkezik-e ezekben az *in vitro* indukált „szepszises” thrombocytákban, így a SELP mRNA expresszióját RT-qPCR módszerrel kvantáltuk. A miR-26b által szabályozott SELP mRNA expresszió - a csökkent miR-26b jelenlétében - szignifikánsan emelkedett mind az LPS, mind a TNF-α által (P<0,05) (**41/B. ábra**). Párhuzamosan vizsgáltuk az IL1B mRNA expresszióját mint inflammatorikus kontroll gént, amely jelentős emelkedést mutatott (P<0,05) a gyulladásos stimulus hatására (**41/C. ábra**). Ezek az eredmények is arra utalnak, hogy szepszises körülmények között a vérlemezkék olyan fenotípus változáson esnek át, ami jelentős RNS szint átrendeződésével is együtt jár.

Az *in vitro* aktivált thrombocyta minták után megvizsgáltuk a SELP és IL1B mRNA expressziót az *ex vivo* szepszises mintákban is, és mindkét mRNA szint jelentősen emelkedettebb volt szepszisen, mint a kontrollokból származó thrombocytákban (P<0,002; P<0,001) (**42/A-B. ábra**). Ugyanakkor nem szignifikáns mértékben, de magasabb volt a SELP mRNA expresszió azoknál a betegeknél, akiknél szepszises sokk alakult ki (**42/C. ábra**), vagy akik behaltak a betegségbe (**42/D. ábra**). Tovább elemezve a SELP expressziókat a vérlemezkék MPV értékei alapján, szignifikánsan magasabb SELP mRNA szintet (P=0,008) találtunk azoknál a betegeknél, akiknél nagyobb volt az MPV-érték (≥11,1 fL), vagyis reaktívabb thrombocytái lehettek (**42/E. ábra**).

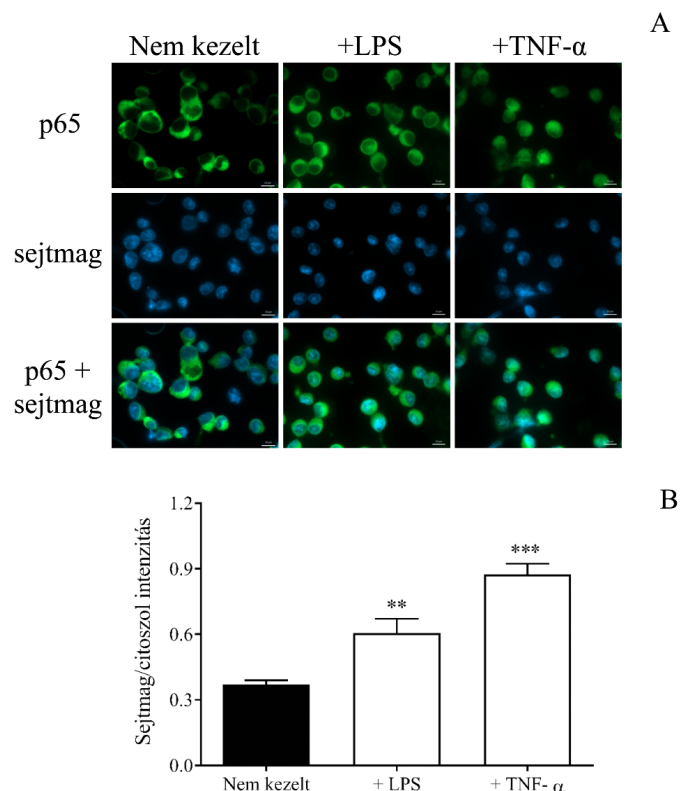


42. ábra Fokozott SELP mRNS szint és P-selectin fehérje expresszió az *ex vivo* szeptikus vérlemezkékben. A szeptikus betegek thrombocytá mintáiban az IL1B (A) és a SELP mRNS (B) expresszióját vizsgáltuk a kontroll vérlemezkékhez képest. A vérlemezke SELP mRNS expressziója szeptikus sokkban (C), illetve elhalálozás esetén (D). A SELP mRNS szintet az MPV értékek alapján (E). Szepszises thrombocytá lizátumból Western blot technikával detektált P-selectin fehérje mennyiségi összehasonlítása a normál mintákhoz képest (n=5) (F). Átlag ± SEM-et ábrázoltunk, *P<0,05 vs. kontroll minták.

A szepszises betegek vérlemezkéiben kimutatott megemelkedett SELP mRNS expresszió miatt arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon fehérje szintjén is nagyobb mennyiségben van jelen a P-selectin receptor, amit Western blot technikával vizsgáltunk. Azt tapasztaltuk, hogy a szepszises betegektől nyert thrombocytá lizátumok szignifikánsan nagyobb mennyiségű P-selectin fehérjét tartalmaztak (P<0,05) a kontroll mintákhoz képest, ami szepszisben a vérlemezkéknek egy előaktivált, prokoaguláns állapotot biztosít (42/F. ábra).

5.4.2 Génexpressziós vizsgálatok LPS-stimulált megakaryocita sejtenyészetekben, valamint a *Dicer1* enzim fehérjeszintjének detektálása vérlemezkékben és megakaryocytákban szeptikus *in vitro* körülmények között

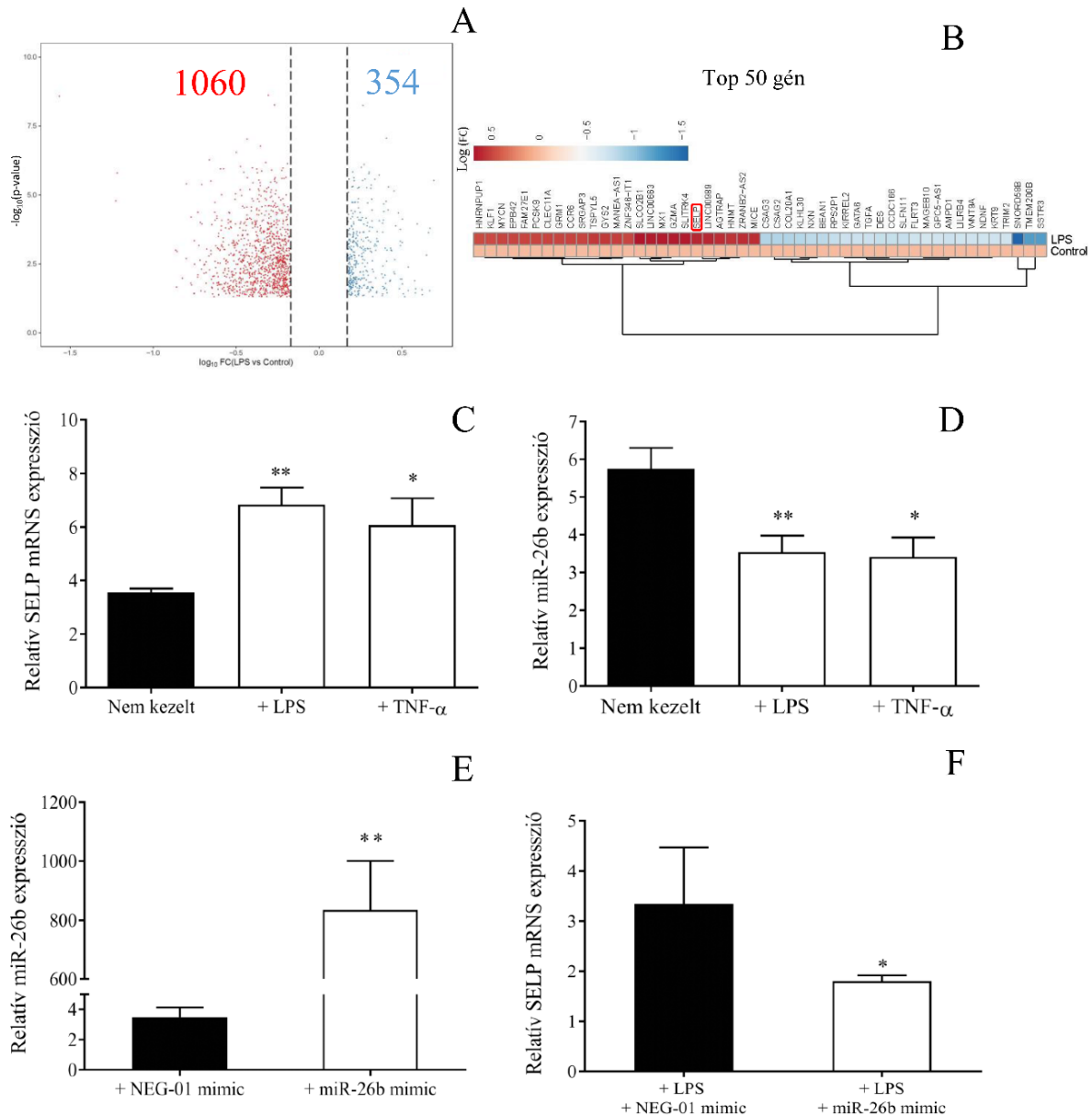
A megakaryocita sejteket nagy koncentrációjú LPS-sel kezeltük *in vitro*, hogy modellezzük a szeptikus csontvelői körülményeket. Tekintettel arra, hogy a LPS a TLR4-receptoron keresztül fejt ki hatását, ezért először megvizsgáltuk a TLR4 mediált szignalizációt, amely megakaryocytákban is aktív. Ehhez MEG-01 sejteket vizsgáltuk, hogy LPS aktiváció hatására a p65 transzkripciós faktor bejut-e a sejtmagba fokozva ezzel a gyulladáshoz vezető gének transzkripcióját. Fluoreszcens mikroszkóppal vizualizáltuk a p65 pozitivitást és a festődés intenzitásának arányát a sejtmag és a citoplazma között. Pozitív kontrollként TNF- α kezelést végeztünk a sejt kultúrában ugyanolyan kísérleti körülmények között. Azt tapasztaltuk, hogy mind az LPS (P<0,01), mind a TNF- α kezelés (P<0,001) hatására jelentősen nőtt a p65 pozitivitás és ezáltal a sejtmag/citoplazma fluoreszcencia intenzitásának aránya a nem kezelt sejtekhez képest, mely a p65 nukleáris internalizációjára utalt mindkét agonista hatására (43/A-B. ábra).



43. ábra Az NF- κ B-út vonal aktivációjának vizsgálata LPS-sel és TNF- α -val kezelt MEG-01 sejtekben. A sejteket PBS-sel (negatív kontroll), LPS-sel vagy TNF- α -val stimuláltuk 4 órán át. Az NF- κ B p65 alegység magtranszlokációját immunhisztokémiai festéssel figyeltük meg. Zöld: p65 festés; kék: sejtmag. Skála mérete: 20 μ m (A). Elemeztük a sejtmagokban és a citoplazmában a p65 fluoreszcencia intenzitásának arányát (B). Átlag \pm SEM-et ábrázoltuk, n=6–10/mintatípus. **P<0,01 és ***P<0,001 vs. nem kezelt kontroll sejtek.

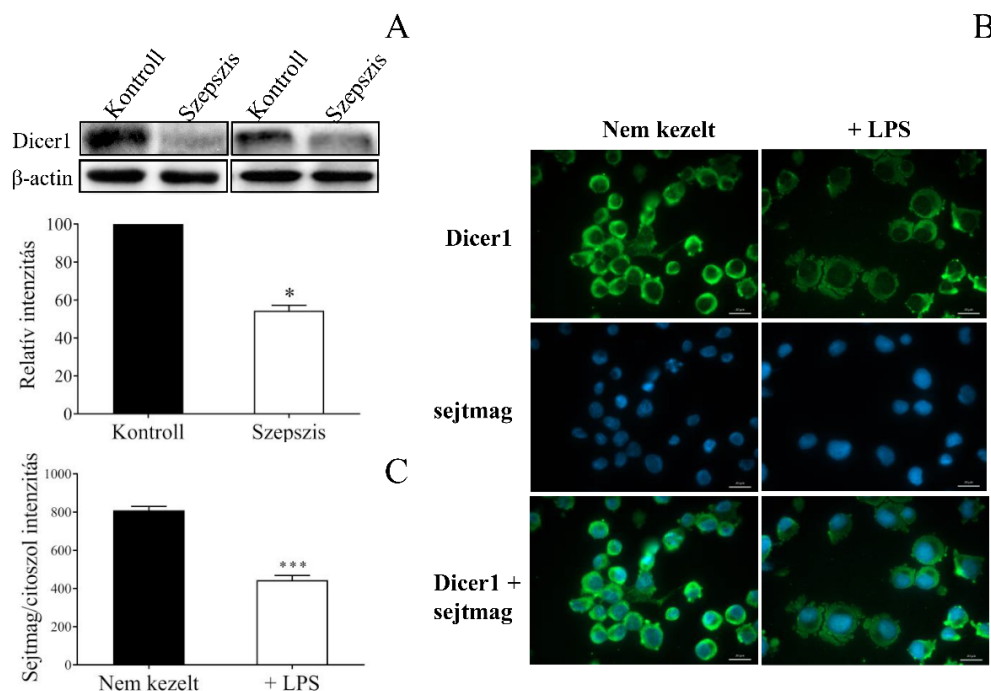
Szepszisben a megakaryocyták is ki vannak téve a gyulladásos mediátorok közvetlen hatásának, ami a megakaryocyták abberáns működéséhez és kóros vérlemezke termelődéséhez vezethet. Ennek a folyamatnak a modellezéséhez a MEG-01 sejteket LPS-sel stimuláltuk *in vitro*, és analizáltuk a génexpresszió változásokat RNS szekvenálással. Az RNS szekvenálás eredményének elemzésekor 1414 gén jelentősen eltérő expressziót mutatott (**44/A. ábra**). Ezek közül 354 gén szignifikánsan emelkedett és 1060 gén szignifikánsan csökkent az LPS-aktivált MEG-01 sejtekben a kezeletlen sejtekhez képest. Külön elemeztük az 50 legnagyobb mértékben expresszált gént, amelyek közé tartozott az expressziójában emelkedést mutató *SELP* gén is (**44/B. ábra**). Ezek az *in vitro* eredmények összhangban állnak az *ex vivo* szeptikus vérlemezkékben tapasztaltakkal és azt mutatják, hogy szeptikus csontvelői környezetben a megakaryocyták érintettsége révén jelentős RNS expresszió változások játszódnak le.

Az *ex vivo* szepszises vérlemezkékben tapasztaltakhoz hasonlóan a MEG-01 sejtekben az LPS, valamint a TNF- α hatására a *SELP* mRNS szint jelentősen magasabb volt, míg a miR-26b expresszió jelentősen csökkent (**44/C-D. ábra**). Ezután célunk volt megerősíteni a miR-26b és a *SELP* mRNS közötti funkcionális kapcsolatot szeptikus körülmények között is. Mivel az LPS alacsonyabb miR-26b szintet eredményezett a MEG-01 sejtekben, a fentiek igazolására specifikus miRNS mimic-et alkalmaztunk a miRNS „túlzott mértékű expresszáltatására” a *SELP* expresszió változásának vizsgálata érdekében (**44/E. ábra**). Azt tapasztaltuk, hogy a jelentős mértékben megemelt miR-26b expresszió ($P < 0,01$) jelenlétében szignifikánsan csökkent a *SELP* mRNS szintje ($P < 0,05$) a MEG-01 sejtekben összehasonlítva a NEG-01 mimic-vel kezelt kontroll mintákkal (**44/F. ábra**). Ezek az eredmények alátámasztják azt a tényt, hogy a miR-26b szint szorosan összefügg a *SELP* gén expresszióval, és a csökkent miR-26b hozzájárul a megakaryocyták és a vérlemezkék *SELP* mRNS expressziójának emelkedéséhez szepszisben.



44. ábra A TLR4 útvonalon keresztül bekövetkező mRNA és miRNA expresszió változások a MEG-01 sejtekben. Az LPS-sel kezelt MEG-01 sejtek RNS szekvenálási eredményét a DESeq analízis alapján készített Volcano plot mutatja be. Az x tengely a fold change értéket, az y tengely pedig a statisztikai szignifikanciát (P érték) mutatja 10-es alapú logaritmikus skálán. Az ábra a jelentősen megváltozott expressziót mutató géneket ábrázolja a kezeletlen és az LPS-sel kezelt MEG-01 sejtekben (n=3 minta/kezelés). 354 (kékkel jelölve) szignifikánsan emelkedett, míg 1060 (pirossal jelölve) csökkent transzkriptumot detektáltunk az LPS-aktivált MEG-01 sejtekben a kontroll sejtekhez képest. A szaggatott vonalak jelzik a „fold change” (FC) határértéket (A). Az 50 legnagyobb változást mutató gén hőterképe, közöttük a *SELP* génnel (piros négyzetben) (B). A MEG-01 sejtekben kvantáltuk a *SELP* mRNA szintet LPS kezelés után (n=6-8/kezelés). Pozitív kontrollként TNF- α kezelést használtunk (C). Megmértük a miR-26b szintet az LPS, illetve a TNF- α kezelés hatására a kezeletlen sejtekkel szemben (D). A miR-26b és a *SELP* mRNA közötti funkcionális kapcsolat megerősítésére specifikus miRNA mimic-vel transzfekciót végeztünk az LPS-sel kezelt MEG-01 sejtekben (E) és közben a *SELP* mRNA expressziót analizáltunk a kontroll NEG-01 mimic-el kezelt mintákhoz képest (F). Átlag \pm SEM. *P<0,05, **P<0,01 vs. nem kezelt (vagy NEG-01 kontroll mimic-vel kezelt) kontroll minták.

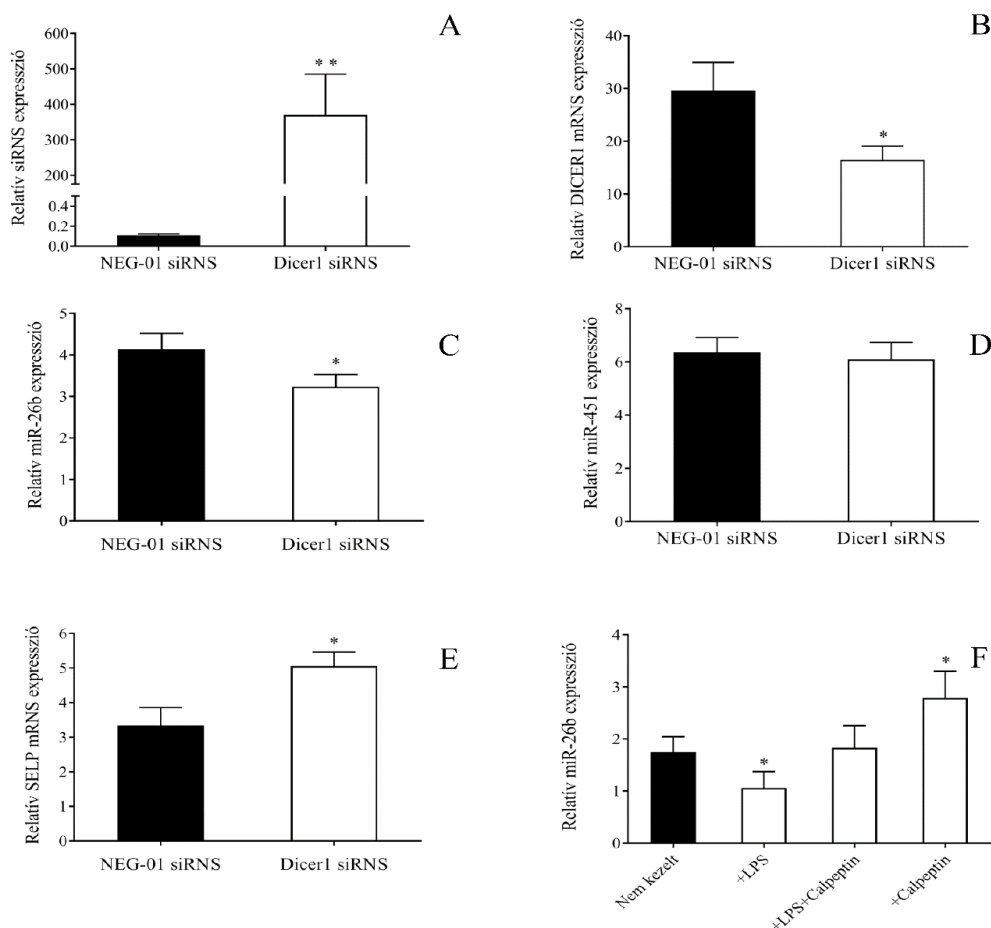
A citoplazmában működő Dicer1 enzim regulálja a miRNS érési folyamatának utolsó lépését, ezért csökkent szintje/aktivitása jelentősen befolyásolhatja az érett miRNS-ek expresszióját. Jelen kísérleteinkben a Dicer1 enzim fehérjeszintjét először szeptikus betegekből és egészséges kontrollokból izolált vérlemezke mintákban analizáltuk Western-blot technikával. A szeptikus betegek thrombocyta mintáiban jelentősen alacsonyabb Dicer1 fehérje szintet ($P<0,05$) detektáltunk a kontrollokhoz képest. (45/A. ábra). Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálattal hasonló eredményt figyeltünk meg a MEG-01 sejtekben, miszerint az LPS-sel kezelt sejtek jelentősen kisebb Dicer1 pozitivitást ($P<0,001$) mutattak a nem kezelt mintákhoz képest (45/B-C. ábra).



45. ábra A Dicer1 enzim fehérjeszintjének vizsgálata szeptikus vérlemezke lizátumokban és LPS-sel kezelt MEG-01 sejtek mintáiban. Először szeptikus vérlemezkeké (n=5) Dicer1 fehérje szintjét vizsgáltuk Western-blot technikával (A). A MEG-01 sejtekben a Dicer1 pozitivitást intracellulárisan vizsgáltuk fluoreszcens mikroszkóppal az LPS kezelés után (B). A sejtmag/citoszol Dicer1 fluoreszcencia intenzitásának arányát elemeztük (n=15 sejt/kísérlet) (C). Zöld: Dicer1 festés; kék: sejtmagok. Skála mérete: 20 μ m. Átlag \pm SEM-et ábrázoltunk. * $P<0,05$; *** $P<0,001$ vs. nem kezelt kontroll minták.

Ezt követően tovább vizsgáltuk a kóros Dicer1 fehérjeszintnek az érett miR-26b-re gyakorolt hatását szepszisben. Ahhoz, hogy modellezzük a szepszisben megváltozó Dicer1 szintet, siRNS segítségével csendesítettük a Dicer1 expresszióját MEG-01 sejtekben és a calpain specifikus gátlásával, calpeptinnel gátoltuk a Dicer hasítását. A csendesítés érdekében a MEG-01 sejtekbe 24 órán keresztül Dicer1 specifikus siRNS-t transzfektáltunk. A transzfekció hatékonyságát RT-qPCR módszerrel ellenőriztük. A kezelés eredményeként a Dicer siRNS expressziója jelentősen megemelkedett, ami azt jelenti, hogy az siRNS sikeresen

bejutott a sejtekbe (46/A. ábra). Az siRNS transzfekció alacsonyabb DICER1 mRNA expressziót eredményezett a kontroll mintákhoz képest (46/B. ábra). Ennek következtében a miR-26b szignifikánsan csökkent ($P < 0,05$) (46/C. ábra), míg a SELP mRNA expressziója emelkedést mutatott ($P < 0,05$) (46/E. ábra).



46. ábra A Dicer1 enzim funkcionális szerepének vizsgálata a miR-26b expresszió modulálásában szeptikus körülmények között. A *DICER1* génexpressziót siRNS transzfekcióval csökkentettük MEG-01 sejtekben (A), ami valóban csökkent DICER1 mRNA expressziót eredményezett a NEG-01 siRNS-sel transzfektált kontroll sejtekhez képest (B). Vizsgáltuk a miR-26b (C) és a SELP mRNA expresszióját (E). A Dicer1-független miR-451 expresszióját is ellenőriztük (D). Ezután a calpaint gátoltuk calpeptinnel a MEG-01 sejtekben. A calpeptin hatása a miR-26b (F) szintre, amikor LPS kezelést alkalmaztunk. Átlag \pm SEM. ($n=4-6$ minta/kísérlet). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs. NEG-01 siRNS-sel kezelt minták.

Ezzel párhuzamosan mértük a Dicer1 független miR-451 expresszióját is és ennek a szintje nem változott a kontroll mintákhoz képest (46/D. ábra). Annak érdekében, hogy tovább vizsgáljuk, hogy az alacsonyabb Dicer1 szint csökkent thrombocyta miRNA expressziót okoz szeptikus környezetben, a MEG-01 sejtekhez calpeptint adtunk. Amikor a calpain működését gátoltuk és a Dicer1 enzim hasítását a calpeptin megakadályozta LPS jelenlétében (46/F. ábra), az érett miR-26b szint rendeződött a MEG-01 sejtekben. Ezek az adatok alátámasztották azon

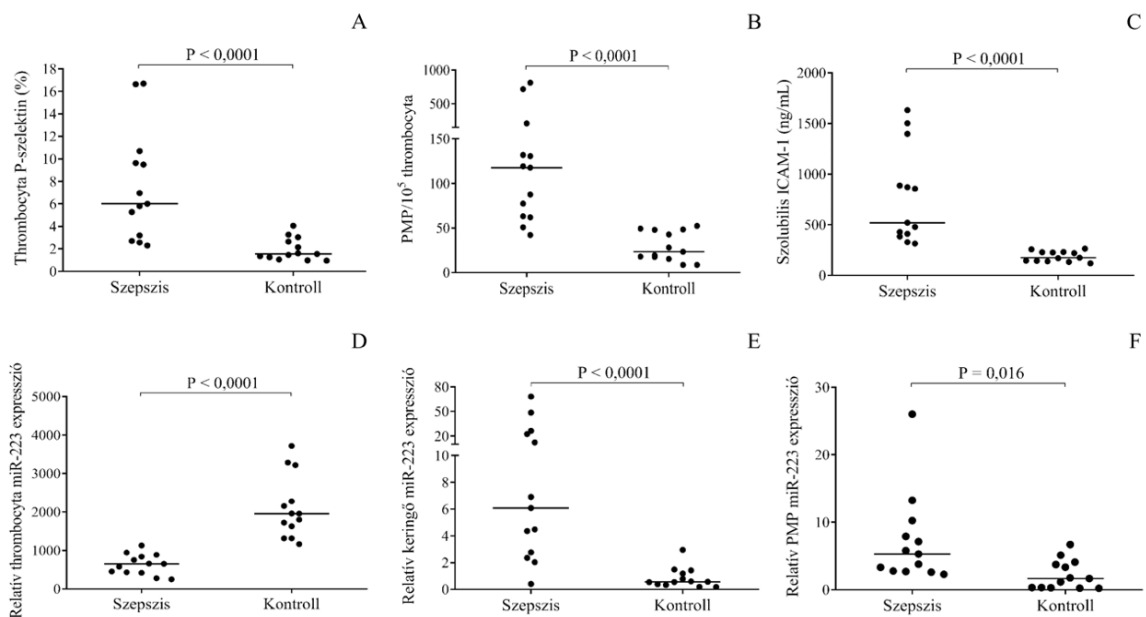
hipotézisünket, hogy a kóros Dicer1 enzim működése szepsziszben jelentősen csökkenti a miRNS-ek, így pl. a miR-26b expressziót mind a vérlemezkékben, mind a megakaryocytákban.

A MEG-01 sejtekben a szeptikus körülmények között bekövetkezett génexpresszió változások hatását tovább vizsgáltuk, hogy jobban megértsük milyen útvonalak aktiválódnak és milyen intracelluláris folyamatok játszódnak le szepszisz során. Ennek érdekében a megváltozott expressziójú gének útvonalának elemzésével, gén ontológiai analízist végeztünk. Azt tapasztaltuk, hogy az LPS kezelés szignifikánsan befolyásolta azokat a géneket, amelyek számos gyulladási útvonal aktiválásával jártak együtt, ideértve a TNF- α -ra, az IL-1 β -ra és az LPS-re adott sejtválaszokat, valamint a fehérvérsejt migrációval és kemotaxisal járó génváltozásokat. A megakaryocytákban a TLR4 agonistára adott fontos válaszreakciók közé tartoztak többek között a lipidek homeosztázisához, az angiogenezishez, a MAPK, ERK1 és ERK2, valamint a JNK mediált jelátviteli útvonalakhoz köthető génváltozások (nem ábrázolt adatok). Fontos, hogy a SELP mRNS, amelynek expressziója a MEG-01-ben jelentős emelkedést mutatott az LPS kezelés hatására, több különböző útvonalban is szerepet játszhat. Ide tartoznak az LPS-re és a gyulladási triggerekre, a fehérvérsejt-adhézióra és a migrációra adott válaszok is. Összeségében a TLR4-függő szignálútval lényegesen módosíthatja a gének expresszióját a megakaryocytákban szepsziszben is, és a P-selectin receptort kódoló *SELP* génnek központi szerepe lehet a megakaryocyták gyulladási szignalizációjának szabályozásában.

5.4.3 Szepszises plazmamintákból izolált vérlemezke-eredetű mikropartikulák internalizációja endothelsejt kultúrákba és az így bejutott thrombocyta miR-223 hatása az endothelsejt ICAM-1 expresszióra és a leukocyta adhézióra in vitro

Ehhez az *in vitro* vizsgálatunkhoz összesen 13 szeptikus beteg és 13 korban és nemben illesztett egészséges kontroll személy mintáját használtuk fel, amikben a rutin paraméterek alapján nagyon hasonló különbséget találtunk a gyulladási folyamatok tekintetében, mint az előző *ex vivo* tanulmányunkban (lásd **5. táblázat**). Itt is ellenőriztük a vérlemezkék fokozott aktivációs állapotát felszíni P-selectin expresszió mérésével áramlási citometriával, amelynek során a thrombocyta CD62 pozitívitas jelentősen magasabb volt a szeptikus thrombocyták felszínén a kontrollokhoz képest ($P < 0,0001$) (**47/A. ábra**). Ezt követően kiértékeljük a thrombocyta mikropartikulák mennyiségét a szepszises és a kontroll plazma mintákban és szepsziszben a mikropartikulák száma szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll mintákban ($P < 0,0001$) (**47/B. ábra**), amely szintén a vérlemezkék fokozott aktiváltsági állapotát jelezte.

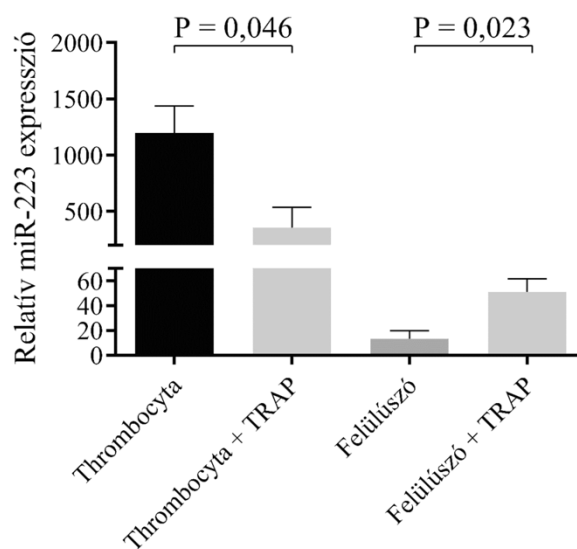
Ezzel párhuzamosan meghatároztuk a szolubilis ICAM-1 szintet a szeptikus és kontroll szérumban, hogy megvizsgáljuk az endothelsejtek aktivációjának mértékét. Szepszisben az ICAM-1 fehérje koncentrációja jelentősen emelkedett volt ($P < 0,0001$) (47/C. ábra). Ezen eredmények alapján a vizsgált szeptikus betegekben nemcsak thrombocytát, hanem káros endothelsejt aktivációt is kimutattunk.



47. ábra Vérlemezke és endothelsejt aktiváció vizsgálata szeptikus betegek és kontroll személyek mintáiban. A felszíni P-selectin pozitivitás (A), a thrombocytá-eredetű mikropartikulák (PMP) (B) és a szolubilis ICAM-1 szérumban koncentráció (C) mérése a szeptikus betegek és a kontroll mintáiban (n=13/csoport). Ezzel párhuzamosan kvantáltuk a miR-223 expressziót a vérlemezkékben (D), keringő formáját a plazmában (E) és az izolált mikropartikulákban is (F). A vízszintes vonalak a medián értéket jelölik.

A miR-223 expresszióját RT-qPCR módszerrel vizsgáltuk a vérlemezkékben, a plazmamintában és az izolált mikropartikulák mintájában. Megállapítottuk, hogy a miR-223 expresszió a szeptikus vérlemezkékben a kontrollokhoz képest alacsonyabb volt ($P < 0,0001$) (47/D. ábra), míg a keringő miR-223 expressziója szignifikánsan magasabb volt a plazma mintákban ($P < 0,0001$) (47/E. ábra) és a mikropartikulákban ($P < 0,016$) (47/F. ábra). Ezek az előzetes eredmények felvetették, hogy az alacsony vérlemezke miR-223 szint kialakulásának hátterében nemcsak a fentiekben bemutatott csökkent megakaryocytá-eredetű miRNS expresszió áll, hanem súlyos gyulladásos körülmények között a fokozott mikropartikula képződés révén az adott miRNS nagyobb mennyiségben kijut a környezetbe, illetve a keringésbe.

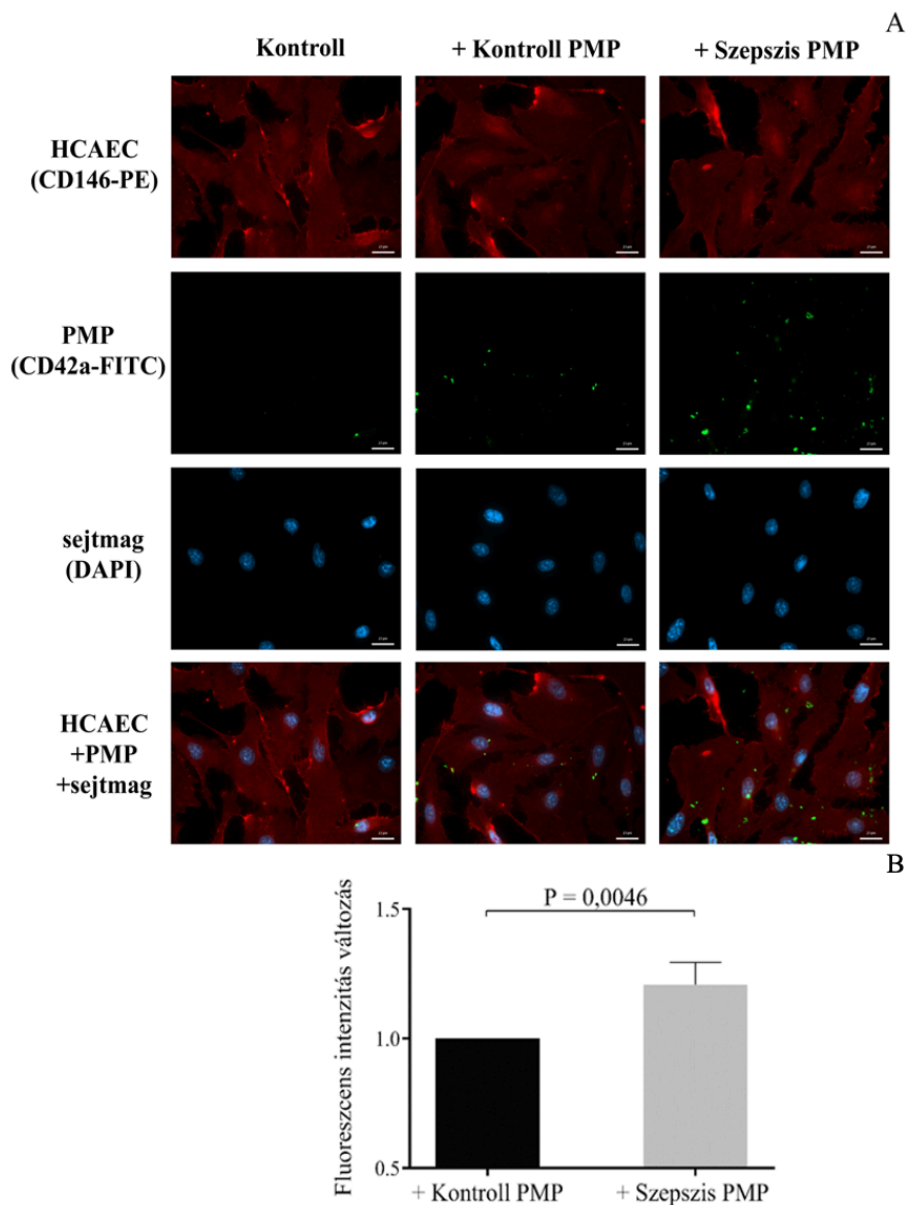
Annak érdekében, hogy bizonyítsuk a miR-223-nak a szeptikus vérlemezkékből való fokozott kijutását, *in vitro* kísérletet is végeztünk. A kontroll LDP mintákat TRAP-al aktiváltuk 2 órán keresztül, majd a thrombocytá felülúszóból és a pellet-ből mértük le a miR-223 expressziót. A TRAP-aktivált vérlemezkékben a miR-223 expresszió szintje szignifikánsan csökkent a nem kezelt mintával szemben ($P=0,046$), míg a felülúszóban magasabb miR-223 szintet figyeltünk meg ($P=0,023$) a kezelés után (**48. ábra**). Ezen eredmények alapján azt gondoljuk, hogy a vérlemezke aktiváció valósan a thrombocytá miRNS externalizációját és ezáltal jelentős intracelluláris expresszió változását eredményezi. A kiszabadult miRNS-ek - mint vektorok - pedig különböző információkat közvetíthetnek a környezetükbe.



48. ábra A miR-223 expresszió kvantálása a vérlemezkékben és felülúszó mintákban TRAP-pal történt *in vitro* thrombocytá aktiváció előtt és után. Az izolált vérlemezkéket TRAP-pal stimuláltuk 2 órán keresztül. A vérlemezkéket ezután centrifugáltuk és a vérlemezke pellet-ből és a felülúszóból miR-223 expressziót mértünk ($n=7-8$ minta/kísérlet). Átlag \pm SEM értéket ábrázoltunk.

A vaszkuláris endothélium a véráram útján keringő mikrovezikulák egyik legfontosabb célpontja a szív- és érrendszeri, valamint a gyulladásos megbetegedésekben, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy szepszisben a miRNS transzfer a vérlemezkékből a mikropartikulákon keresztül az endothelsejtekbe vajon miként valósul meg. Erre a célra humán koronária artériás endothelsejtek (HCAEC) 24 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk szeptikus betegekből, illetve kontroll egyénekből izolált thrombocytá mikropartikulákkal. Azt tapasztaltuk, hogy a szepszises mikropartikulákkal „kezelt” endothelsejtekben magasabb volt a zöld fluoreszcencia intenzitás mértéke a normál mikropartikulákkal inkubált endothelsejtekhez képest (**49/A. ábra**). A negatív kontroll minták esetén a HCAEC sejtekhez nem adtunk mikropartikulákat,

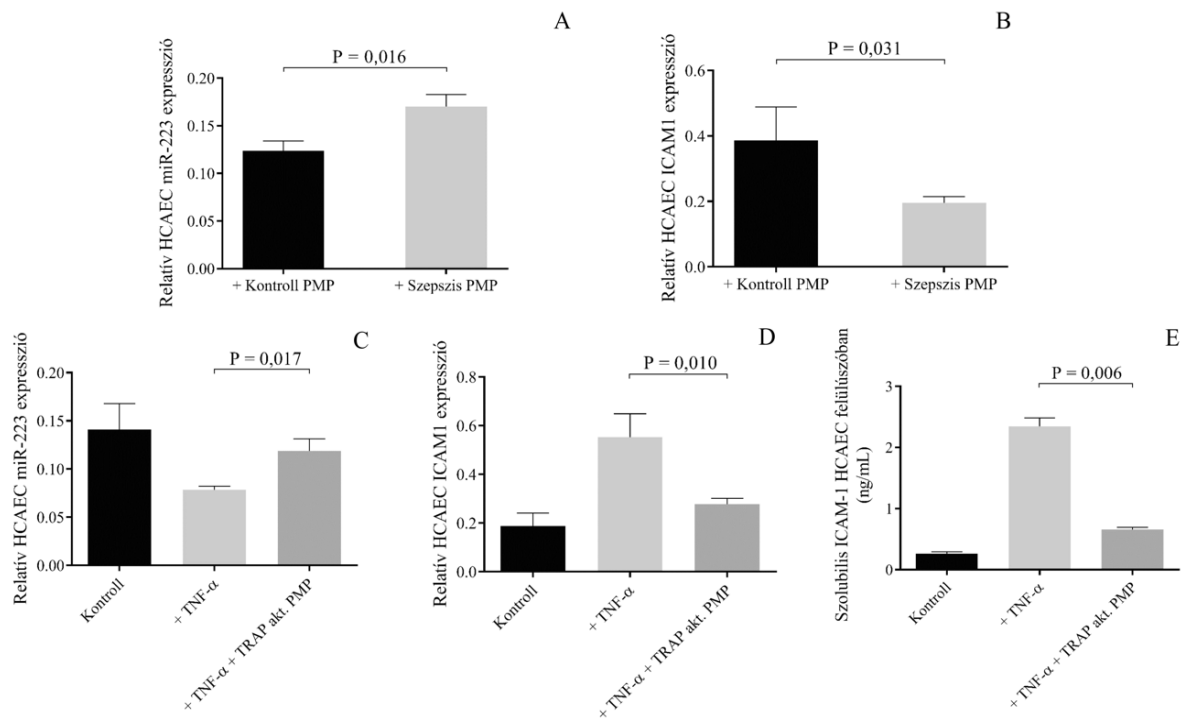
így ott anti-CD42a-FITC pozitívitas nem volt megfigyelhető. Ezen kívül statisztikailag elemeztük az összes analizált mintában a fluoreszcencia intenzitás különbségét a szepszises és a kontroll mikropartikulákkal kezelt sejtekben, és szignifikáns különbséget ($P=0,0046$) találtunk a két csoport között (**49/B. ábra**). Ezen eredményeink azt mutatják, hogy a szepszisen termelődő vérelezke mikropartikulák fokozottabban jutnak be az endothelsejtekbe, mint az egészséges mintákból származók.



49. ábra Vérelezke-eredetű mikropartikulák (PMP) endothelsejtekbe történő internalizációjának vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal. Az endothelsejteket (HCAEC) szepszises és kontroll vérelezkekből származó mikropartikulákkal (PMP) inkubáltuk 24 óráig 37 °C-on, majd a HCAEC-sejteket anti-CD146-PE antitesttel (piros), a mikropartikulákat anti-CD42a-FITC antitesttel (zöld) festettük. A mikropartikulák internalizációját fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Kék színnel megfestve a sejtmagok láthatók (A). A fluoreszcencia intenzitás változást összehasonlítottuk a szepszises és a kontroll PMP-vel kezelt sejtekben (B). Skála mérete: 20 μ m. ($n=5-6$ sejt/kísérlet). Átlag \pm SEM értéket ábrázoltunk.

Szerettük volna tovább vizsgálni a mikropartikulák funkcionális hatását szepszisben, hogy vajon az általuk szállított nagyobb mennyiségű miR-223 képes-e befolyásolni az endothelsejtek működését. Ezért a HCAEC sejteket először izolált szepszises mikropartikulákkal inkubáltuk 24 óráig és az endothelsejtekben emelkedett miR-223 expressziót találtunk ($p = 0,016$) a kontroll PMP mintákkal kezelthez képest (**50/A. ábra**), ezzel szemben ezekben a mintákban az ICAM1 mRNS expressziója jelentősen csökkent ($P=0,031$) (**50/B. ábra**). Ezen eredmények megerősítésére a HCAEC sejteket *in vitro* TRAP-aktivált vérlemezkékből izolált mikropartikulákkal kezeltük. Mivel szignifikánsan magasabb volt a plazma TNF- α szint a szepszisben szenvedő betegekben a kontrollokhoz képest ($28,6 \pm 3,7$ vs. $12,4 \pm 1,1$ pg/mL, $P < 0,0001$), ezért a septicus körülményeket az endothelsejtek TNF- α stimulációjával modelleztük.

A TNF- α előkezelés csökkentette a miR-223 expresszióját és növelte az ICAM1 mRNS szintet a kontroll HCAEC mintákhoz képest, míg az emelkedett miR-223-t ($P=0,017$) csökkent ICAM1 mRNS expresszióval ($P=0,010$) detektáltuk a TRAP-aktivált mikropartikulák jelenlétében (**50/C-D. ábra**). A szolubilis ICAM-1 koncentrációkat a HCAEC sejtek felülszójában ELISA-val lemertük. A TNF- α hatására emelkedett az ICAM-1 fehérje mennyisége, míg a TNF- α és a mikropartikulák együttesen szignifikánsan csökkentették ($P=0,006$) az ICAM-1 fehérje koncentrációját (**50/E. ábra**). Ezek az adatok azt támasztják alá, hogy a miR-223-t szállító mikropartikulák képesek befolyásolni a túlzott fehérje expressziót az endothelsejtekben gyulladásos körülmények között.

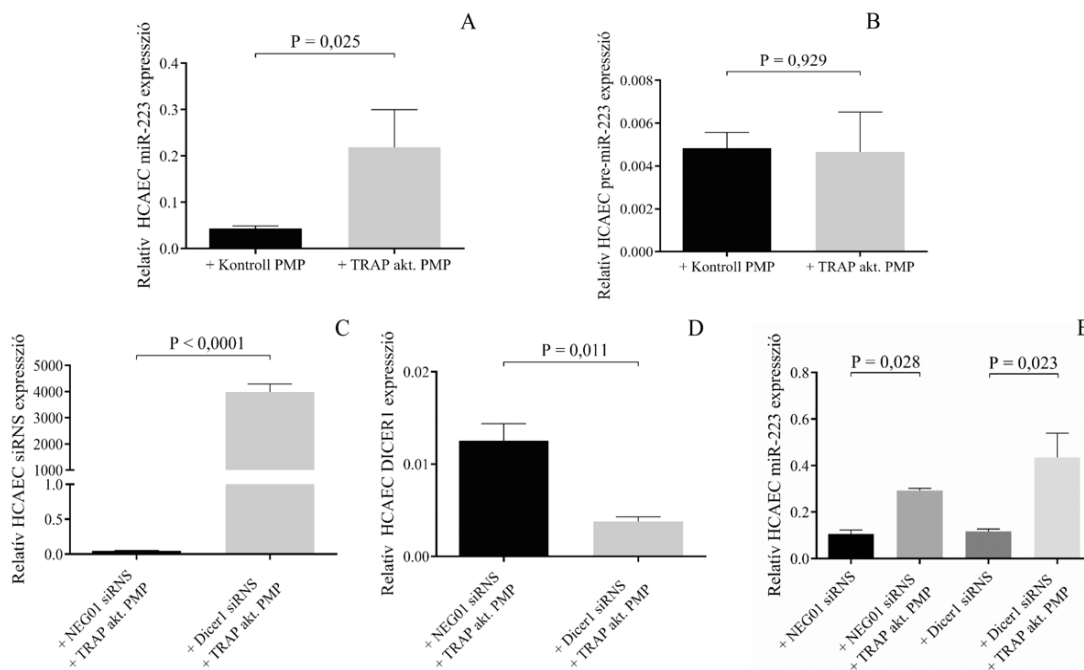


50. ábra A miR-223-t hordozó mikropartikulák septicus körülmények között jelentősen csökkentik az emelkedett ICAM-1 szintet HCAEC sejtekben. A miR-223 (A) és az ICAM1 mRNS expresszió (B) vizsgálata szepsziszes és kontroll vérelemezkekből származó mikropartikulák és a kontroll mikropartikulák által stimulált endothelsejtekben. A TNF- α önmagában alacsonyabb miR-223 és magasabb ICAM1 mRNS és fehérje szintet eredményezett. A TRAP által indukált mikropartikulák (PMP) jelenlétében emelkedett miR-223 (C) és csökkent ICAM1 mRNS szintet (D), illetve fehérje koncentrációt (E) találtunk. Átlag \pm SEM-et tüntettük fel. (n=7–8 minta/csoport).

Annak megállapítására, hogy a megváltozott miR-223 expresszió ténylegesen összefügg a mikropartikulák endothelsejtekbe történő internalizációjával és miRNS „transzfekciójával”, a HCAEC sejteket 4 °C-on inkubáltuk a szepsziszes plazma mintákból kinyert mikropartikulákkal így megakadályozva a mikropartikulák endocitózisát. Kontrollként az endothelsejteket egyidejűleg 37 °C-on mikropartikulával vagy azok hiányában tenyésztettük. A fluoreszcens jelölés azt mutatta, hogy a szepsziszes mintákból származó mikropartikulák HCAEC-be történő felvétele jégen (4 °C-on) szinte teljesen gátolt volt a 37 °C-on inkubált sejtekhez képest. A 4 °C-on történt blokkolós vizsgálathoz 6 órás mikropartikula kezelést alkalmaztunk, mivel az endothelsejtek 6 óránál hosszabb ideig, jégen történő kezelése szembevető morfológiai változásokon mentek keresztül, amelyek negatív módon befolyásolták volna a mikropartikulák internalizációját (nem ábrázolt eredmények). Ezen kívül a HCAEC sejtekből RNS-t izoláltunk a miR-223 kvantáláshoz. Megállapítottuk, hogy a jégen tartott HCAEC mintákban nem következett be jelentős miRNS expresszió változás (P=0,969), míg a szepsziszes mikropartikulákkal inkubált HCAEC sejtek 37 °C-os

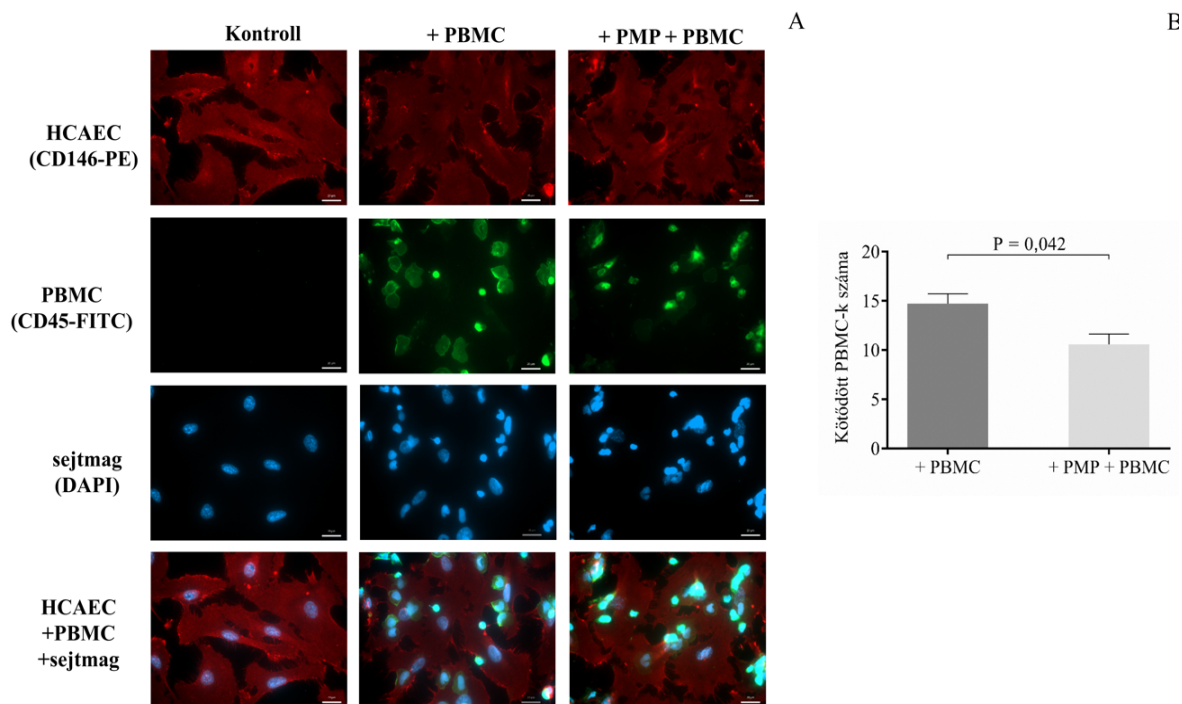
sejtenyészési körülmény között megemelkedett miR-223 értéket mutattak a kontroll mintákhoz képest ($P=0,004$). Ezt a kísérletet bemutató színes mikroszkópos ábra az eredeti közleményben megtekinthető. Ezek az eredmények tehát megerősítették, hogy a megnövekedett miR-223 expressziót a HCAEC sejtekben valóban a miRNS-t hordozó mikropartikulák endocitózisa okozta.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a miRNS-ek működésével összefüggésbe hozható más sejtes folyamatok hozzájárultak-e bármilyen mértékben a szepszises mikropartikulával kezelt HCAEC sejtekben a miR-223 expressziójának fokozásához. Ebből a célból két *in vitro* kísérleti megközelítést alkalmaztunk. Célunk volt a pre-miR-223 expressziójának elemzése az *in vitro* TRAP-stimulált mikropartikulák jelenlétében vagy hiányában. A Dicer1 enzim expressziójának és ezáltal funkciójának csökkentése a HCAEC sejtekben Dicer1 specifikus siRNS transzfektálással a mikropartikulákkal történő inkubáció előtt történt. Először az érett és a pre-miR-223 expressziókat párhuzamosan kvantáltuk RT-qPCR módszerrel TRAP-aktivált mikropartikulával kezelt és nem kezelt HCAEC sejtekben. A miR-223 érett formájának expressziója szignifikánsan ($P=0,025$) emelkedett az előbbi mintákban, míg a pre-miR-223 expressziójában nem volt különbség, tehát nem történt transzkripció ($P=0,929$) (**51/A-B. ábra**). Ezt követően az endothelsejteket Dicer1 siRNS-sel vagy NEG01 siRNS-sel transzfektáltuk és izolált mikropartikulákat adtunk a sejtekhez 24 órán keresztül. Az RNS izolálás után ellenőriztük a transzfekció hatékonyságát (**51/C. ábra**). A transzfekció alacsonyabb DICER1 mRNS-t eredményezett a NEG01 siRNS-sel kezelt mintákhoz képest (**51/D. ábra**). Azokban a sejtekben, amelyekben a Dicer1 expresszióját csökkentettünk, az érett miR-223 szint még mindig jelentősen megemelkedett ($P=0,023$) a PMP-k jelenlétében a HCAEC sejtekben (**51/E. ábra**). A megnövekedett miR-223 szint tehát a mikropartikulák általi bejuttatásának volt köszönhető, és miRNS transzkripció, vagy indukált Dicer1 enzim aktivitás nem járult hozzá a szepszises endothelsejtek megváltozott miR-223 expressziójához.



51. ábra A PMP-k által modulált miR-223 expresszióban a miRNS érés, illetve a fokozott Dicer1 enzim funkció esetleges szerepének vizsgálata a HCAEC sejtekben. A TRAP aktivált trombocytákból származó PMP-k jelenlétében megmértük a miR-223 expressziót (A) és a pre-miR-223 szintet (B) az endothelsejtekben (HCAEC) a kontroll PMP-vel kezelt mintákhoz képest. A Dicer1 specifikus siRNS-t sikeresen transzfektáltuk az endothelsejtekbe (C), csökkentve DICER1 mRNS expressziót (D). A csökkent Dicer1 expresszió jelenlétében a miR-223 szint összehasonlítása az endothelsejtekben a TRAP-aktivált PMP-k jelenlétében és hiányában (E). Átlag \pm SEM értéket ábrázoltunk. (n=4-5 minta/kísérlet).

Kíváncsiak voltunk végül arra, hogy a miR-223 tartalmú mikropartikulák bejutása az endothelsejtekbe csökkentheti-e a leukocyták adhézióját *in vitro* szeptikus körülményekben az alacsonyabb ICAM-1 expresszió mellett. Ebben a funkcionális kísérletben a HCAEC sejteket TNF- α aktivált és nem aktivált PBMC-vel inkubáltuk 1 órán át. A PBMC-k hozzáadása előtt a sejteket a szeptiszis eredetű mikropartikulákkal, illetve nélkülük tenyésztettük 24 órán keresztül. A negatív kontroll sejteket PBMC hozzáadása nélkül tartottuk fenn. Fluoreszcens mikroszkóppal értékeltük a jelölt leukocytákat. Megállapítottuk, hogy a PBMC-k az endothelsejtek felszínéhez kapcsolódtak és ez 30%-kal csökkent abban az esetben, ha mikropartikulákat adtunk a HCAEC sejtekhez (**52/A. ábra**). A szeptiszisből származó mikropartikulák nélküli PBMC-k száma látóterenként 14 ± 2 sejt volt, szemben a mikropartikulával előkezelt mintákkal, ahol 10 ± 2 sejt/látómező volt (P=0,042) (**52/B. ábra**). Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a PMP-k szállította miR-223 által csökkentett ICAM-1 receptor szint a leukocyták alacsonyabb mértékű kötődését vonta maga után az endothelsejtek felszínén.



52. ábra A leukocyták (PBMC) csökkent adhéziójának vizsgálata az endothelsejtekhez a szepszis eredetű mikropartikulákkal (PMP) történt kezelés után. A HCAEC sejteket előkezeltük szepszises thrombocytákból származó PMP-vel. A sejteket ezt követően 1 órán át TNF- α aktivált PBMC-vel inkubáltuk. Az endothelsejteket anti-CD146-PE antitesttel (piros) és a PBMC-eket anti-CD45-FITC antitesttel (zöld) festettük. A PBMC-k adhézióját az endothelsejtek felületéhez fluoreszcens mikroszkóppal (A) vizsgáltuk. Kék: sejtmagok. Összehasonlítottuk a kötődött PBMC-k számát a PMP-vel előkezelt és nem kezelt endothelsejtek között (B). Skála méret: 20 μ m. Átlag \pm SEM. (n=5-6 sejt/ állapot).

Összefoglalóan kijelenthetjük, hogy a megváltozott expressziót mutató megakaryocytathrombocytá eredetű miRNS-ek hozzájárulnak a rendellenes vérlemezke aktiválódás kialakulásához, ugyanakkor - kedvező hatást is kifejtve - a túlzott mértékű endothelsejt aktivációt is képesek mérsékelni bakteriális szepszisben.

5.5 A gyógyszeres koronárisztent (DES) és fémsztent (BMS) sejtaktiváló hatásának összehasonlítása, valamint a DES-ből eluáló everolimus kedvező hatásának mechanizmusa az endothelsejt aktiváció tükrében

Az elmúlt két évtizedben széles körben alkalmazott kardiológiai intervenciók beavatkozásoknak köszönhetően jelentősen javultak a klinikai eredmények a koronária sztentelés után, különösen a DES használatát követően, ugyanakkor az ennek háttérében álló sejtaktivációs folyamatok mértékéről és arra kifejtett kedvező hatásáról még keveset tudunk.

5.5.1 BMS vagy DES kezelésben részesült stabil anginás betegekben meghatározott vérlemezke és endothelsejt aktivációs markerek koncentrációjának és a 6 hónapon belül kialakult ISR-rel való összefüggésük elemzése

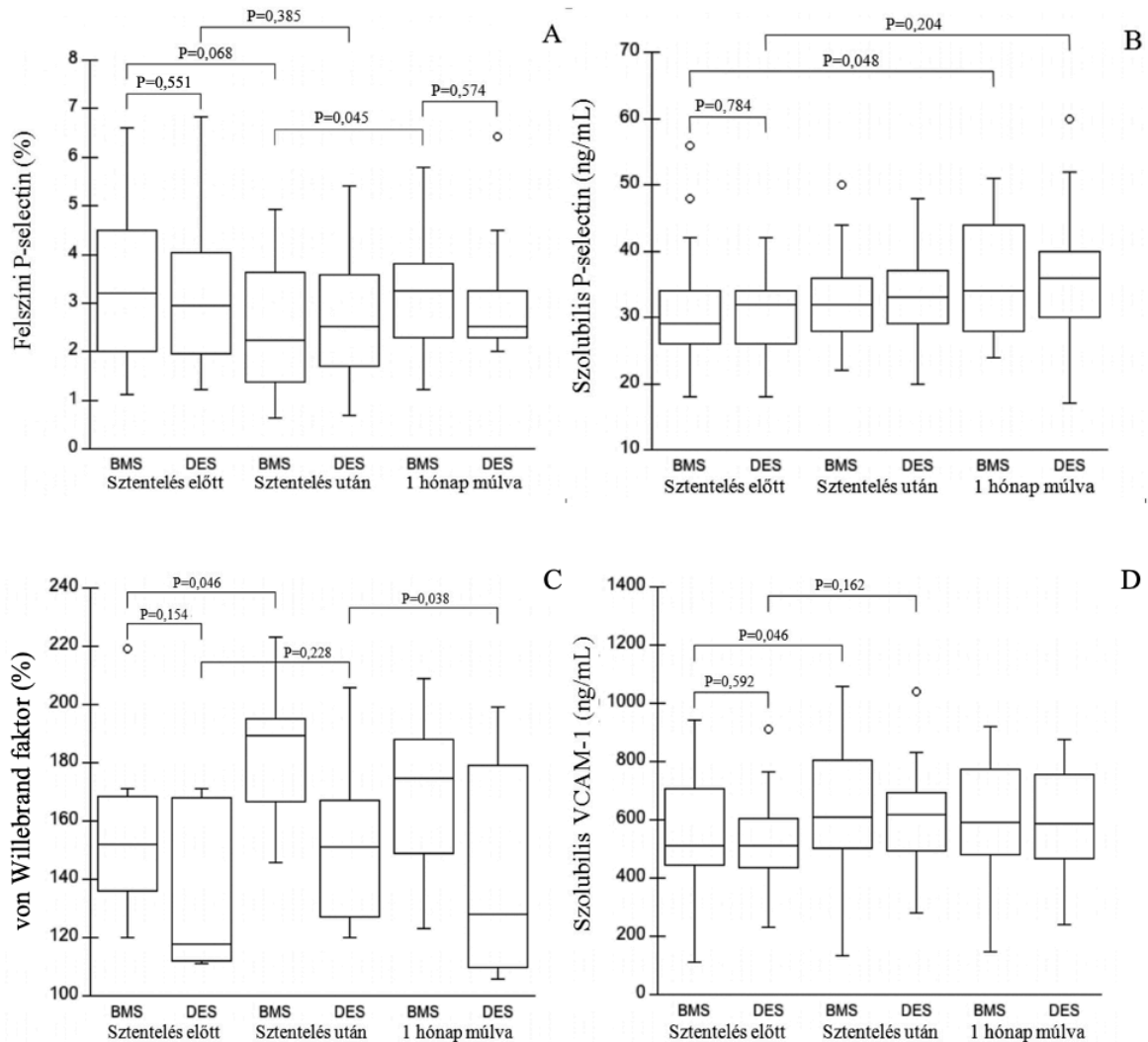
Ebben a tanulmányunkban 28 stabil anginás beteg Integrity® típusú BMS beültetésben és 21 beteg Xience® típusú DES kezelésben részesült, akik plazmamintáiban vizsgáltuk a vérlemezke és endothelsejt aktivációs markerek szintjét. A betegcsoportok korban és nemben illesztettek voltak és nem volt különbség a társbetegségek (pl. DM2, magasvérnyomás vagy hiperkoleszterinémia) jelenlétében és a dohányzási szokásokban sem (**6. táblázat**). A két csoport között nem volt jelentős különbség a felhasznált sztentek számában, hosszában és átmérőjében. A szűkület súlyosságában és a vaszkuláris lézió típusában (A/B1/B2/C) tapasztalt különbségek magyarázzák meg, hogy a betegek miért kaptak DES-t BMS helyett. Az implantáció klinikai körülményeit és technikai jellemzőit bemutató táblázat az eredeti közleményben kereshető meg. A beavatkozást követően a betegeket 6 hónapon keresztül követtük, amely során a klinikus nem tapasztalt sztenttrombózist, azonban 6 BMS betegben ISR alakult ki.

A sztentbeültetést követő hemosztázis eltérések monitorozására a D-dimer és a fibrin monomer (FM) koncentrációkat használtuk. Amíg a D-dimer és a fibrinogén szintekben nem volt különbség, addig az FM koncentrációk jelentősen megemelkedtek már 24 órával a beavatkozást követően ($P=0,012$), és ez nem csökkent le az 1 hónapos mintákban sem. A medián FM értékek ugyanakkor a referencia tartományban (<10 mg/L) maradtak. Az intervenciók során bekövetkezett átmeneti myocardialis ischemia értékelésére szérumban cTnT szint került meghatározásra. A sztent beültetés után 24 órával jelentősen magasabb cTnT koncentrációkat figyeltünk meg mind a BMS ($P=0,0001$), mind a DES ($P=0,042$) csoportban, amelyek 1 hónap elteltével visszacsökkentek a kiindulási értékekre. A rutin diagnosztikai paraméterek eredményeit bemutató ábrák az eredeti közleményben megtekinthetők.

Kezelés előtti paraméterek	BMS (n=28)	DES (n=21)	P-érték
Életkor (év)	68,4 ± 9,9	64,3 ± 11,3	0,19
Nem (férfi, %)	50	77	0,13
Diabetes mellitus (%)	46	54	0,77
Magasvérnyomás (%)	92	91	0,78
Dohányzás (%)	53	38	0,14
Hiperkoleszterinémia (%)	38	37	0,88
BMI (kg/m ²)	30,2 ± 5,4	27,9 ± 5,2	0,59
Előző MI (%)	54	32	0,12
Egyéb atherosclerosissal járó vaszkuláris betegség (%)	39	28	0,61

6. táblázat A BMS-DES vizsgálatban résztvevő stabil anginás betegek kezelés előtti demográfiai jellemzői.
Rövidítések: BMS: bare metal stent, DES: drug eluting stent, BMI: body mass index, MI: miokardiális infarktus.

A vérlemezke aktiváció mértékét a felszíni P-selectin áramlási citometriai, valamint a plazma minták szolubilis P-selectin, CD40L és PDGF-BB koncentrációk ELISA mérésével analizáltuk a sztentkezelés előtt és után. A két alcsoport között a kiindulási thrombocyt CD62 pozitivitásban és a szolubilis P-selectin szintekben nem volt különbség (**53/A-B. ábra**). Bár a sztentelést követően mindkét kohorszban átmenetileg csökkent a P-selectin expresszió mértéke, feltehetően a keringésből kikerült aktivált vérlemezkék miatt, ugyanakkor a BMS betegekben az 1 hónapos mintában ismét szignifikánsan ($P=0,045$) emelkedett ez az érték szemben a DES-csoporttal. Ráadásul a kettős thrombocyt funkció gátló terápia ellenére mindkét sztenttípus alkalmazása mellett fokozott vérlemezke aktivációt figyeltünk meg a beültetést követően 1 hónappal, de a két vizsgálati csoport között ekkor sem volt különbség a felszíni P-selectin expressziókban (BMS: 3,3 [2,3–3,8] %; DES: 2,5 [2,3–3,2] %; $P=0,574$) (**53/A. ábra**). Ezzel párhuzamosan a szolubilis P-selectin koncentrációk fokozatosan megemelkedtek a keringésben, különösen a BMS csoportban, ahol a beavatkozás után 1 hónappal szignifikánsan magasabb koncentrációk voltak (a kezelés előtti értékekhez képest $P=0,048$) (**53/B. ábra**). Érdekes módon, a szolubilis CD40L plazma szintek a referens tartományon (<100 pg/mL) belül maradtak végig a követés során és a két csoport között nem volt jelentős különbség az egyes időpontokban (nem ábrázolt adatok).

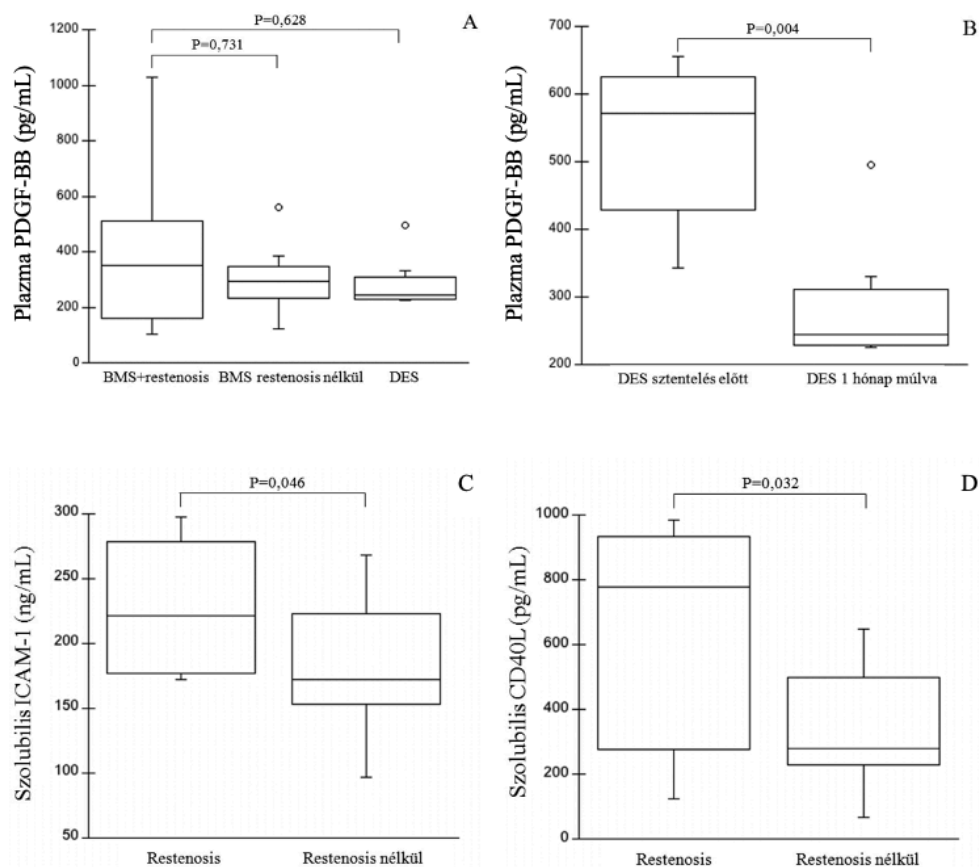


53. ábra A BMS, illetve DES implantációt követő vérlemezke és endothelsejt aktiváció mértékének változása. Különböző időpontokban mindkét sztentípus alkalmazása mellett analizáltuk a vérlemezke aktivációt a felszíni P-selectin expresszió (A) és a szolubilis P-selectin koncentrációkon (B) keresztül, míg az endothélium érintettségének vizsgálatára von Willebrand faktor (vWF) (C) és szolubilis VCAM-1 (D) szintek mérését végeztük el. Az ábrán a medián mellett az 5-95 percentilis értékeket tüntettük fel.

Ezzel párhuzamosan az endothelsejt aktiváció mértékét több biomarker mérésén keresztül szintén értékeltük. A vWF szintjében a sztentkezelés előtt nem volt különbség ($P=0,154$) a két csoport között, ugyanakkor a BMS beavatkozás után 24 órával a vWF-Ag koncentráció szignifikáns emelkedést (190 [173-195] vs. 152 [142-167] %, $P=0,046$) mutatott. A DES csoportban nem tapasztaltunk ilyen mértékű eltérést, a legtöbb esetben a referencia tartományon belül (50-160 %) voltak az értékek (**53/C. ábra**). Szintén nem tértek el egymástól a kiindulási VCAM-1 szintek a két kohorsz között ($P=0,592$), ezzel szemben a BMS betegektől a sztentelés után már 1 nappal levett plazma mintákban szignifikánsan magasabb szolubilis

VCAM-1 koncentrációkat (610 [501-806] vs. 512 [449-703] ng/mL, $P=0,046$) mértünk szemben a DES csoporttal, ahol nem emelkedett jelentősen ($P=0,162$) (53/D. ábra).

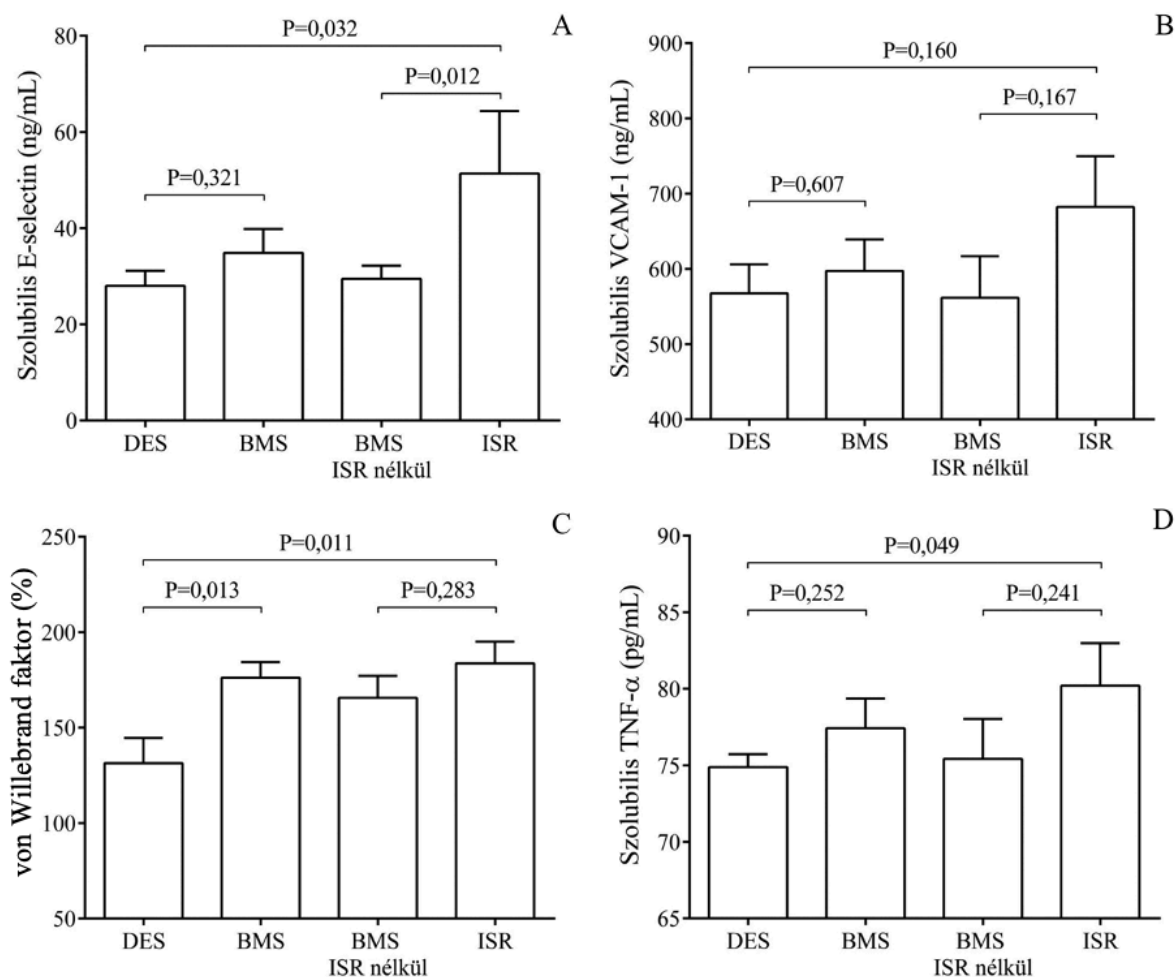
A BMS kezelésben részesült betegek közül 6 esetben ISR alakult ki a követési idő alatt, viszont a DES csoportban nem volt ilyen komplikáció, ezért a csoportbontás után is megvizsgáltuk az aktivációs markerek eredményeit. Mivel a sztentelés okozta vaszkuláris sérülést követően az aktiválódott vérlemezkékből nagy mennyiségű simaizomsejt proliferációt elősegítő PDGF-BB is kikerülhet a keringésbe, ezért a plazma minták PDGF-BB szintjét is lemértük, hogy további bizonyítékot kapjunk a BMS indukálta ISR kialakulására. Azoknál a betegeknél, akiknél a BMS mellett kialakult az ISR, bár az alacsony esetszám miatt nem szignifikáns mértékben, de magasabb PDGF-BB koncentrációkat mértünk a sztentelés után 1 hónappal a komplikációt nem mutató BMS betegekhez és az egész DES csoporthoz képest (54/A. ábra).



54. ábra A plazma PDGF-BB, valamint a szolubilis ICAM-1 és CD40L szintek összehasonlítása az egyes klinikai alcsoportok között. Sztentelés után 1 hónappal összehasonlítottuk a PDGF-BB értékeket az ISR csoport, a komplikáció nélküli BMS, illetve a DES csoport között (A). Külön a DES csoportban a PDGF-BB koncentrációkat elemeztük 1 hónappal a sztentelést követően (B). Ezzel párhuzamosan a szolubilis ICAM-1 (C) és CD40L koncentrációkat (D) is összevetettük ISR jelenlétében és hiányában. Az ábrán a medián mellett az 5-95 percentilis értékeket tüntettük fel.

A teljes DES csoportban ugyanakkor a PDGF-BB szintje a kiindulási értékéhez képest jelentősen lecsökkent ($P=0,004$) 1 hónappal a beavatkozást követően (**54/B. ábra**), ami részben magyarázhatja, hogy miért nem alakult ki ISR ezekben a betegekben. Bár a teljes BMS és DES csoport között nem tapasztaltunk különbséget, az ISR jóval magasabb szolubilis ICAM-1 ($P=0,046$) és CD40L ($P=0,032$) koncentrációkkal járt együtt (**54/C-D. ábra**), jelezvén a kóros celluláris aktivációt.

Ehhez hasonlóan a szolubilis E-selectin, VCAM-1 és vWF szintek is magasabbak voltak az ISR-pozitív BMS betegekben (**55/A-C. ábra**) a DES csoporthoz képest. Ez a változás különösen az E-selectin és a vWF esetében volt jelentős mértékű ($P=0,032$ és $P=0,011$), míg a VCAM-1 esetében egy hasonló irányú, nem szignifikáns tendenciát tapasztalhattunk ($P=0,160$).



55. ábra Az ISR-rel együtt járó fokozott endothelsejt aktiváció és vaszkuláris gyulladás kimutatása. Az igazolás érdekében megmértük a szolubilis E-selectin (A), VCAM-1 (B) és vWF (C) szinteket, valamint a proinflammatorikus TNF- α koncentrációkat (D). Az ábrán az átlag és SEM értékeket ábrázoltuk.

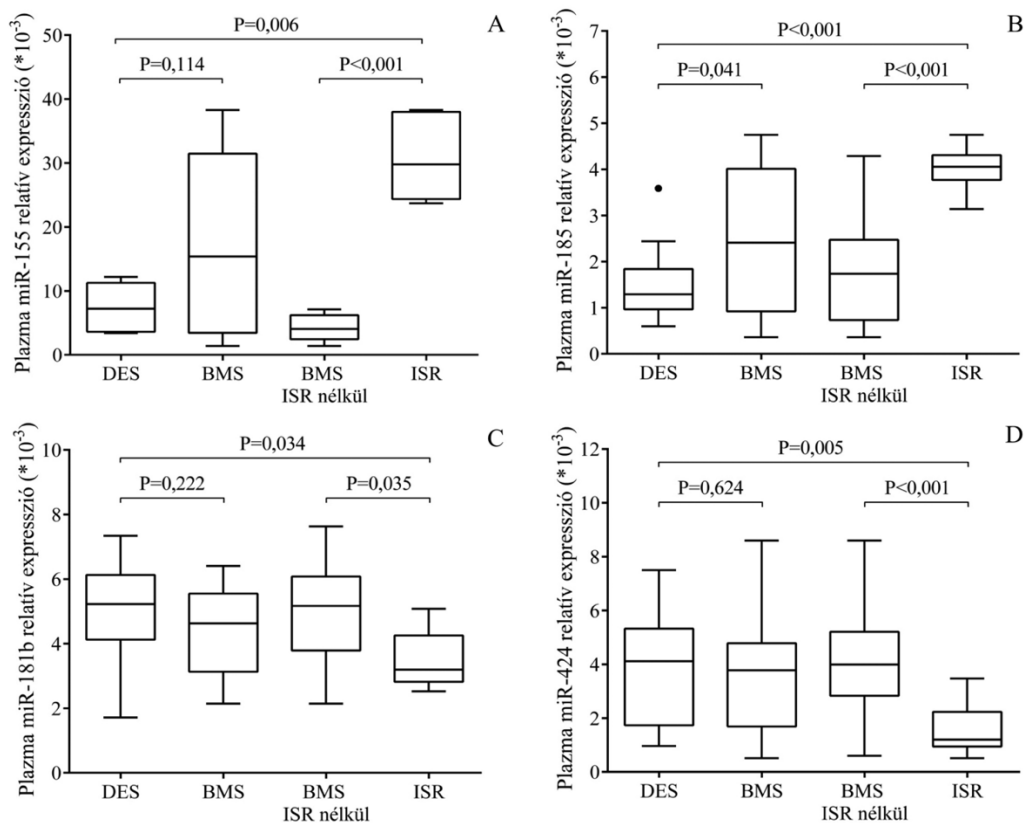
Végül a vaszkuláris gyulladást jelző TNF- α esetén azt tapasztaltuk, hogy a plazma mintákban lényegesen magasabb ($P=0,049$) volt a citokin plazma koncentrációja ISR-ben (**55/D. ábra**).

Külön megnéztük, hogy a két betegcsoportban mért különböző biomarkerek szintjének alakulását esetleg befolyásolta-e az aszpirin/clopidogrel kezelés hatékonysága, ami a vérlemezke aggregáció és a VASP fehérje foszforiláció vizsgálatán keresztül került megállapításra 4 héttel a terápia megkezdését követően. A kezelésre jól reagáló betegek, az ún. „reszponderek” közé tartoztak azok, akiknek a vérlemezke reaktivitási indexe $<50\%$, a nem reagáló személyeknél ez $>72\%$ volt, és a kettő között ($50-72\%$) voltak a „gyengén reagáló” betegek. Ezek alapján a BMS csoportban 21 (75%), míg a DES csoportban 16 (76%) „reszponder” volt. Azt tapasztaltuk, hogy thrombocyta funkció gátló kezelés hatékonysága nem befolyásolta a szolubilis markerek szintjét. A BMS csoportban a felszíni P-selectin pozitívításban, a DES csoportban a plazma PDGF-BB szintekben tapasztaltunk enyhe, de nem szignifikáns különbséget a „reszponderek” és a gyengén, illetve a nem reagáló betegek között. Az összehasonlítás eredményeiről készült táblázat az eredeti közleményben olvasható.

A szolubilis fehérje biomarkerek mellett retrospektív módon a lefagyasztott plazma mintákban keringő miRNS-eket is analizáltunk potenciális új paraméterekként. Elsőként megvizsgáltuk a miRNS profilt a sztentelés után 1 hónappal levett plazma mintákban, amelyhez csoportonként random módon 3-3 RNS mintát választottunk ki. A TaqMan OpenArray analízissel 66 miRNS-t detektáltunk a plazma mintákban. ISR-ben 17 miRNS expressziója nagyobb, mint másfélszeres mértékben ($\text{fold change} \geq 1,5$) csökkent (pl. miR-126, miR-223, miR-424), míg 19 másik miRNS szintje ugyan ilyen mértékben emelkedett (pl. miR-155 és miR-185) a komplikáció nélküli BMS csoporthoz képest. A DES csoporthoz hasonlítva az eredmények részleges átfedéssel közel azonosak voltak, 15 miRNS csökkent és 23 emelkedett ISR-ben. A legnagyobb változást mutató miRNS-ek szintjét UPL-próba alapú RT-qPCR módszerrel validáltuk a teljes betegcsoportban (**56/A-D. ábra**). Mivel a miR-181b specifikus assay nem szerepelt a TaqMan OpenArray lemezen, ezért a párhuzamos *in vitro* kísérleteink eredményei alapján ezt a miRNS-t is bevontuk a vizsgálatainkba.

Az *ex vivo* plazma mintákban tapasztalt magasabb TNF- α koncentrációk mellett a markánsan emelkedett keringő miR-155 ($P<0,01$) és miR-185 ($P<0,001$) expressziók is alátámasztották az ISR-ben kialakult gyulladást jelző folyamatokat, szemben a komplikáció nélküli BMS és DES csoportokkal (**56/A-B. ábra**). Az E-selectin és VCAM-1 expressziókat szabályozó miR-181b szintje szignifikánsan kisebb volt ISR-ben a BMS ($P=0,035$) és a DES ($P=0,034$) csoportokhoz képest (**56/C. ábra**). Az OpenArray analízissel kapott eredményeket a

vWF szintézist befolyásoló miR-424 esetében is validálni tudtuk a teljes betegcsoportban, mivel a miRNS szintje jelentős mértékben lecsökkent ($P<0,01$) a komplikáció nélküli csoportokhoz képest (**56/D. ábra**).



56. ábra Az extracelluláris miRNS-ek expressziója a BMS és a DES betegek plazma mintáiban. Az ISR-ben kialakult vaszkuláris gyulladásos folyamatokra és endothelsejt diszfunkcióra jellemző keringő miR-155 (A) és miR-185 (B) expressziók mellett az E-selectin és VCAM-1 fehérje expressziót szabályozó miR-181b szintjét (C) és a vWF-t befolyásoló plazma miR-424 expressziót (D) is kvantáltuk. Az ábrán a medián mellett a minimum és maximum értékeket jelöltük.

Végül a két miRNS (miR-181b és miR-424) expresszióját összevetettük a plazma mintákban mért endothelsejt aktivációs markerek szintjével, és inverz korrelációt találtunk a csökkent miR-181b és az emelkedett E-selectin ($r=-0,375$, $P=0,049$) és VCAM-1 plazma szintek ($r=-0,441$, $P=0,019$), valamint a miR-424 és a vWF szintek ($r=-0,647$, $P=0,009$) között. Ezekből arra következtethetünk, hogy a csökkent miRNS expressziók is hozzájárulhatnak a fokozott endothelsejt aktivációhoz ISR-ben.

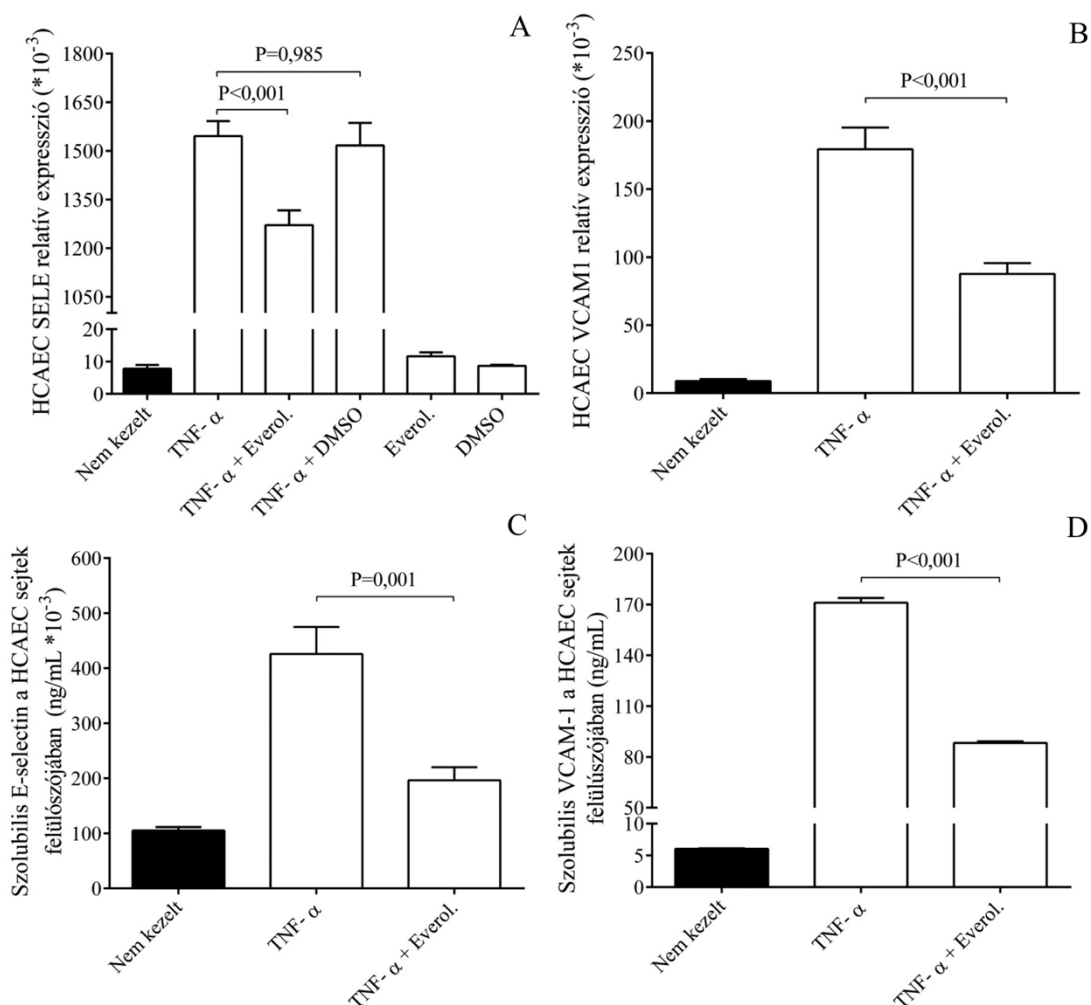
Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy a Xience[®] típusú DES implantáció kisebb mértékű vértrombolizáció és endothelsejt aktivációt okozott, mint az Integrity[®] típusú BMS-sel történt beavatkozás, ami nagyobb ISR rizikóval és több plazma miRNS esetén jelentősen alacsonyabb szintekkel járt együtt.

5.5.2 A koronárisztertelés okozta gyulladási folyamatok modellezése kétféle endothelsejtvonalon, és az E-selectin és a VCAM-1 receptor expresszió kvantálása, valamint az everolimus NF- κ B útvonalon keresztüli gyulladáscsökkentő hatásának *in vitro* vizsgálata

Kétféle endothelsejt tenyészetben *in vitro* megnéztük, hogy a sztertelés provokálta gyulladási folyamatok modellezéseként a TNF- α indukálta endothelsejt aktiváció hatására hogyan változik az E-selectin és VCAM-1 fehérjék expressziója, és a DES-ből kiszabaduló everolimus ezt milyen szinten képes mérsékelni. A vaszkuláris gyulladási folyamatokat TNF- α (100 ng/mL) aktiváció révén artériás koronária (HCAEC) és vénás (HUVEC) endothelsejteken modelleztük everolimus (0,5 μ M) jelenlétében és hiányában, majd RT-qPCR és ELISA módszerekkel meghatároztuk a SELE/E-selectin és VCAM1/VCAM-1 mRNS és fehérje expressziókat.

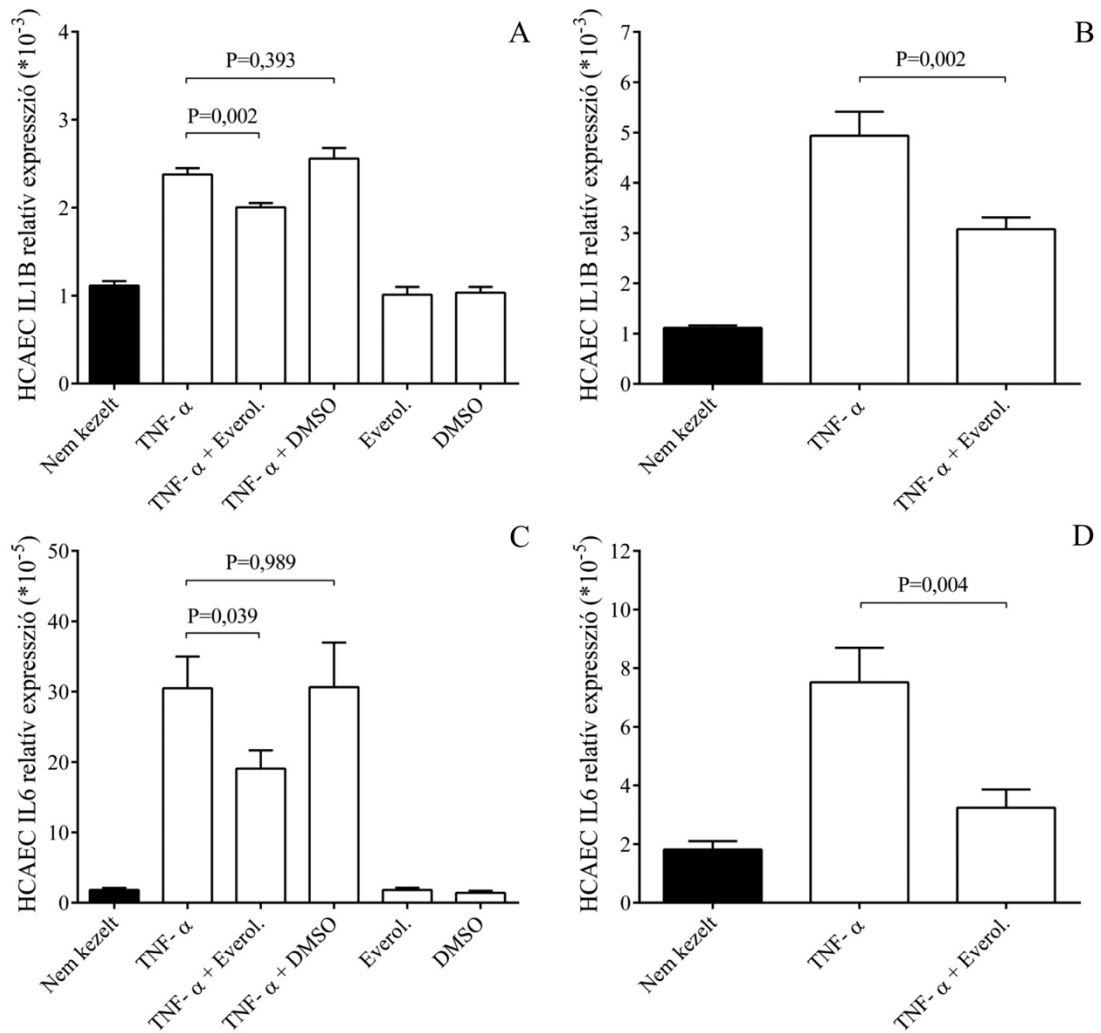
A SELE és VCAM1 mRNS-ek szintje a TNF- α koncentrációjának és az inkubálási idő (1-4 óra) függvényében markánsan növekedett, amit az everolimus koncentráció-függő módon szignifikánsan csökkenteni tudott a HCAEC sejtekben (P<0,001) (**57/A-B. ábra**) és a HUVEC (P<0,001) sejtekben is. A gyógyszer önmagában, valamint az oldószere (DMSO) sem volt jelentős hatással a sejtekre. A HUVEC sejt típusban kapott eredmények ábrája az eredeti cikkben található meg.

Az mRNS expressziók mellett a HCAEC sejtek felülcszójában a fehérje szinteket is meghatároztuk. A TNF- α kezelés hatására bekövetkező endothelsejt aktiváció következtében nagy mennyiségű E-selectin (már 4 óra után) és VCAM-1 (csak 24 óra után) szabadult ki a sejtekből. Az everolimus az mRNS szintek befolyásolásán keresztül a fehérjék koncentrációját (E-selectin, P=0,001 és VCAM-1, P<0,001) is képes volt szignifikánsan csökkenteni (**57/C-D. ábra**). Tehát ezek az *in vitro* eredmények előzetesen magyarázattal szolgáltak arra vonatkozóan, hogy a DES csoportban miért volt lényegesen kisebb az endothelsejt aktiváció mértéke és ennél fogva az E-selectin/VCAM-1 szintek a plazma mintákban.



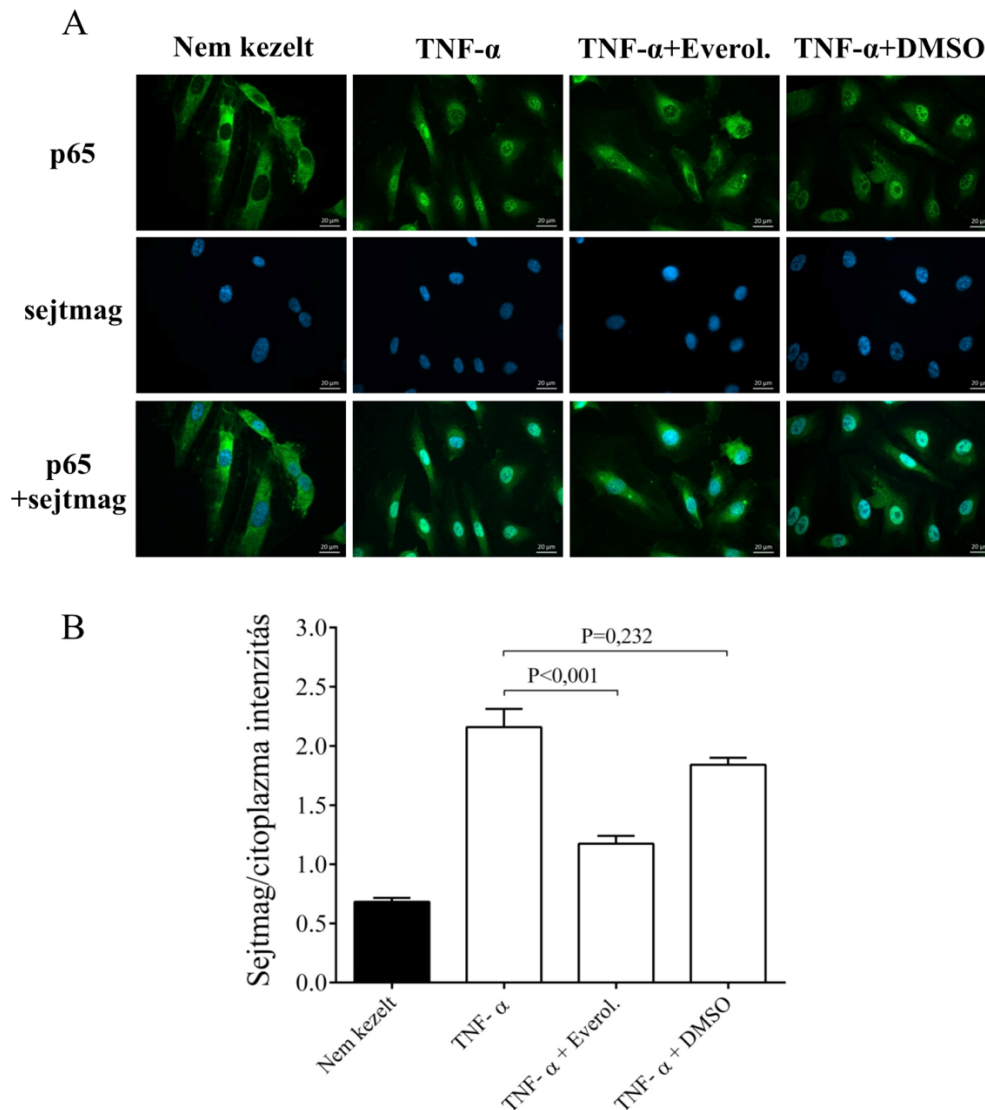
57. ábra Az E-selectin és a VCAM-1 mRNS és fehérje expressziók változása TNF- α stimulus hatására a HCAEC sejtekben. A TNF- α kezelés (100 ng/mL) hatására indukálódott SELE (A) és VCAM1 (B) mRNS expressziókat mértünk, ugyanakkor az everolimus (0,5 μ M) jelenlétében jelentősen kisebb mértékű volt. Ezzel párhuzamosan a szolubilis E-selectin (C) és VCAM-1 (D) koncentrációkat is megmértük. Az eredmények átlagát és a SEM értékeket ábrázoltuk, n=4-8/csoport.

Az endothelsejt aktivációs markerek szabályozásában betöltött szerepe mellett az everolimus gyulladáscsökkentő hatását az IL1B és IL6 mRNS-ek expresszióján keresztül analizáltuk. A HCAEC sejtekben a TNF- α citokinnal kiváltott gyulladást az emelkedett IL1B és IL6 mRNS szintek igazolták, amik már 1-4 órával a kezelés után jelentős mértékűek voltak (**58/A-D. ábra**). Ezt a nagyfokú gyulladós válaszreakciót az everolimus 1 óra alatt szignifikánsan redukálta (**58/A és C. ábra**), ami 4 órát követően még kifejezőbbé vált az IL1B (P<0,002) és az IL6 (P=0,004) mRNS esetén is (**58/B és D. ábra**). Ezen eredmények alapján az everolimus csökkenteni tudta a TNF- α indukálta gyulladós folyamatokat az endothelsejtekben.



58. ábra A TNF- α -val kiváltott intracelluláris gyulladásos folyamat csökkentése az everolimus által az endothelsejtekben. A HCAEC sejtekben a TNF- α által kiváltott gyulladást az IL1B és IL6 mRNS szintekkel igazoltuk, amiket az everolimus 1 óra alatt szignifikánsan redukált (A, C), és 4 órát követően még kifejezőbbé vált ezen expressziók esetén (B, D). Az eredmények átlagát és a SEM értékeket ábrázoltuk, $n=4-8$ /csoport.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az everolimus gyulladáscsökkentő hatása az NF- κ B útvonal aktivációja során a p65 transzlokáció gátlásán keresztül megy-e végbe. Ehhez a HCAEC sejteket rekombináns TNF- α -val (100 ng/mL) 1 órán keresztül kezeltünk everolimus (0,5 μ M) vagy az oldószere (DMSO) jelenlétében. Fluoreszcens mikroszkóppal a p65 festődés intenzitását analizáltuk a sejtek citoplazmájában és a sejtmagban (**59/A. ábra**). A nem kezelt sejtekhez képest a TNF- α hatására a p65 a citoplazmából bekerült a sejtmagba, amit az everolimus jelentős mértékben ($P<0,001$) meg tudott akadályozni. Ezzel ellentétben a DMSO nem befolyásolta a citokin hatását ($P=0,232$) (**59/B. ábra**). Ezekkel a kísérletekkel igazolni tudtuk, hogy az everolimus az NF- κ B útvonal gátlásán keresztül fejt ki gyulladáscsökkentő hatását.

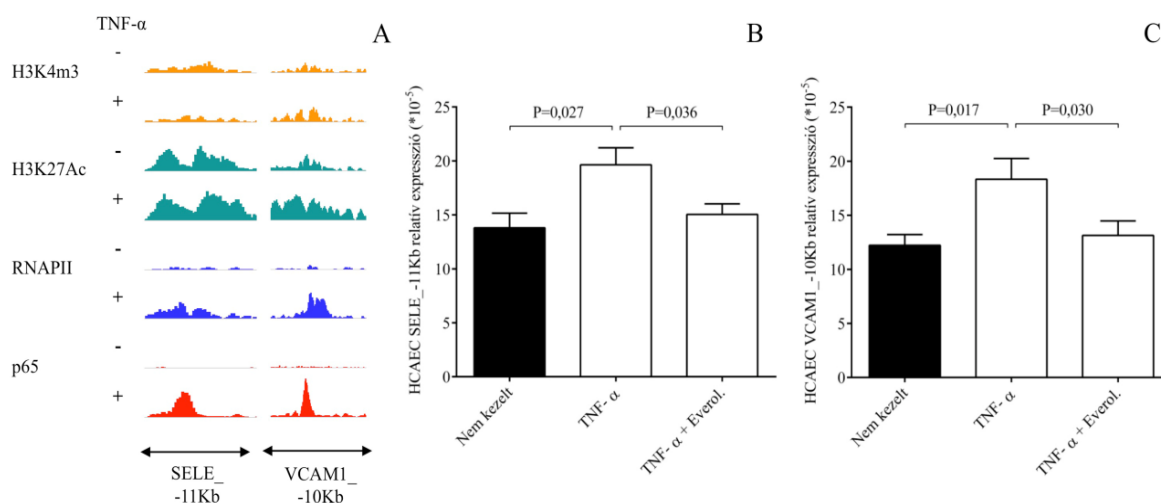


59. ábra Az NF- κ B útvonala aktivációjának vizsgálata a p65 magtranszlokációja révén immunfestéssel. A HCAEC sejteket 1 órán keresztül stimuláltuk TNF- α -val everolimus vagy az oldószere (DMSO) jelenlétében és hiányában. A p65 festődést fluoreszcens mikroszkóppal analizáltuk (A) és meghatároztuk a sejtmag és citoplazma jelintenzitás arányát (B). Zöld színnel a p65 specifikus festődés látható, míg kék színnel a sejtmagot jelöltük, a „scale bar” 20 μ m (A). Az eredmények átlagát és a SEM értékeket ábrázoltuk, n=6-8/csoport.

5.5.3 A SELE és VCAM1 gének expressziójának transzkripciós szinten való vizsgálata az enhanszer RNS-ek expresszió változásán keresztül, illetve a poszttranszkripciós szabályozásáért felelős miR-181b szintjének analízise endothelsejtekben everolimus jelenlétében és hiányában

Korábban mások az E-selectin és a VCAM-1 expressziók transzkripciós szabályozásában részt vevő gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokat LPS-el kezelt endothelsejtekben vizsgálták [265]. 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 lévő TNF- α indukált aktív enhanszer régiókat az NCBI GEO adatbázisban elérhető (GEO csatlakozási szám: GSE53998) ChIP-szekvenálási adatok [213, 214] újra elemzésével azonosítottuk. Ezekből készítettünk reprezentatív „snapshot” képeket Integrative Genomics Viewer (IGV2.3, Broad Institute) program segítségével. Az erről készített ábra az eredeti közlemény részeként tekinthető meg. Az RNS polimeráz II, a p65 transzkripciós faktor, a H3K27Ac és a H3K4m3 markereket vizsgáltuk, amelyek segítségével a SELE és VCAM1 gén közelében sikerült enhanszer RNS aktivitást azonosítani. A bioinformatikai analízisben és az enhanszer RNS-ekre specifikus primerek tervezésében Dr. Czimmerer Zsolt és Dr. Horváth Attila (DE, Biokémiai és Molekuláris Biokémiai Intézet) voltak a segítségünkre. Azért, hogy az enhanszer aktivitásra következtetni tudjunk, egy-egy kiválasztott enhanszer RNS expresszióját határoztuk meg mindkét gén esetén (**60/A. ábra**).



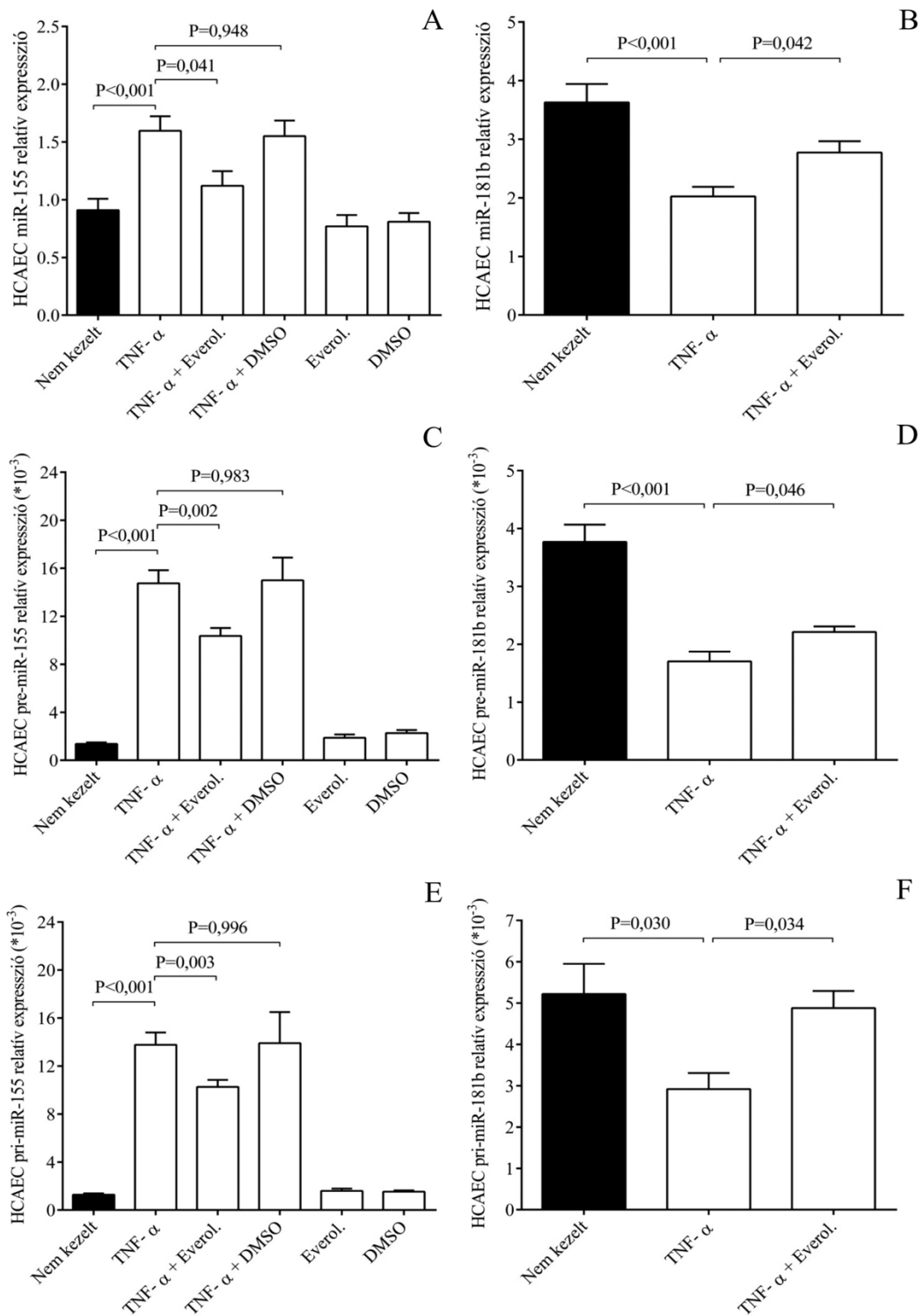
60. ábra Enhanszer RNS-ek (eRNS) expressziójának vizsgálata HCAEC sejtekben TNF- α és everolimus jelenlétében és hiányában. Az everolimus enhanszer aktivitásra kifejtett hatását egy-egy kiválasztott eRNS expresszióján keresztül határoztuk meg RT-qPCR módszerrel mindkét gén esetén (A). HCAEC sejtekben megerősítettük, hogy a TNF- α stimulus (100 ng/mL) hatására a SELE_{-11Kb} (B) és VCAM1_{-10Kb} (C) eRNS-ek expressziója fokozódik, amit az everolimus (0,5 μ M) 1 órás kezelést követően szignifikánsan csökkenteni tudott. Rövidítések: H3K4m3: trimethylation of lysine 4 on the histone H3 protein subunit, H3K27Ac: acetylation lysine 27 on the histon H3 protein subunit, RNAPII: RNS polimeráz II, p65: p65 transzkripciós faktor. Az eRNS expresszió átlagát és a SEM értékeit ábrázoltuk, n=4-8/csoport.

Megerősítettük, hogy a TNF- α stimulus hatására a SELE_{-11Kb} (P=0,027) és VCAM1_{-10Kb} (P=0,017) eRNS-ek expressziója fokozódik (**60/B-C. ábra**), amit az everolimus 1 órás kezelést követően csökkenteni tudott (P<0,05) a HCAEC sejtekben. Mindezek alapján az everolimus a

p65 TF-hoz kapcsolt eRNS-ek represszáálásán keresztül gátolni tudja a TNF- α indukálta SELE és VCAM1 gének fokozott transzkripcióját, ezáltal mérsékelve az endothelsejt aktivációt.

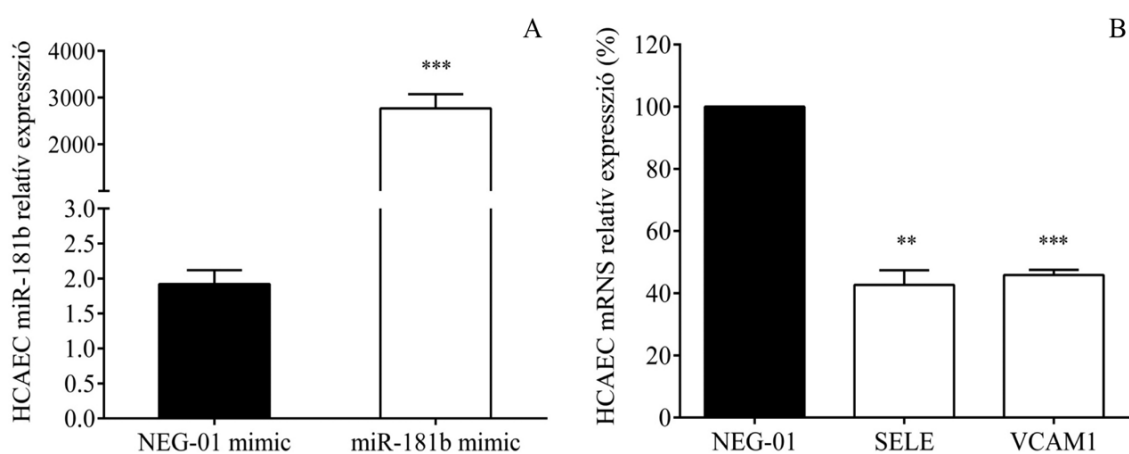
Az E-selectin és VCAM-1 gének poszttranszkripció szabályozása különböző miRNS-ek, pl. a miR-181b által is történhet [211], ezért ennek szerepét analizáltuk *in vitro* TNF- α stimulált endothelsejt (HCAEC és HUVEC) sejt kultúrákban, és egyben megvizsgáltuk az everolimus potenciális szabályozó funkcióját is. A miR-155 szint jelentősen megemelkedett a nem kezelt mintákhoz képest ($P < 0,001$) mind a HUVEC, mind HCAEC sejtekben (**61/A. ábra**), ami az IL1B és IL6 mRNS-ekhez hasonlóan jelezte a TNF- α által kiváltott gyulladásos válaszreakciót és az endothelsejt diszfunkciót. Ezzel szemben a miR-181b expressziója lényegesen lecsökkent ($P < 0,01$) a TNF- α stimulus hatására, ami hozzájárulhat a SELE és VCAM1 mRNS szintek további emelkedéséhez. A gyulladásos citokinnel egy időben alkalmazott everolimus megakadályozta a miR-181b expressziójának jelentős csökkenését, ezáltal mérsékelte a cél mRNS-ek fokozott kifejeződését. A TNF- α -val kezelt mintákhoz képest mind a HUVEC ($P = 0,049$), mind a HCAEC ($P = 0,042$) sejtekben szignifikánsan magasabb miR-181b szinteket detektáltunk, ami megközelítette a kontroll mintákban mért értékeket (**61/B. ábra**).

Ezt követően tanulmányoztuk, hogy a miR-155 és miR-181b szintek változása a szintézisük mely lépésénél szabályozódik, ezért meghatároztuk a miRNS-ek mindkét prekursorának (pre-miRNS és pri-miRNS) a mennyiségét a HCAEC sejtekben. Az érett miRNS mintázatokhoz hasonló változásokat tapasztaltunk a miR-155 és miR-181b prekursor formáinál (**61/C-F. ábra**). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy ezen miRNS-ek expressziója a transzkripciójuk szintjén szabályozódik, amit a TNF- α és az everolimus regulálhat.



61. ábra A HCAEC sejtek érett és prekursor miRNS tartalma TNF- α és everolimus jelenlétében és hiányában. A HCAEC sejteket TNF- α -val kezeltük 1-4 órán keresztül és RT-qPCR módszerrel meghatároztuk a SELE és VCAM1 mRNS-eket reguláló miR181b és a gyulladás specifikus miR-155 érett és prekursor miRNS expresszióját. A citokin hatására a miR-155 szintje jelentősen megemelkedett a nem kezelt mintához képest (sötét oszlop), ugyanakkor az everolimus szignifikánsan csökkenteni tudta ezt (A). Ezzel szemben a miR-181b expressziója szignifikánsan csökkent a TNF- α stimulust követően, viszont az everolimus vissza tudta ezt rendezni vagy megakadályozni a csökkenést (B). Az 1 órás kezeléseket követően a pre- és pri-miR-155 (C, E), illetve a pre- és pri-miR-181b (D, F) expressziójában hasonló mértékű változást tapasztaltunk, mint az érett miRNS-ek esetében. Az eredmények átlagát és SEM értékeit ábrázoltuk, n=4-8/csoport.

A korábbi, mások által HUVEC sejtekben végzett kísérletek [211] eredményeit meg kívántuk erősíteni: a miR-181b és a SELE, valamint a VCAM1 mRNS-ek közötti funkcionális összefüggést a TNF- α stimulált HCAEC sejtekben. Az endothelsejtek érett miR-181b szintjét specifikus miRNS mimic-eket használva „mesterségesen” fokoztuk (**62/A. ábra**), aminek a következtében a SELE (P=0,006) és VCAM1 (P<0,001) mRNS-ek expressziója jelentősen lecsökkent a negatív kontrollal (NEG-01) transzfektált mintához képest (**62/B. ábra**). Ezen eredményeink alapján alá tudtuk támasztani a miR-181b SELE és VCAM1 mRNS-ek szabályozásában betöltött szerepét.



62. ábra A miR-181b és a cél (SELE és VCAM1) mRNS-ek közötti direkt funkcionális kapcsolat vizsgálata. HCAEC sejtekben. A TNF- α -val 1 órán át „előkezelt” HCAEC sejtekbe miR-181b mimic-eket (25 pmol) transzfektáltunk Lipofectamine reagenssel. Ezzel párhuzamosan negatív kontrollként a sejtekhez NEG-01 mimic-eket (25 pmol) adtunk. A transzfekció után 1 nappal RT-qPCR módszerrel megmértük a miRNS és mRNS expressziókat. A NEG-01 negatív kontrollhoz (sötét oszlop) képest a miR-181b mimic hatására markánsan megemelkedett a miR-181b szintje (A), ami szignifikánsan csökkentette a SELE és VCAM1 mRNS-ek expresszióját (B). Az eredmények átlagát és SEM értékeit ábrázoltuk, n=4/csoport.

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy a DES implantáció után tapasztalt kisebb mértékű endothelsejt aktivációval együtt járó kedvezőbb klinikai állapot annak is köszönhető, hogy a sztent felszínéről leváló everolimus gyógyszer képes lokálisan az endothelsejtek E-selectin és VCAM-1 receptor expresszióját jelentősen csökkenteni, amit a génexpressziók transzkripció és poszttranszkripció szintjén is igazolni tudtuk.

5.6 A szérum/plazma HE4 tesztelése cisztás fibrózisban új diagnosztikai és követéses biomarkerként, valamint a CF-es légúti epithelsejtek fokozott HE4 expressziójának háttérben álló intracelluláris folyamatok vizsgálata

Cisztás fibrózisban sokáig nem volt elérhető olyan vérben meghatározható biomarker, amely hatékonyan segítené a kezelőorvos munkáját a CF-es betegek klinikai állapotának nyomon követésében. A HE4 fehérje vizsgálatával sikerült egy új paramétert azonosítanunk, aminek az emelkedett expressziós mechanizmusát szintén meg kívántuk ismerni.

5.6.1 A HE4 koncentráció mérése kezelésben nem részesült CF-es betegpopulációkban és különböző kontroll kohorszokban, illetve szérumszintjének korrelációja a tüdőbetegség súlyosságával és egyéb befolyásoló tényezőkkel

Az irodalom szerint elsőként kezdtük el konzekvensen meghatározni a HE4 fehérje szérum koncentrációját a CF-es betegek laboratóriumi vizsgálata érdekében nem tumormarkerként, hanem mint egy új típusú gyulladásos paraméter. Kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon a mások által korábban immunhisztokémiával kimutatott fokozott pulmonális HE4 expresszió [228] megmutatkozik-e a CF-es vérmintákban is.

Az első klinikai vizsgálatunkban összesen 77 gyermekkorú (18 év alatti) magyar CF-es beteget, valamint független kohorszként összesen 57 felnőtt CF-es cseh beteget válogattunk be, akik klinikai ellátásra szorultak vagy kontroll vizsgálaton jártak, de CFTR-specifikus kezelésben még nem részesültek. A CF-es betegek között a verejték klorid emelkedett volt (> 60 mmol/L) (107 [90-120 mmol/L]) nyolc beteg kivételével, akik határértéket mutattak (30-60 mmol/L). Ugyanakkor minden bevont CF-es betegben mindkét allélon detektálható volt a *CFTR* gén variánsai. A fő mutáció típusok aránya a következőképpen alakult: a gyermek populációban 43 beteg (55,8%) mutatott p.Phe508del/p.Phe508del variánst, 26 főnél (33,8%) p.Phe508del/egyéb mutációt írtak el és 8 beteg (10,4%) egyik allélon sem mutatott p.Phe508del variánst (pl. p.Gly542X/p.Arg347Pro). A felnőtt CF-es betegek között 24 beteg (42,1%) mutatott p.Phe508del/p.Phe508del variánst, 26 fő (45,6%) p.Phe508del/egyéb mutáció pozitív volt és 7 beteg (12,3%) egyik allélján sem volt p.Phe508del (pl. p.Arg553X/p.Gly551Asp). A szérum CRP szintek emelkedettek voltak (referencia tartomány: $< 4,6$ mg/L) a súlyos klinikai státuszban lévő fiatal CF-es betegekben (n=29), az összes felnőtt CF-es betegben (n=57) és a két nem CF-es kontroll csoportban (n=76+18) (7. táblázat). Krónikus bakteriális kolonizációt a CF-es gyermekcsoportban 54 esetben (70,1%) mutattak ki, míg a felnőtt CF-es betegek mindegyikét (100%) érintette. Hasnyálmirigy elégtelenség (CF-es gyermekcsoport: 70 fő

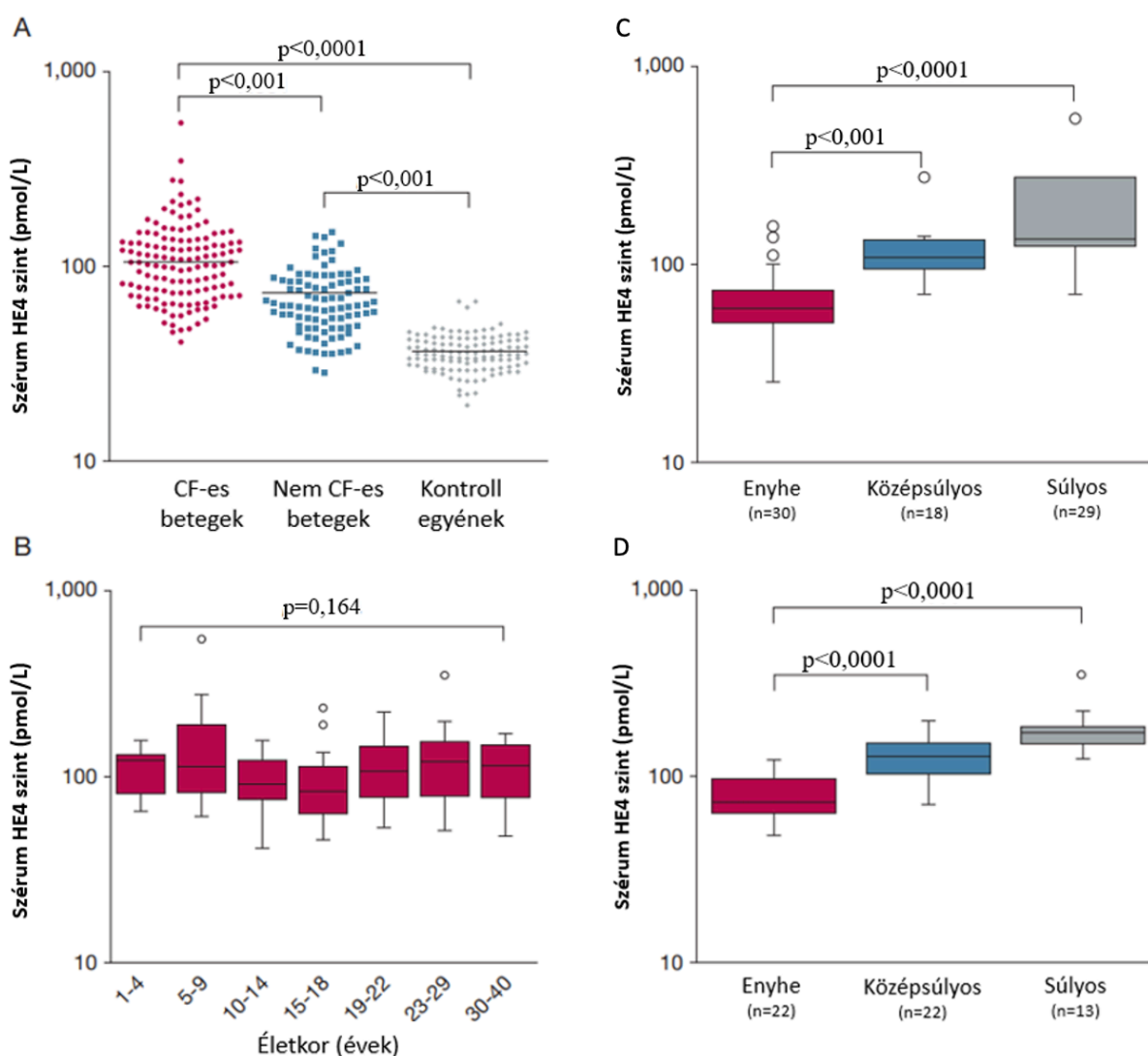
(90,9%), felnőtt CF-es kohorsz: 46 fő (80,7%) és CF-hez társuló diabetes mellitus (CF-es gyermekcsoport: 8 fő, 10,4%, felnőtt CF-es kohorsz: 20 fő, 35,1%) eltérő arányban volt diagnosztizálva a két CF-es populációban.

Betegcsoportok	Életkor (év)	Nem (férfi/nő)	Szérum HE4 (pmol/L)	Szérum CRP (mg/L)
Gyermek CF-es (n=77)	11 (7-17)	37/40	99,5 (73,1-128,9)	5,3 (2,0-9,3)
Felnőtt CF-es (n=57)	25 (21-29)	26/31	115,7 (77,8-148,7)	14,3 (12,9-27,0)
Gyermek nem CF-es tüdőbeteg (n=76)	6 (3-14)	32/44	63,9 (54,3-83,4)	7,5 (1,1-18,2)
Felnőtt nem CF-es tüdőbeteg (n=18)	26 (23-38)	7/11	59,2 (41,0-88,6)	8,9 (3,1-15,7)
Gyermek kontroll (n=77)	13 (10-15)	33/44	36,3 (31,1-43,4)	NM
Felnőtt kontroll (n=40)	25 (23-28)	17/23	33,8 (29,8-38,6)	NM

7. táblázat Az első CF-es vizsgálatorozatunkban a szérum HE4 mérésekhez bevont betegpopulációk legfontosabb demográfiai és laboratóriumi paramétereit. Összesen 77 CF-es magyar gyermeket vontunk be párhuzamosan 57 CF-es cseh felnőtt beteggel, valamint 94 nem CF-es tüdőbeteg és 117 kontroll személy mintáját dolgoztuk fel. A CRP a CF-es gyermekek körében csak a súlyos állapotban lévők esetén került lemerésre (n=29). Az adatok medián (interkvartilis tartomány) formában vannak kifejezve. Rövidítés: NM: nem mért paraméter.

A szérum HE4 szintek szignifikánsan emelkedettek voltak ($P < 0,0001$) mind a CF-es gyermekekben (99,5 [73,1-128,9] pmol/L), mind a felnőtt betegekben (115,7 [77,8-148,7] pmol/L) a saját egészséges kontroll csoportjukhoz viszonyítva (**63/A. ábra**). Kiemelendő, hogy a 29 súlyos állapotú CF-es gyermek mintáiban még ennél is magasabb HE4 koncentrációk voltak mérhetőek (134,9 [124,5-275,0] pmol/L). A felnőtt CF-es csoportban 13 beteget minősítettek súlyos állapotúnak, akikben a HE4 érték a többi beteghez képest szintén jóval magasabb volt (170,8 [146,8-182,9] pmol/L). A betegek neme (fiúk: 95,4 [75,0-128,5] vs. lányok: 101,5 [72,6-129,6] pmol/L, $P = 0,881$), illetve a CFTR genotípus szintén nem befolyásolta a mért HE4 szinteket: p.Phe508del/p.Phe508del pozitív betegek: 99,5 [73,0-127,5] pmol/L vs p.Phe508del/egyéb mutációt mutató betegek: 94,6 [66,4-127,8] pmol/L). A klinikai kontrollok mellett olyan betegpopulációban is megvizsgáltuk a HE4 szérumszinteket, akik súlyos, nem CF-es tüdőbetegségben szenvedtek, úgy, mint akut bronchitis, asztma, pneumónia vagy nem CF-eredetű bronchiectasia. Ezekben az esetekben is a kontroll csoporthoz képest magasabb HE4 szinteket találtunk ($P < 0,001$), amik jóval elmaradnak a CF-ben tapasztaltaktól ($P < 0,001$) (**63/A. ábra**). Amikor a nem CF-es tüdőbeteg gyermekeket a betegségük szerint

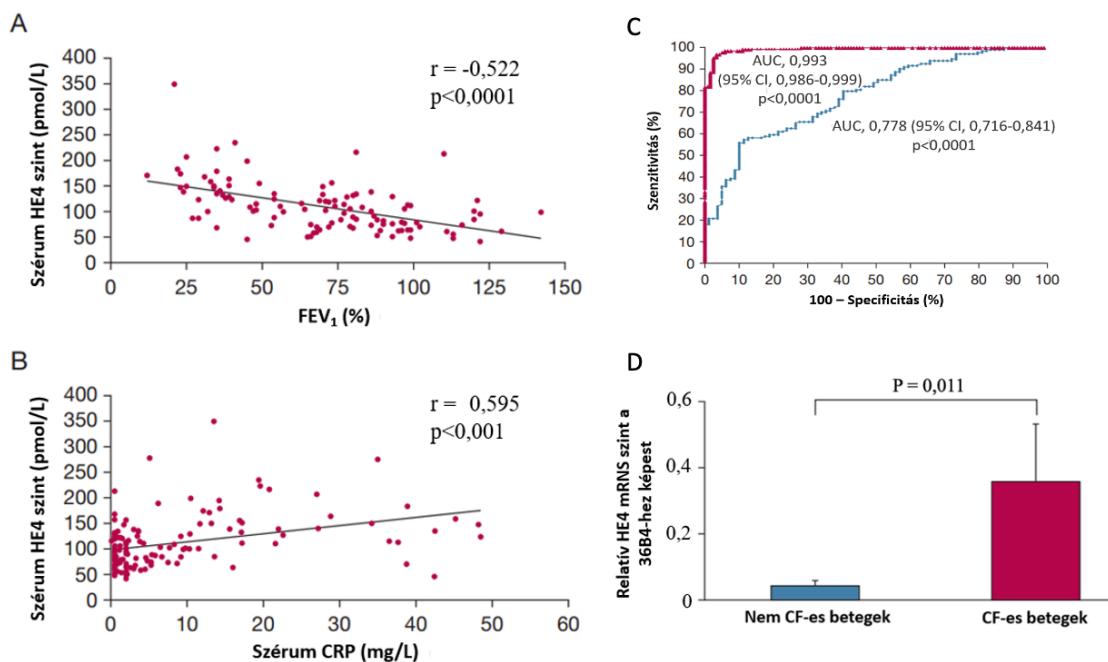
tovább bontottuk, a súlyos bronchitis vagy asztma (63,7 [54,1-79,5] pmol/L; n=42), illetve a pneumónia (57,8 [51,2-74,2] pmol/L; n=22) jelenlétében megegyező HE4 szinteket mértünk. Hasonlóan, a 18 nem CF-es felnőtt tüdőbeteg (pl. bronchiectasia, COPD) mintáiban mérsékelten emelkedett HE4 szintek voltak jellemzőek (59,2 [41,1-88,6] pmol/L), míg a CFTR mutációt csak hordozók teljesen normál HE4 szintekkel bírtak (33,9 [30,1-43,9] pmol/L; n=12). Külön megvizsgáltuk az életkor hatását a szérums HE4-re, ami nem befolyásolta azt érdemben (P=0,164) (**63/B. ábra**).



63. ábra Szérums HE4 szintek CF-es és nem CF-es tüdőbetegekben, valamint kontroll személyekben, továbbá a HE4 szint korrelációja a betegség súlyosságával külön a gyermek és a felnőtt CF-es betegcsoportban. (A) Szignifikánsan magasabb HE4 koncentrációkat mértünk a CF-es betegekben mindkét kontroll csoporthoz képest. Az egyes alcsoportok közötti összehasonlítást Mann-Whitney U teszttel végeztük. (B) Az életkor önmagában nem befolyásolta a HE4 koncentrációkat CF-ben. (C) A szérums HE4 koncentrációk a gyermek (C) és a felnőtt (D) betegpopulációban fokozatosan emelkedtek a klinikai állapot súlyosbodásával párhuzamosan. Az adatokat medián érték (interkvartilis tartomány) formában ábrázoltuk.

A HE4 biomarker diagnosztikai értékének további vizsgálata céljából megnéztük, hogy van-e összefüggés a HE4 szintek és a CF-es tüdőfolyamatok súlyossága között. Szignifikánsan magasabb HE4 szinteket mértünk már a mérsékelt súlyos CF-es gyermekekben is (108,0 [95,8-133] pmol/L) az enyhe tüneteket mutató betegekhez képest (60,8 [50,7-73,8] pmol/L). Ugyanakkor még magasabb HE4 szinteket mutattak a súlyos állapotú betegek (134,9 [124,5-275,0] pmol/L; $P < 0,0001$ összehasonlítva az enyhe esetekkel) (**63/C. ábra**). A CF-es felnőtt betegek körében szintén szorosan összefüggött a HE4 szint a betegség súlyosságával: enyhe esetekben alacsonyabb (72,5 [64,1-94,8] pmol/L), a közepsúlyos betegekben már jóval magasabb (126,5 [104,3-148,3] pmol/L), míg a súlyos csoportban pedig nagyon magas (170,8 [146,8-182,9] pmol/L; $P < 0,0001$ összehasonlítva az enyhe esetekkel) HE4 értékeket találtunk (**63/D. ábra**). Ugyanakkor a közepsúlyos és a súlyos CF-es betegek között is volt szignifikáns különbség ($P < 0,05$) a szérums HE4-ben mindkét életkorcsoportban.

Statisztikailag tovább értékeltük Spearman teszttel, hogy a szérums HE4 koncentráció és a tüdőbetegség súlyosságát érzékenyen jelző légzésfunkciós paraméter, a FEV₁ % értékei között van-e kimutatható összefüggés a teljes betegpopulációban. Szignifikáns, fordított korrelációt találtunk a HE4 eredmények és a FEV₁ % értékek között (Spearman rho: -0,522; $P < 0,0001$) (**64/A. ábra**). Ezek az eredmények is azt sugallják, hogy minél rosszabb pulmonális állapotban van egy CF-es beteg, annál több HE4 termelődhet, amely idővel bejutva a keringésbe, mérhetővé válik a perifériás vérmintában.



64. ábra A szérumban HE4 összefüggésének vizsgálata CF-ben a FEV₁ %-os értékekkel (A) és a szérumban CRP szintekkel (B), valamint a szérumban HE4 ROC-görbe analízise a CF tüdőbetegség elkülönítésére más tüdőbetegségektől és az egészségesektől (C), végül a HE4 mRNS expresszió kvantálása CF-es és nem CF-es hörgőnyálkahártya biopsziás mintákban (D). Mindkét korreláció Spearman teszttel történt. A ROC görbék alapján a 49,3 pmol/L cut-off érték mellett a HE4 alkalmas a CF-es betegeket az egészséges személyektől, míg 98,4 pmol/L cut-off értéknél a CF-et az egyéb tüdőbetegségektől elkülöníteni. RNS izolálását követően RT-qPCR-t használtunk a HE4/WFDC2 mRNS kvantálására, referenciagénként a 36B4-t használtuk (n=3 minta/csoport).

Megvizsgáltuk továbbá, hogy a HE4 változásai és az emelkedett CRP szintek között van-e bármi kapcsolat azokban a CF-es betegekben, akiknél elérhető volt az utóbbi adat is. Szignifikáns, pozitív összefüggés volt a szérumban HE4 és a CRP értékek között a súlyos állapotú CF-es gyermekekben, valamint az összes felnőtt CF-es betegben (Spearman $r = 0,595$; $P < 0,001$) (**64/B. ábra**). Ezzel szemben a nem CF-es tüdőbetegekben nem találtunk összefüggést a két paraméter között. Eredményeink alapján a szérumban HE4 egy új érzékeny légúti gyulladási paraméterként viselkedhet a CRP mellett.

A pozitív mikrobiológiai eredményeket mutató CF-es gyermekek esetén szignifikánsan magasabb HE4 szinteket mértünk a bakteriális kolonizáció nélküli esetekhez képest (106,5 [75,8-133,3] vs. 78,3 [61,4-96,9] pmol/L; $P = 0,001$). Ugyanakkor az összes beválogatott CF-es felnőtt betegben kolonizációt kimutattak, ezért az ő esetükben nem tudtuk vizsgálni a HE4 és a krónikus bakteriális kolonizáció közötti kapcsolatot. A CF-asszociált diabetes mellitus jelenléte vagy hiánya nem befolyásolta a HE4 szintet (DM: 102,6 [97,8-121,5] pmol/L szemben a nem diabeteses betegekkel: 91,1 [64,7-128,9] pmol/L; $P = 0,645$). Ezzel szemben, a hasnyálmirigy elégtelenség a felnőtt CF-es betegekben jóval magasabb HE4 koncentrációkkal társult az egészséges hasnyálmirigy funkcióval bíró betegekhez képest (122,2 [84,1-149,6] vs. 96,8 [73,8-108,8] pmol/L; $P = 0,037$) (nem ábrázolt eredmények).

A HE4 potenciális diagnosztikai szerepét a teljes CF-es betegpopulációban lemerített eredmények felhasználásával ROC-görbe analízissel vizsgáltuk. A HE4-re vonatkozó AUC érték 0,993 volt (95% CI, 0,986-0,999; $P < 0,0001$) 49,3 pmol/L-es küszöb érték mellett, így ez a biomarker a CF-es betegek és az egészséges kontroll személyek hatékony elkülönítésére alkalmas. A HE4 szenzitivitása, specificitása, pozitív prediktív értéke (PPV) és negatív prediktív értéke (NPV) a következő értékeket mutatta: 97,0%, 96,6%, 66,5% és 96,6%. Amennyiben a CF-es és nem CF-es tüdőbetegségek elkülönítése céljából határoztuk meg az AUC értéket a HE4-re vonatkozóan, az értéke valamennyivel alacsonyabbnak bizonyult (AUC: 0,778, 95% CI, 0,716-0,841; $P < 0,0001$), 56,0%-os szenzitivitással, viszont magas, 90,0%-os specificitással 98,4 pmol/L-es küszöb érték mellett (PPV: 64,6%, NPV: 90,4%) (**64/C. ábra**).

Megvizsgáltuk ebben a vizsgálsorozatban végül azt is, hogy a verejték klorid eredmények mutattak-e bármilyen összefüggést a HE4 értékekkel. Pozitív, de mérsékelt összefüggést találtunk a szérum HE4 szintek és a verejték klorid értékek között (Spearman $r=0,345$; $P=0,005$). Külön értékeltük a HE4 szinteket azokban a betegekben ($n=8$), akiknek „szürkezónába” esett a verejték klorid mérés eredménye (30-60 mmol/L). A CF-es betegek ezen alcsoportjában is hasonlóan magas HE4 eredményeket kaptunk (100,9 [88,2-115,0] pmol/L), mint az egész CF-es kohorszban. Ugyanakkor az alacsony esetszám miatt további vizsgálatok szükségesek a „borderline” verejték klorid értékekkel bíró CF-es betegek körében.

Első megközelítésben kíváncsiak voltunk arra is, hogy a CF-es betegekben mért magas HE4 szintek háttérében milyen celluláris folyamat állhat. Feltételeztük, hogy a masszív gyulladás hatására a HE4 fehérje a károsodott légúti epithelsejtekből nagy mennyiségben szabadul fel, vagy a hörgőnyálkahártya nagy mennyiségben termeli a légutakban. Ennek igazolására három CF-es betegről hörgőnyálkahártya biopsziás mintát vettünk bronchoscoopia során, míg három másik nem CF-es bronchitises beteg kontrollként szolgált. A CF-es betegekben származó mintákban szignifikánsan emelkedett HE4 mRNS szintet találtunk a nem CF-es kontroll betegekhez képest ($P=0,011$). Eredményeink alapján az emelkedett szérum HE4 koncentráció potenciális forrása a légúti epithélium CF-ben (**64/D. ábra**).

Miután feltételeztük, hogy a CF-es betegek köpetmintájában - a vérmintákhoz képest - még magasabb HE4 koncentráció mérhető a fehérje pulmonális eredete miatt, ezért 6 CF-es betegről spontán módon ürített köpetmintát vettünk és kontrollként egyrészt nem CF-es (bronchitis) tüdőbetegről, másrészt normál kontrolloktól gyűjtöttünk mintákat, amikhez a homogenizálása érdekében DTT-t adtunk. A szérum eredményekhez hasonlóan a CF-es köpetben is jóval magasabb HE4 koncentrációkat mértünk a nem CF-es, de különösen az egészséges kontroll mintákhoz képest (**8. táblázat**). Amikor a szérum és a köpet HE4 koncentrációk között vizsgáltuk a korrelációt Spearman teszttel, szignifikáns pozitív összefüggést találtunk ($r=0,9429$; $P=0,0167$). Ezek az eredmények is alátámasztják, hogy a fokozott HE4 termelés és/vagy felszabadulás a tüdőből származhat CF-ben és mindez emelkedett szérumkoncentrációhoz vezet.

Paraméterek	CF-es betegek (n=6)	Nem CF-es tüdőbetegek (n=8)	Kontrollok (n=5)
Életkor (év)	11 (7-12)	14 (6-17)	12 (11-15)
Köpet HE4 (pmol/L)	60059 (25427-105250)	13219 (9160-31709)	7330 (4963-7946)
Szérum CRP (mg/L)	6,3 (1,0-8,3)	12,9 (0,9-29,6)	NM

8. táblázat A HE4 koncentráció meghatározás CF-es köpetminták felülúszójában szemben nem CF-es tüdőbetegségben szenvedő és kontroll személyek mintáival. A gyulladásos klinikai állapot felmérése érdekében a mintavétel időpontjában levett szérummintából CRP meghatározás is történt, kivétel a normál kontrollokat. Az eredményeket medián érték (interkvartilis tartomány) formában fejeztük ki. NM: nem mért adatok.

5.6.2 Kezelés előtti és alatti plazma HE4 szintek mérése CFTR-specifikus ivacaftor, illetve lumacaftor/ivacaftor kezelés alatt álló CF-es betegek klinikai állapotának nyomon követésére a légzés- és vesefunkció figyelembevétele mellett

Az eltérő CFTR mutációk jelenlétében alkalmazható különböző CFTR specifikus gyógyszerek elterjedésével felmerült bennünk, hogy megvizsgáljuk, hogy vajon a HE4 képes-e követni a kezelés hatékonyságát és továbbra is szoros összefüggést mutat a légzésfunkció változásával. Mivel jelenleg is nagyon költséges gyógyszermolekulákról van szó, ezért is van olyan nagy klinikai jelentősége annak, hogy egy relatíve olcsó biomarkert használjunk, amely könnyen lemérhető, reprodukálható és érzékenyen követi a klinikai státusz változását.

A fenti célok elérése érdekében a második CF-es vizsgálatunkba a mintákat három, egymástól független CF centrumból igényeltük meg nemzetközi kollaborációs együttműködés keretén belül. A mintákat eredetük szerint három alcsoportba soroltuk (1. csoport: az amerikai GOAL-vizsgálat [238]; 2. csoport: ausztrál klinikai esetek [266]; és 3. csoport: az ír CORK-vizsgálat [267] (**9. táblázat**), amelyekből elsőként határoztunk meg a plazma HE4 koncentrációkat (**65/A-C. ábra**).

Paraméterek	1. csoport (n=29)	2. csoport (n=12)	3. csoport (n=19)
Életkor (év), medián (IQR)	15,6 (9,0-22,6)	27,0 (23,2-32,0)	19,5 (9,2-28,0)
Nemek aránya (nő/férfi)	17/12	4/8	5/14
Nem-G551D-CFTR allél előfordulása			
I. osztály, n (%)	0	0	1 (5)
II. osztály, n (%)	22 (76)	9 (75)	18 (95)
III. osztály, n (%)	0	0	0
IV. osztály, n (%)	3 (10)	1 (8)	0
V. osztály, n (%)	2 (7)	0	0
Ismeretlen, n (%)	2 (7)	2 (16)	0
Vérvételi időpontok (hónap)	0., 1., 3., 6.	0., 1., 2.	0., 3.
Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$), medián (IQR)	59 (29-68)	78 (59-103)	54 (36-69)
Hasnyálmirigy elégtelenség, n (%)	20 (69)	9 (75)	19 (100)
CF-hez társuló diabetes mellitus, n (%)	0 (0)	1 (8)	4 (21)

9. táblázat A három különböző CF-es betegkohorsz legfontosabb demográfiai és klinikai paraméterei az ivacaftor kezelés hatékonyságának plazma HE4 méréssel történt vizsgálatában. Az 1. csoportban szereplő betegek korábban az amerikai GOAL klinikai tanulmányban vettek részt, a 2. csoportban lévő mintákat egy ausztrál klinikai munkacsoporttól kaptuk, míg a 3. csoportba sorolt betegek az ír CORK tanulmányban szerepeltek. Az adatok medián (interkvartilis tartomány) formában vannak kifejezve. Rövidítések: IQR: interkvartilis tartomány.

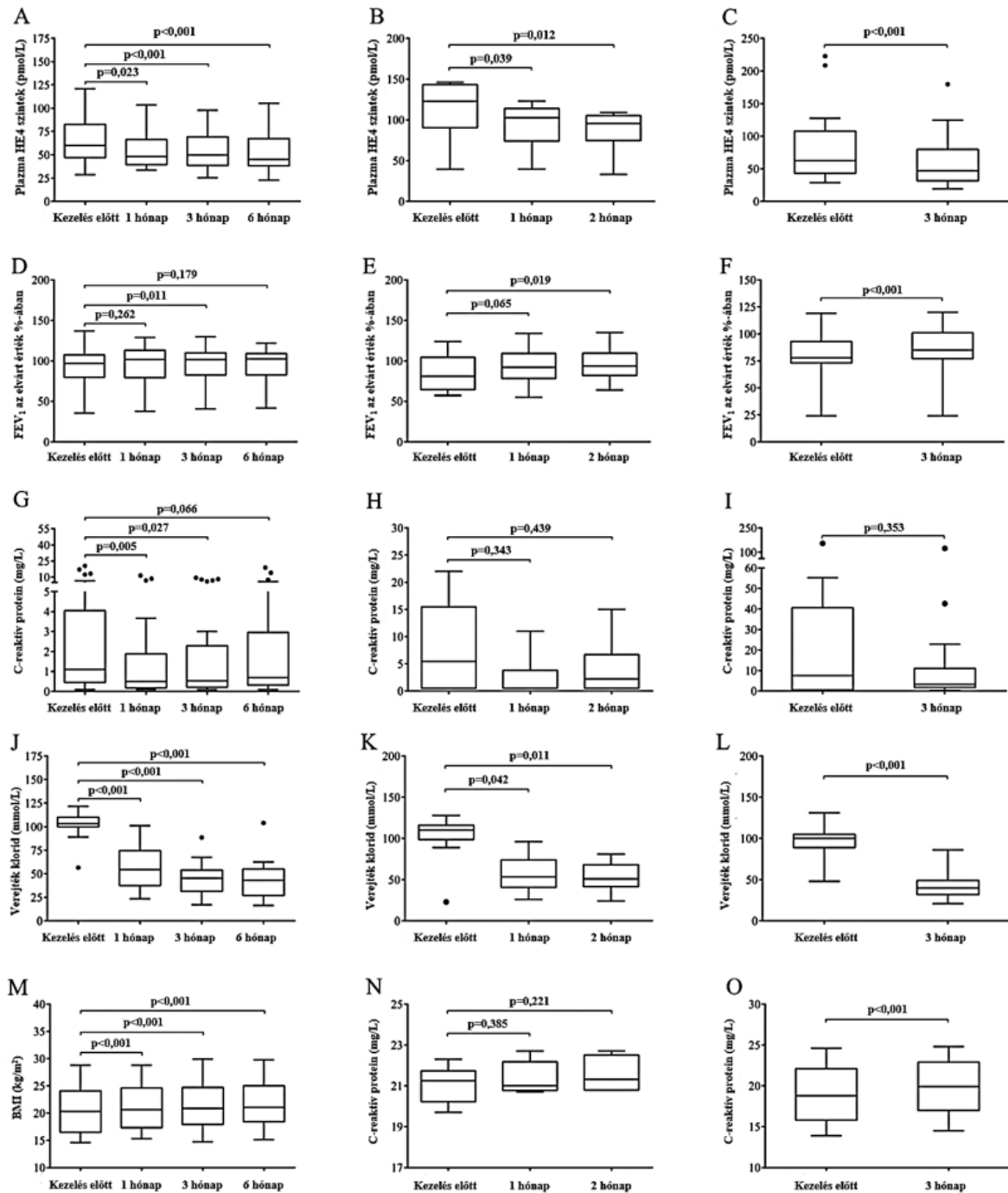
Az *ivacaftor* kezelésben részesült betegek minimum egy, a III. osztályba tartozó p.Gly551Asp *CFTR* variánst mutattak. A FEV₁ %-os érték alapján az egyes betegcsoportok eltérő súlyosságú tüdőbetegségben szenvedtek a mintavétel időpontjában (**65/D-F. ábra**). Négy kivétellel az összes többi CF-es beteg verejték klorid szintje > 60 mmol/L volt (**65/J-L. ábra**). A 2. csoportba tartozó ausztrál betegek idősebbek voltak (P<0,010) a másik két csoportban lévő betegekhez képest. Kiemelendő, hogy egyik beteg sem szenvedett beszűkült vesefunkció miatt a szérum kreatinin eredményei alapján (**9. táblázat**), ami befolyásolhatta volna a HE4 értékeket, mint ahogyan ezt egy korábbi, nem CF-es betegek vizsgálatával foglalkozó tanulmányunkban már kimutattuk (**10. táblázat**).

Paraméterek	CKD2 betegek (n=55)	CKD3 betegek (n=34)	CKD4-5 betegek (n=24)	Kontrollok (n=68)	P- érték
HE4 (pmol/L)	76,9 (55,5-101,8)	205,9 (136,4-300,2)	646,9 (369,4-952,3)	44,1 (35,9-52,0)	<0,0001
Kreatinin (μmol/L)	72,5 (59,3-78,0)	107,0 (100,0-117,0)	254,0 (182,0-378,0)	59,0 (52,5-63,5)	<0,0001
eGFR (mL/perc/1,73 m ²)	80,0 (70,5-83,8)	39,0 (37,0-42,0)	16,0 (10,8-22,5)	≥90	<0,001

10. táblázat A szérumban HE4 szint összehasonlítása különböző súlyosságú veseelégtelenségben (CKD2-5) szenvedő, nem tumoros betegekben. Elemeztük retrospektív módon rutin diagnosztikai vizsgálatra érkezett felnőttek, nem CF-es betegek szérumban HE4 koncentrációját egy 12 hónapos időszak alatt.

A CF-es betegek mindegyike magasabb HE4 koncentrációt mutatott az előzőekben bemutatott normál HE4 értékekhez képest az *ivacaftor* kezelés megkezdése előtt. Az 1. csoportban a plazma HE4 szintek elkezdtek szignifikánsan csökkenni az *ivacaftor* kezelés kezdése után már 1 hónappal (60,1 [48,2-77,4] vs. 48,2 [40,8-66,2] pmol/L, P=0,023), és a követés végéig jóval a kiindulási érték alatt maradtak (45,1 [38,4-64,2] pmol/L; P<0,001 a kiindulási szinthez viszonyítva) (**65/A. ábra**), párhuzamosan a légzésfunkció (**65/D. ábra**) és a BMI (**65/M. ábra**) finom javulásával és a verejték klorid koncentráció drasztikus csökkenésével (**65/J. ábra**).

Az alacsonyabb FEV₁ %-os értékekkel (medián [min-max] 81,0 [36-137] %), ezáltal rosszabb légzésfunkcióval jellemezhető 2. vizsgálati csoportban a kezelés előtti HE4 szintek - a vártak megfelelően - magasabbak voltak (**65/B. ábra**). Az *ivacaftor* kezelés eredményeképpen szignifikáns HE4 szint csökkenést láttunk ebben a csoportban is 1 hónap múlva (120,6 [90,9-143,2] vs. 99,1 [85,1-113,9] pmol/L; P=0,039), amit további csökkenés kísért 2. hónap után (95,6 [90,1-101,9] pmol/L; P=0,012 a kiindulási szinthez képest) (**65/B. ábra**). Ezzel szemben a 3. vizsgálati csoportban a betegek FEV₁ %-os értékei szélesebb tartományban mozogtak (medián [min-max] 78 [24-119] %) (**65/F. ábra**) a másik két csoporthoz képest, és a kiindulási HE4 koncentrációk az 1. csoport értékeihez képest magasabbak voltak (62,7 [45,4-101,2] pmol/L) (**65/C. ábra**). Ebben a csoportban néhány beteg HE4 koncentrációja kiugróan magas volt: az egyik betegnek 208,5 pmol/L HE4 szintet mértünk igen alacsony, 24%-os FEV₁ %-os érték mellett az *ivacaftor* kezelés előtt. Ugyanakkor a 3 hónapos kezelés hatására a HE4 ebben a csoportban is szignifikánsan csökkent (47,3 [35,8-71,1] pmol/L; P<0,001) (**65/C. ábra**).

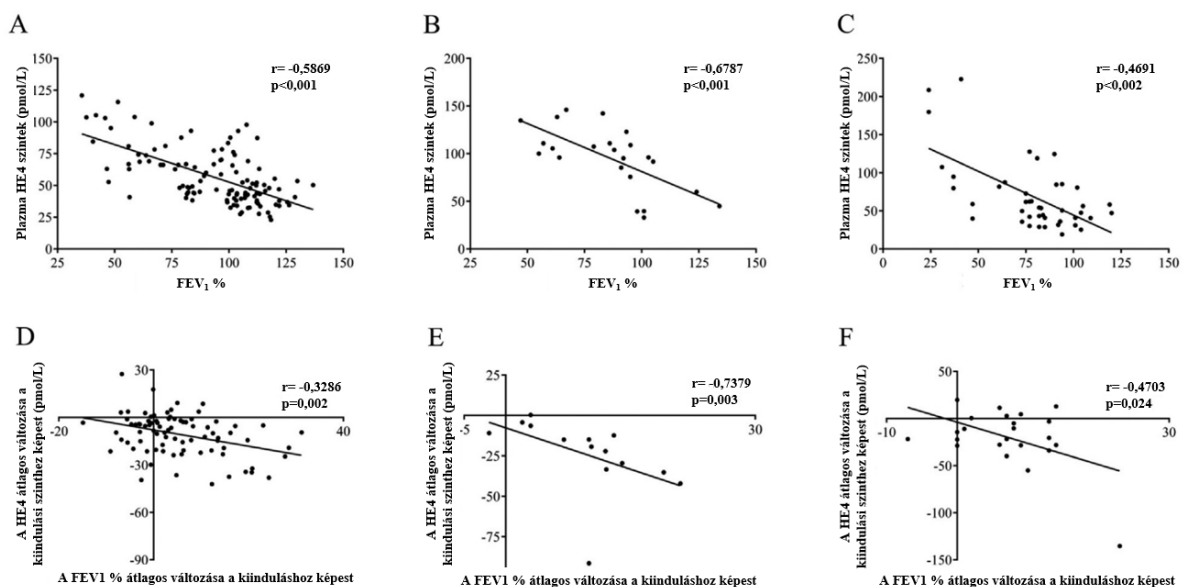


65. ábra A plazma HE4 szintek követése három független CF-es betegcsoportban *ivacaftor* kezelés előtt és alatt. A HE4 szint változását követtük mindhárom kohorszban a CFTR-specifikus kezelés hatására (A-C). A HE4 eredményeket a javuló légzésfunkciós paraméter (FEV₁ %) (D-F), a csak kis mértékű változást mutató CRP (G-I), a csökkenő verejték klorid (J-L) és a kissé emelkedő BMI (M-O) értékek alapján értékeltük. Az adatokat medián érték (interkvartilis tartomány) formában fejeztük ki.

Minden esetben meghatároztuk a CRP szintet is. Megjegyzendő, hogy az egyes csoportokban az esetek 26%-ában (1. csoport), 15%-ában (2. csoport) és 22%-ában (3. csoport) a CRP mérhetetlenül alacsony volt (< 0,5 mg/L). Ráadásul az összes CRP eredmény csak 15%-a, 25%-a, illetve 58%-a volt nem normális értékű (5,0 mg/L feletti). Az *ivacaftor* használata

alatt az átlag CRP értékek csökkentek (**65/G-I. ábra**), bár ezek a változások statisztikailag nem voltak szignifikánsak. A kiindulási verejték klorid szintek 4 eset kivételével a diagnosztikus határérték (60 mmol/L) felett voltak, és gyors, drasztikus csökkenésük volt látható már az első kontroll vizsgálat alkalmával, ami még tovább csökkent a vizsgálati periódus alatt ($P < 0,001$ és $P = 0,011$) (**65/J-L. ábra**). A klinikai vizsgálatok során a betegek tápláltsági állapotát is monitorozták BMI-vel, amely értékeket szintén a rendelkezésünkre bocsátottak és javulást regisztráltak (**65/M-O. ábra**).

A HE4 szintek abszolút és delta (átlagos változás értéke a kiindulási szinthez képest) értékeit a FEV₁ % abszolút és delta értékeivel korreláltattuk külön minden betegcsoportban. Szignifikáns, fordított korreláció volt megfigyelhető a HE4 és FEV₁ % abszolút értékei között (**66/A-C. ábra**). Hasonlóan, a delta HE4 eredmények is eltérő r érték mellett, de szignifikáns negatív korrelációt mutattak a delta FEV₁ % értékekkel az egyes betegcsoportokban (**66/D-F. ábra**). Amikor az összes betegcsoport adatait egybevettük, továbbra is szignifikáns, reverz összefüggés volt detektálható az abszolút és delta HE4 és FEV₁ % értékek között ($r = -0,5376$; $P < 0,001$ és $r = -0,3285$; $P < 0,001$), különösen az abszolút értékek esetén.



66. ábra Korrelációs analízisek a plazma HE4 és a FEV₁ % abszolút értékei (A-C), valamint a delta HE4 és delta FEV₁ % (D-F) eredményei között Spearman teszttel. Szignifikáns, fordított összefüggés volt kimutatható a HE4 és a FEV₁ %, valamint a delta HE4 és a delta FEV₁ % értékek között.

Többszörös regressziós analízissel megvizsgáltuk, hogy a plazma HE4 szintek független összefüggést mutatnak-e a légzésfunkciós és laboratóriumi eredményekkel. A HE4 független

módon összefüggött a FEV₁ % értékekkel mind az *ivacaftor* kezelés előtt ($\beta = -0,57$; $P=0,019$) és a kezelés alatt ($\beta = -0,47$; $P=0,043$), ugyanakkor a HE4 és a CRP között független kapcsolat csak a gyógyszeres kezelés előtt volt igazolható ($\beta=0,19$; $P=0,004$) (nem ábrázolt eredmények). Mindezen eredmények alátámasztják az előzetes adatainkat, miszerint a vérben mérhető HE4 szintje jól követi a légzésfunkció változást és a gyulladáshoz kapcsolódó körülmények alakulását CF-ben.

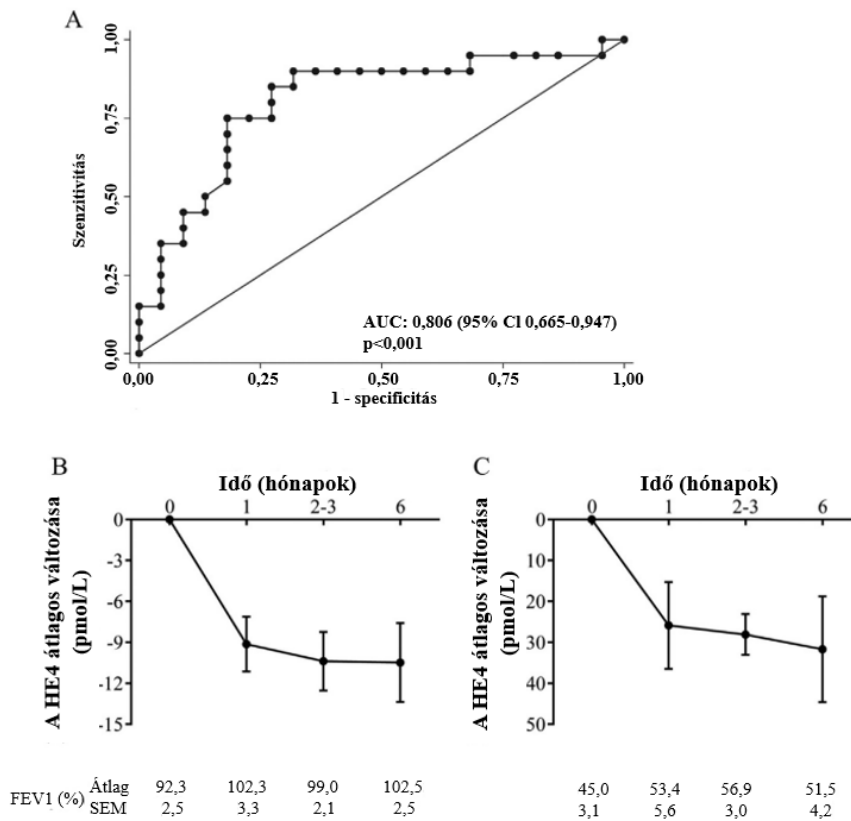
Kíváncsiak voltunk ezt követően arra, hogy a plazma HE4 szint képes-e előre jelezni a tüdőbetegség javulását *ivacaftor* kezelés alatt. Ennek céljából az összevont betegpopulációban kiszámoltuk a kiindulási HE4 koncentráció diszkriminatív erejét 7%-os FEV₁ % javulásnál. Ez a FEV₁ % a vizsgálatba bevont CF-es betegek által mutatott átlag értékből adódott. Párhuzamos analízissel összehasonlítottuk a CRP-vel és a verejték klorid eredményekkel. Azt tapasztaltuk, hogy a HE4 fehérje magas 0,722 AUC érték mellett képes előre jelezni a kezelés hatásosságát olyan hatékonyan, mint a jelenleg használatban lévő verejték klorid teszt (**11. táblázat**). Az alábbi értékekkel tudtuk tovább karakterizálni a három paramétert: HE4: 74% szenzitivitás, 79% specificitás (cut-off érték: 62,7 pmol/L); CRP: 67% szenzitivitás, 68% specificitás (cut-off érték: 7,6 mg/L); verejtékklorid: 80% szenzitivitás, 83% specificitás (cut-off érték: 99 mmol/L).

Csoportok	Plazma HE4 (pmol/L)	Plazma CRP (mg/L)	Verejték klorid (mmol/L)
1. csoport	0,733 (95% CI 0,522-0,945), P=0,031	0,656 (95% CI 0,414-0,897), P=0,207	0,644 (95% CI 0,470-0,818), P=0,075
2. csoport	0,832 (95% CI 0,541-1,000), P=0,025	0,803 (95% CI 0,626-1,000), P=0,002	0,945 (95% CI 0,790-1,000), P=0,001
3. csoport	0,629 (95% CI 0,379-0,880), P=0,310	0,614 (95% CI 0,352-0,878), P=0,393	0,703 (95% CI 0,556-0,886), P=0,033
Összes beteg	0,733 (95% CI 0,581-0,863), P=0,029	0,691 (95% CI 0,492-0,886), P=0,113	0,752 (95% CI 0,589-0,913), P=0,016

11. táblázat A ROC-görbe analízis eredménye a plazma HE4, valamint a CRP és a verejték klorid prediktív értékének meghatározására a 7%-os FEV₁ % változás előrejelzésében. A kiértékeléseket megcsináltuk mind a három alcsoportban, illetve a kohorszok összesítése után. A HE4 biomarker hasonlóan jól szerepelt, mint a jelenleg használt, de sok esetben nehezen kivitelezhető és reprodukálható verejték teszt a várható légzésfunkciós javulás előrejelzésekor.

Az egyes betegcsoportokból származó delta HE4 értékeket először - a légzésfunkció súlyosságától függetlenül - a korai (1-2. hónap) és a késői (3-6. hónap) követési időszakból összeraktuk, hogy kiszámoljuk a HE4 prediktív hatását a FEV₁ % átlagos 7%-os javulása szempontjából. A kezelés első 2 hónapja alatti adatok alapján – az előzőekben bemutatott abszolút HE4-re kapott AUC értékhez képest – a delta HE4 még magasabb AUC értéket mutatott (0,806 [95% CI 0,665-0,947]; P<0,001) (**67/A. ábra**) 81%-os szenzitivitással és 89%-os specificitással -15,8 pmol/L-es cut-off értéknél. Ezzel szemben a 3-6 hónapos periódusban kevésbé volt prediktív tulajdonságú, némileg kisebb AUC értéket jelezve (AUC: 0,648 [95% CI 0,523-0,773]; P=0,020). Az egész vizsgálati populációban -12,1 pmol/L-es átlagos HE4 szint csökkenését tapasztaltuk 2 hónapos kezelést követően (ami megfelel egy 13,9%-os csökkenési rátának), míg 3-6 hónap elteltével érdekes módon nem következett be további jelentős csökkenés (-14,4 pmol/L, -15,6%). Ez a magyarázata annak, hogy a HE4 rövid távon mutatott kellően magas AUC értéket, míg a csökkenés ütemének „plató fázisa” miatt az AUC érték már valamelyest gyengébb volt 3-6. hónapnál. Ez a tendencia egyébként hasonlít a verejték klorid szintek változásának üteméhez (**65/J-L. ábra**).

A betegeket ezt követően 2 súlyossági alcsoportba osztottuk annak érdekében, hogy vizsgáljuk a HE4 változás mértékét a tüdőbetegség előrehaladottságának függvényében: az enyhe csoportba a 70% és afeletti FEV₁ %-os értéket (**67/B. ábra**), a középsúlyos/súlyos csoportba a < 70%-ot mutató betegeket soroltuk (**67/C. ábra**). Mindkét alcsoportban csökkenő tendencia mutatkozott a HE4 szintekben az *ivacaftor* kezelésnek köszönhetően, azonban a HE4 jóval nagyobb mértékű csökkenését láttuk az alacsonyabb FEV₁ %-os értékek esetén (**67/C. ábra**). Úgy tűnik, hogy a HE4 nagyobb mértékben jelezheti a légzésfunkció javulását középsúlyos/súlyos CF-ben az enyhe betegséghez képest. Fenti adatok alapján a plazma HE4 szintje elsősorban középsúlyos/súlyos CF-es tüdőbetegségben csökken jobban az *ivacaftor* kezelés alatt, és a változás mértéke jobban jelzi a tüdőbetegség javulását különösen a kezelés első 2 hónapjában.



67. ábra ROC-görbe analízis a plazma HE4 változásra kiszámítva a CF-es tüdőbetegség javulásának előrejelzésében *ivacaftor* kezelés alatt. ROC-görbe analízist végeztünk a delta HE4 értékekre vonatkozóan 1-2 hónappal a kezelés megkezdését követően 7%-os átlag FEV₁ % csökkenés esetén (A). A HE4 változás mértékének további vizsgálata olyan egyéneknél, akik FEV₁ % értéke $\geq 70\%$ volt (B), illetve olyan esetekben, amikor a FEV₁ % < 70% (C). Jóval nagyobb mértékű HE4 változást tapasztaltunk a légzésfunkció javulásával egyidejűleg azoknál a CF-es betegeknél, akiknek alacsonyabb volt a FEV₁ %-os értékük. Az adatokat átlag \pm SEM értékben fejeztük ki.

Még tovább vizsgáltuk a plazma HE4-t mint követéses markert a harmadik CF-es klinikai vizsgálatunkban egy olyan válogatott betegcsoporton belül, akik a p.Phe508del *CFTR* variánsra homozigóták voltak (n=68), *lumacaftor/ivacaftor* (LUM/IVA, Orkambi®) kezelésben részesültek és korábban részt vettek a PROSPECT-tanulmányban [268]. A fagyasztott mintákat a CFFT Biorepository biobankból kaptuk. Hat különböző időpontban levett plazma mintákban vizsgáltuk meg a HE4 koncentrációját: kezelés előtt, illetve a LUM/IVA kezelés megindítása után 1, 3, 6 és 12 hónap után (**12. táblázat**).

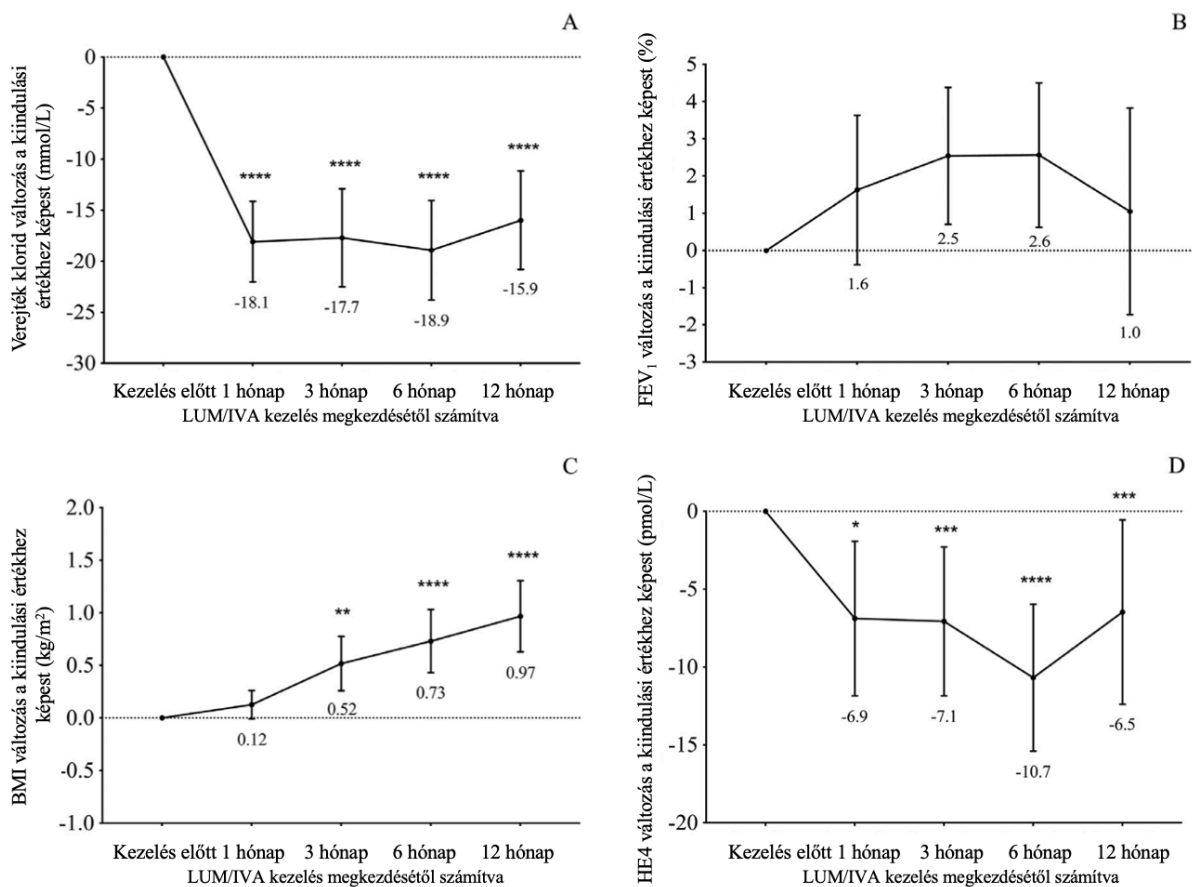
Paraméterek	Összes CF (n=68)	Gyermek CF (n=38)	Felnőtt CF (n=30)
Életkor (év)	16 (6-29)	13 (6-17)	24 (18-29)
Nem (nő/férfi), n	39/29	23/15	16/14
Kezelés előtti verejték klorid (mmol/L) (medián, min-max)	100,8 (64,0-116,0)	102, (76,5-114,0)	100,0 (64,0-116,0)
Kiindulási FEV ₁ (%) (medián, min-max)	80,8 (27,6-94,7)	86,5 (34,7-94,7)	84,7 (27,6-92,8)
Kezelés előtti BMI (kg/m ²) (medián, min-max)	20,1 (14,1-28,5)	18,5 (14,1-26,6)	21,2 (16,2-28,8)
Delta FEV ₁ 6 hónap után (%) (átlag, 95% CI)	2,6 (0,6-4,5)	3,7 (0,9-6,5)	1,1 (-1,6-3,7)
Légzésfunkció javulása a 6. hónapra (igen/nem), n	34/34	20/18	14/16
Kezelésre reagálók/nem reagálók (igen/nem), n	26/42	15/23	11/19
<i>P. aeruginosa</i> pozitivitás (igen/nem), n	32/36	13/25	19/11

12. táblázat A PROSPECT-tanulmányból a vizsgálatunkba bevont 68 CF-es beteg legfontosabb demográfiai és laboratóriumi paramétereit. A kezelés után 6 hónappal a légzésfunkciós javulás a delta FEV₁ % alapján ($\geq 2,6\%$) került megállapításra, míg a kezelésre reagálók/nem reagálók arányát az átlagos FEV₁ % változás alapján ($\geq 5\%$) határoztuk meg szintén 6 hónap után. Rövidítések: FEV₁ %: erőltetett kilégzési térfogat 1 másodperc alatt az elvárt érték %-ában kifejezve, BMI: body mass index.

Az általunk lemerített HE4 szinteket összevetettük a tanulmányban korábban meghatározott verejték klorid eredményekkel, a FEV₁ %-os értékekkel, és a BMI-vel (**68/A-D. ábra**). A *lumacaftor/ivacaftor* kezelés hatására szignifikánsan csökkent a verejték klorid koncentrációja már 1 hónap után is (-18,1 mmol/L, 95% CI, -22,3–-15,0), ami végig stabilan megmaradt a vizsgált időszakban (6. hónapban -18,9 mmol/L, 95% CI, -24,5–-14,8) (**68/A. ábra**). A légzésfunkció is kimutatható javulást mutatott, ami 6 hónap után mutatta a legnagyobb változást (2,6%, 95% CI, 0,6–4,5), ugyanakkor valamelyest csökkent ez az érték a későbbiekben (**68/B. ábra**). Mindezt jól követte a plazma HE4 szint változása, ami a 6. hónapban volt a legalacsonyabb (-10,7 pmol/L, 95% CI, -15,4–-5,9) (**68/D. ábra**). Ezekkel szemben a BMI lassú, de fokozatos emelkedést, javulást mutatott (6 hónap után 0,73 kg/m² (95% CI, 0,42–0,98) (**68/C. ábra**). Ezen eredmények alapján megállapítottuk, hogy hasonlóan

az *ivacaftor* kezelés mellett tapasztalt HE4 koncentráció változásokhoz, a HE4 megbízhatóan követte a klinikai állapot javulását a *lumacaftor/ivacaftor* kezelés alatt is.

A HE4 biomarkerként való tesztelésére azért is szükség volt, mert érdekes módon csak gyenge korrelációt találtunk Spearman teszttel a FEV₁ % és a verejték klorid koncentráció változása között akár a kezelés után 1 hónappal ($r=0,0595$; $P=0,6403$), akár 6 hónap után ($r=0,0148$, $P=0,9117$). Emiatt gondoltuk fontosnak egy olyan új paraméter alkalmazását és validálását, amely a légzésfunkcióval szoros összefüggést mutatva jól követi a beteg klinikai állapotát a LUM/IVA kezelés során.

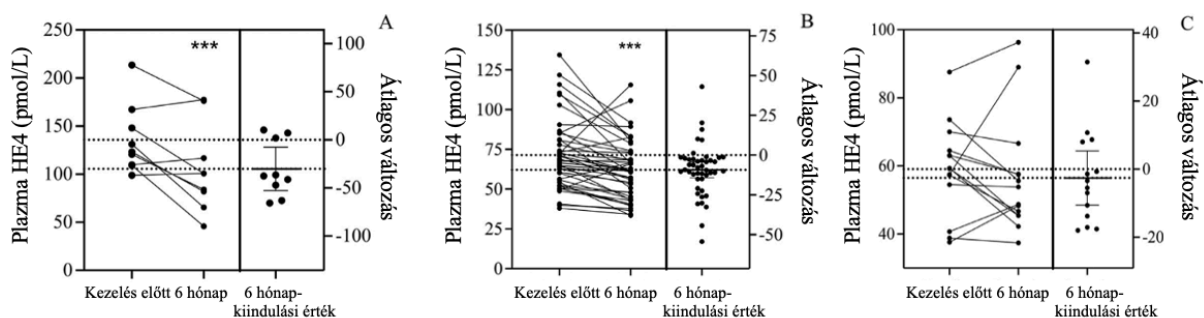


68. ábra A kiindulási értékhez képest a verejték klorid (A), a FEV₁ % (B), a BMI (C) és a plazma HE4 szintek (D) változása egy CF-es betegcsoportban *lumacaftor/ivacaftor* kezelés alatt. A vizsgált paraméterek a kezelés előtt és 1, 3, 6 és 12 hónap után levett mintákból kerültek meghatározásra. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$, **** $P<0,0001$ a kiindulási értékekhez viszonyítva.

Külön korrelációs teszttel megvizsgáltuk a HE4 értékek és a FEV₁ %-os értékek közötti kapcsolatot, és az előző klinikai vizsgálatunkban tapasztalt szoros összefüggést találtuk a mind a kiindulási ($r= -0,5661$, $P<0,0001$), mind a 6 hónap után mért eredmények között ($r= -0,5294$, $P<0,0001$) Spearman teszttel. De nemcsak az abszolút értékeket, hanem a 6. hónapban mért eredményekből számolt delta értékeket is külön korreláltattuk egymással, és a változások

különösen erős összefüggést mutattak egymással gyermekkorban ($r = -0,7053$, $P < 0,0001$) összevetve az egész betegpopulációban mért értékkel ($r = -0,5297$, $P < 0,0001$) (nem ábrázolt adatok). Ezen statisztikai adatok is alátámasztották az eddigiekben megfigyelt reprodukálható korrelációt a HE4 szint és a spirometriai adatok között.

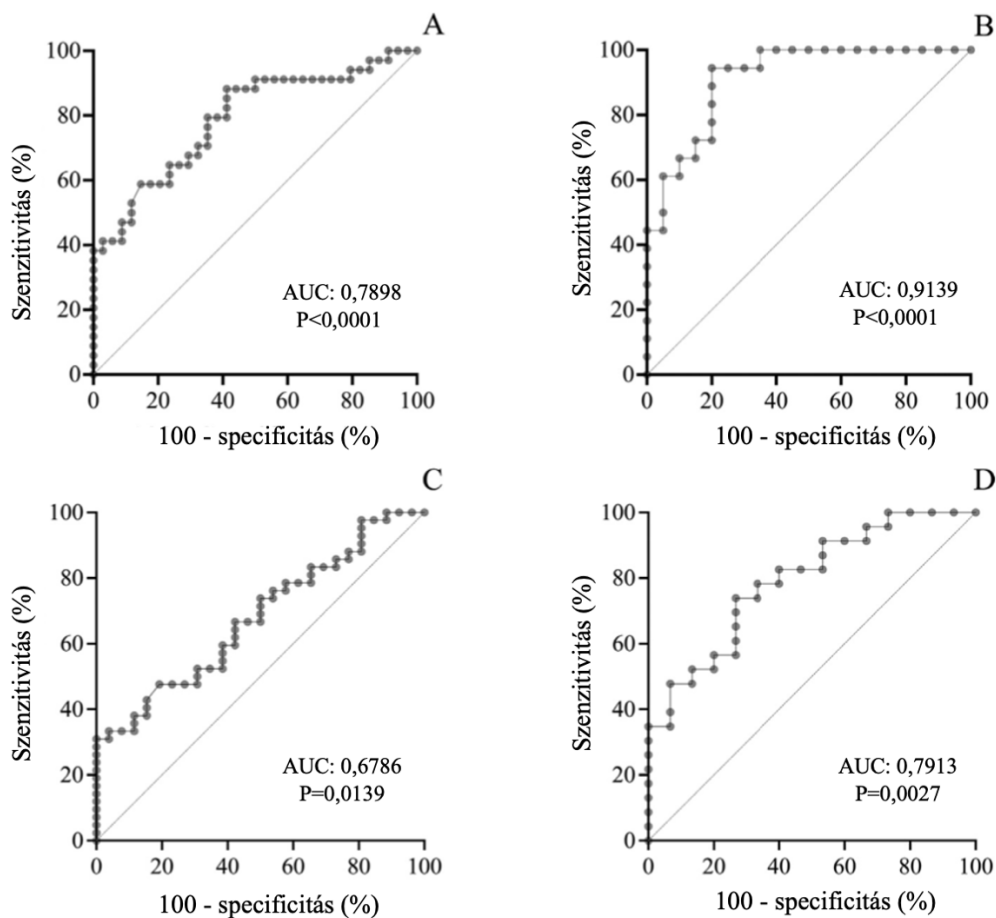
A HE4 adatok további analízise érdekében úgy is vizsgáldtunk, hogy a kezelés előtti FEV₁ %-os értékek ($< 50\%$, $50\text{--}89\%$, és $\geq 90\%$) alapján három alcsoportba soroltuk a betegeket, hasonlóan, mint a PROSPECT-tanulmány összes résztvevőinél Sagel és munkatársai tették [268]. Azoknál a betegeknél találtuk a legmagasabb HE4 értékeket és egyben a legnagyobb mértékű HE4 szint változást, akiknél a legrosszabb kiindulási FEV₁ %-ot mutatták (69/A. ábra), szemben azokkal, akiknek csak enyhébb kezelés előtti légzésfunkciós eltérésük volt (69/B-C. ábra). Ezek az eredmények is azt jelzik, hogy minél rosszabb a kezeletlen klinikai állapota egy betegnek, annál magasabb HE4 koncentrációt mérhetünk, viszont a megfelelő terápia hatására annál erőteljesebb HE4 koncentráció csökkenést mérhetünk.



69. ábra A plazma HE4 koncentrációk átlagos változása a kiindulási FEV₁ % értéke alapján három alcsoportra osztott CF-es betegekben ($< 50\%$) (A), $50\text{--}89\%$ (B), és $\geq 90\%$ (C). Az egyes ábrarészek bal oldalán a LUM/IVA kezelés előtti és 6 hónap után mért abszolút plazma HE4 értékek vannak feltüntetve és összekötve egymással, míg a jobb oldalon ezen értékekből kiszámolt átlagos változás mértéke van jelölve. Az értékeket átlag (95% CI) formában ábrázoltuk. *** $P < 0,001$ a kiindulási értékhez képest.

ROC-görbe analízissel értékeltük a delta HE4 érték alkalmazhatóságát kétféle mértékű légzésfunkció javulás előrejelzésében: ha 2,6%-os vagy 5%-os ez a változás a terápia megkezdése utáni 6. hónapra. Az előző értéket azért választottuk, mert ez a válogatott betegpopuláció ekkora mértékű változást mutatott félév után, míg a másik cut-off értéket annak eldöntésére használták [268], hogy a vizsgált személy jól reagált a kezelésre vagy sem. Jelentős AUC értéket mértünk a delta HE4-re (0,7898 [95% CI 0,6823–0,8972], $P < 0,0001$), ami a -10,7 pmol/L cut-off érték mellett 62%-os szenzitivitást és 79%-os specificitást mutatott a teljes betegpopulációra (70/A. ábra). Ennél még magasabb AUC értéket mutattunk ki a CF-es gyermekek esetén (0,9139 [95% CI 0,8268–1,0000], $P < 0,0001$), és ugyanazt a küszöb értéket

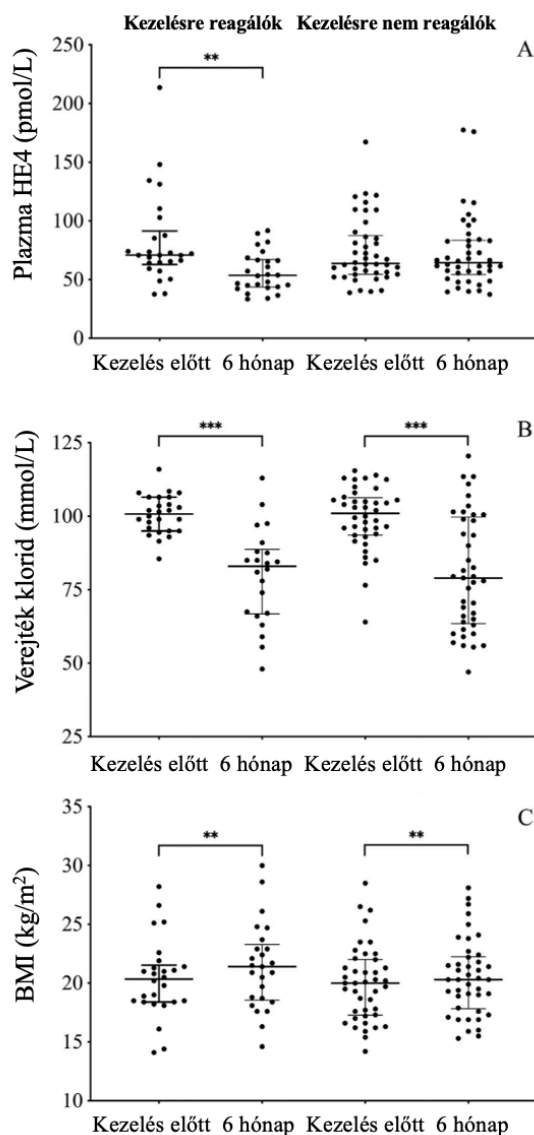
használva a szenzitivitás (80%) és a specificitás (83%) sokkal magasabb volt (70/B. ábra). Amikor a delta HE4-re kiszámítottuk mindezt az 5%-os delta FEV₁ % esetén, az AUC érték 0,6786 (95% CI 0,5523–0,8048), P=0,0139) volt az összes beteg adatait figyelembe véve -11,8 pmol/L küszöbérték mellett 73%-os szenzitivitás és 74%-os specificitás mellett (70/C. ábra). Ezzel szemben, a delta HE4 AUC értéke gyermekkorban 0,7913 (95% CI 0,6481–0,9345), P=0,0027) volt azonos cut-off érték esetén, de csak 50%-os szenzitivitással és 74%-os specificitással (70/D. ábra).



70. ábra A plazma HE4 átlagos változásának ROC-görbe analízise 2,6%-os (A, B) vagy 5%-os delta FEV₁ % esetén (C, D) 6 hónapos LUM/IVA kezelés után. A statisztikai analízist elvégeztük a teljes betegcsoportban (A, C), illetve külön a CF-es gyermekek körében (B, D) ugyanolyan cut-off érték mellett.

Külön értékeltük a legfontosabb laboratóriumi paraméterek változásának szignifikanciáját az alapján, hogy a vizsgált beteg a kezelésre jó választ adott vagy nem. Ehhez megvizsgáltuk a plazma HE4, a verejték klorid és a BMI változását a kezelés előtt és 6 hónap után mért eredmények alapján (71/A-C. ábra). Érdekes módon, a verejték klorid és a BMI szignifikáns változást mutatott a kezelés hatására függetlenül attól, hogy valaki „responder”

volt vagy nem jól reagált a kezelésre (71/B-C. ábra), míg a plazma HE4 csak a kezelésre jól válaszoló betegek esetében mutatott szignifikáns eltérést (71/A. ábra), ami megint a HE4 diagnosztikai megbízhatóságát erősíti a klinikai rutinban.



71. ábra A plazma HE4 koncentrációk (A), a verejték klorid (B), és a BMI értékek (C) összehasonlítása kezelés előtt és LUM/IVA kezelés alatt 6 hónappal attól függően, hogy 1) a kezelésre „reagáló” ($\geq 5\%$ delta FEV₁ %), vagy 2) „nem reagáló” betegekről (delta FEV₁ % < 5%) van szó. Szemben a verejték kloriddal és a BMI-vel, a plazma HE4 csak a kezelésre reagáló betegeknél változott jelentős mértékben, jól elkülönítve a terápiás választ mutató és nem mutató betegeket egymástól. Az eredmények medián (interkvartilis tartomány) formában vannak jelölve. **P<0,01, *P<0,001 szemben a kiindulási értékkel.**

Végül logisztikus regressziós analízissel meghatároztuk, hogy a következő paraméterek mennyire hatékonyan tudják előre jelezni a kezelésre adott megfelelő választ: delta HE4, életkor, nem, kiindulási FEV₁ %, verejték klorid, BMI, és *P. aeruginosa* pozitivitás a LUM/IVA

kezelés után 6 hónappal. A delta HE4 (OR: 0,89, 95% CI: 0,82-0,95; P=0,001) és a kezelés előtti FEV₁ % (OR: 1,09, 95% CI: 1,02–1,16; P=0,005) független módon jelezték, ha egy beteg a kezelésre reagált szemben a kezelésre nem jól reagáló betegekkel (nem ábrázolt adatok).

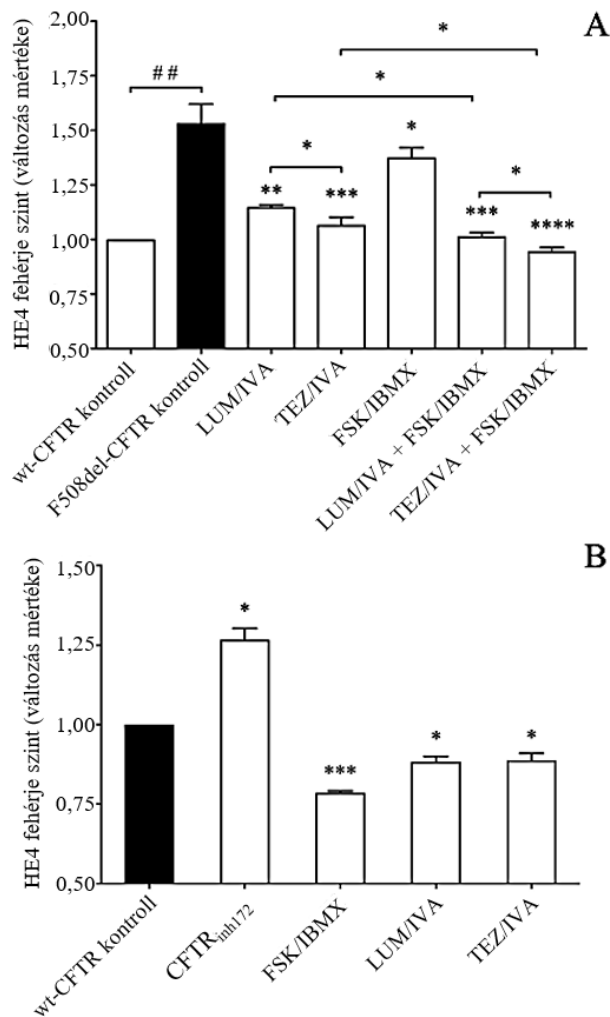
Összefoglalóan megállapítható, a szérum/plazma HE4 koncentrációja jelentős mértékben megemelkedik CF-es tüdőbetegségben, szintje jól korrelál a légzésfunkció változásával és az intrapulmonális gyulladással, valamint hatékonyan képes követni a CFTR-specifikus gyógyszerek hatását.

5.6.3 A F508del-CFTR-t, illetve a wt-CFTR-t expresszáló CF-es bronchoepitheliális sejtekben a HE4 expresszió vizsgálata, továbbá a CFTR-csatorna funkciójának és az NF-κB jelátviteli útvonal direkt hatásának igazolása a HE4 expresszióra CF-ben

Korábban nem volt ismert, hogy a HE4 fehérje túlzott expressziója milyen szabályozás alatt áll CF-ben és a CF-es légúti epithelsejtek ebben mekkora szerepet játszanak, ezért *in vitro* sejt kultúrák kísérletekben vizsgáltuk ennek celluláris folyamatát.

A sejtes kísérletekhez F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejteket tenyésztettünk és kezeltünk, amik kontrolljaként wt-CFTR-t hordozó CFBE 41o⁻ sejteket használtunk. A bazális HE4 koncentráció szignifikánsan magasabb volt a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtek felülúszójában, mint a vad típusú sejtekében (P<0,01) (72/A. ábra). Ebből kiindulva 24 órán keresztül kezeltük a F508del-CFTR pozitív CFBE sejteket kombinált CFTR-specifikus modulátorokkal (LUM/IVA vagy TEZ/IVA) annak érdekében, hogy ezután meghatározzuk a sejtenyészet felülúszójának a HE4 koncentrációt. Azt tapasztaltuk, hogy szignifikánsan csökkent a HE4 koncentrációja mind a LUM/IVA (P<0,01), mind a TEZ/IVA (P<0,001) kezelést követően a (csak DMSO-t tartalmazó) kontroll mintákhoz képest. A csökkenésnek köszönhetően a CF-es sejtekben a HE4 koncentráció megközelítette a vad típusú sejtekben mért értékeket. Érdekesképpen, a TEZ/IVA valamelyest nagyobb mértékű csökkenést okozott a HE4 koncentrációkban a LUM/IVA-hoz képest (P<0,05) (72/A. ábra).

Ezt követően a F508del-CFTR pozitív sejteket kezeltük CFTR-csatorna aktivátorral (FSK/IBMX) önmagában, illetve a fenti CFTR modulátor kombinációkkal együtt. A HE4 protein szintet az FSK/IBMX csökkentette (P<0,05) feltehetően a reziduális CFTR funkció aktiválása révén, míg további csökkenés következett be a kombinált kezelés hatására (P<0,05) a csak CFTR modulátorral kezelt sejtekhez viszonyítva (72/A. ábra).

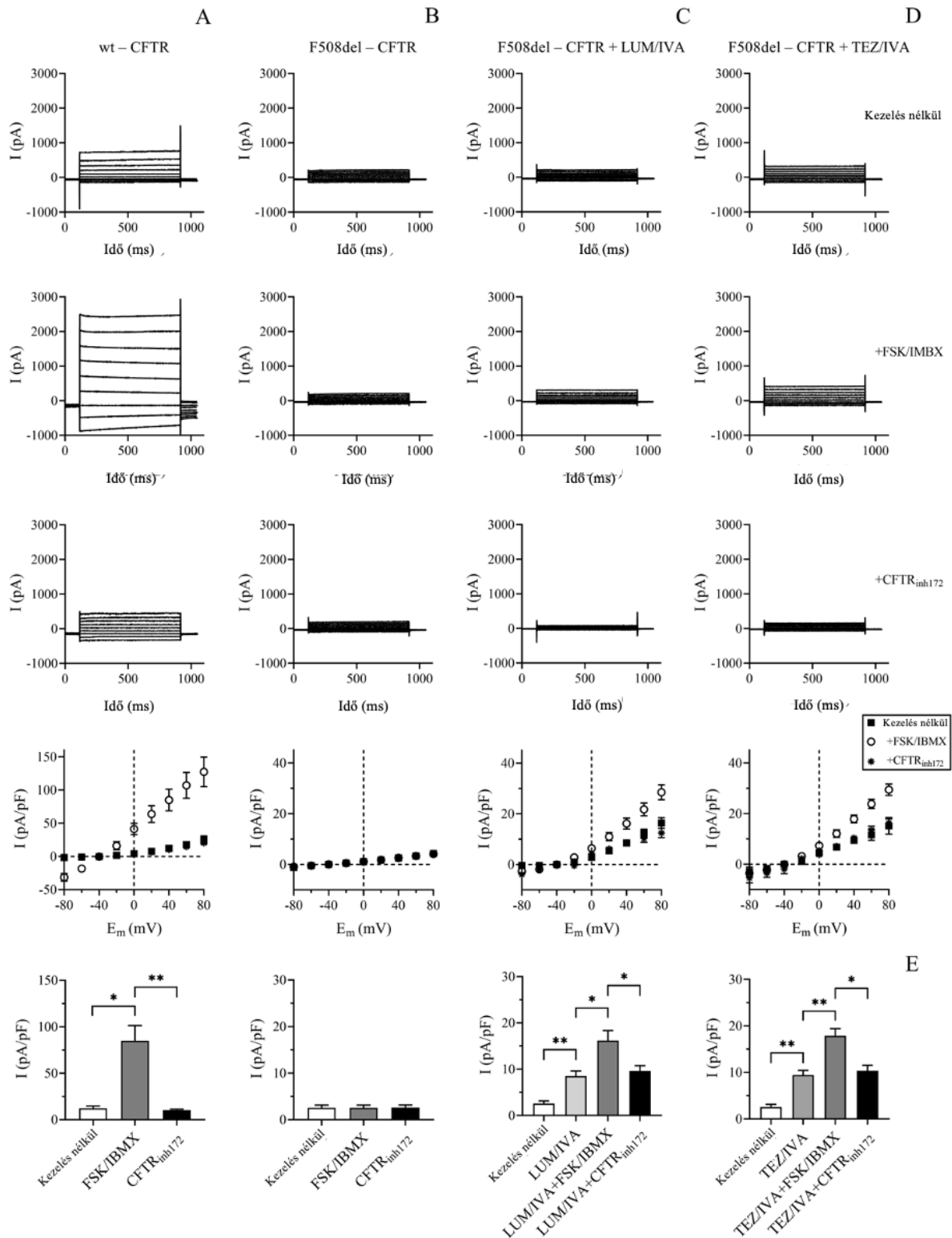


72. ábra A HE4 fehérje koncentráció mérés F508del-CFTR pozitív CFBE (A) és a wt-CFTR CFBE sejtek (B) felülúszójában különböző CFTR funkciót befolyásoló kezelést követően. Mind a LUM/IVA (3/10 μ M), mind a TEZ/IVA (5/10 μ M) jelentősen csökkentette a HE4 szintet 24 óra után. A normál CFTR működésű sejtekben a CFTR aktivátor (FSK/IBMX, 10/100 μ M) csökkentette, míg a CFTR inhibitor (20 μ M) növelte a HE4 mennyiségét. ## $P < 0,01$ vs. wt-CFTR sejt; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, és **** $P < 0,0001$ vs. F508del-CFTR CFBE sejtek DMSO-val.

A kóros CFTR funkció és a sejtenyészet felülúszójában mért HE4 koncentráció közötti összefüggés további bizonyítása céljából a normál CFBE 410^{-} sejtekben specifikus CFTR inhibitor (CFTR^{inh172}) alkalmazásával gátoltuk a CFTR-csatornák működését, amelynek hatására emelkedett a HE4 koncentráció ($P < 0,05$) (72/B. ábra). A FSK/IBMX kezelés hatására ebben a sejttypusban is jelentősen csökkent a HE4 koncentrációja a kontroll mintákhoz képest ($P < 0,001$). Végül a LUM/IVA és a TEZ/IVA kombináció képes volt csökkenteni a HE4 termelődését a vad típusú CFTR-t expresszáló CFBE 410^{-} sejtekben is ($P < 0,05$). Ezek az adatok alátámasztják azt a hipotézisünket, hogy a CFTR funkció képes befolyásolni a HE4 expressziót

a CF-es légúti epithelsejtekben, és a nem egészséges CFTR működés magyarázata lehet az emelkedett szérum/plazma HE4 koncentrációknak (**72/B. ábra**).

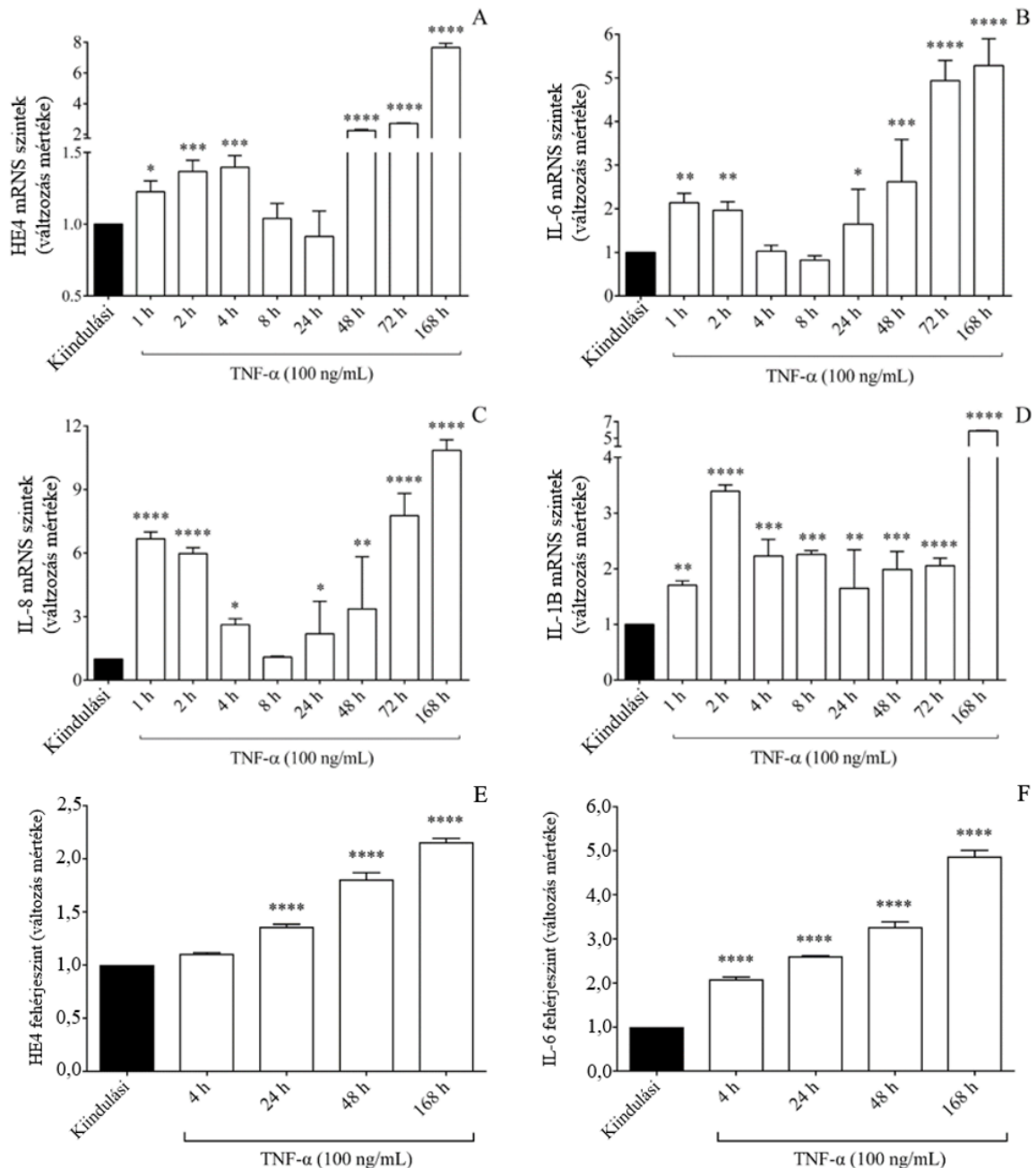
Annak igazolására, hogy a kísérleteinkben alkalmazott CFTR modulátor molekulák valóban javították a CFTR funkciót a CFBE sejtekben *in vitro*, a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtek membránján „egész sejt” patch-clamp technikával megmértük a kloridáram erősségét a CFTR modulátorok kétfajta kombinációjával (LUM/IVA vagy TEZ/IVA) történő 24 órás kezelést követően (**73. ábra**). A vad típusú CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtekben a kloridáram nagy mértékben növelhető volt a FSK/IBMX hatására és egyben gátolható volt a CFTR szelektív inhibitor CFTR_{inh172} alkalmazásával (**73/A. ábra**). Ezzel szemben a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtekben a kezelések minimális ionáramot eredményeztek, amely nem volt érzékeny sem a FSK/IBMX aktivációra, sem a CFTR_{inh172} gátló hatására. Mindkét CFTR modulátor kombináció szignifikánsan növelte a bazális és az FSK/IBMX stimulált kloridáramot az alap kloridáramhoz képest. Emellett a F508del-CFTR CFBE sejtekben a CFTR_{inh172} képes volt csökkenteni az FSK/IBMX által stimulált ionáramot. A 40 mV-os rögzített potenciál mellett mért ionáram erősségi adatok statisztikai analízise igazolta azt, hogy a CFTR modulátorok részlegesen, de jelentős mértékben korrigálták a F508del-CFTR-csatorna funkcióját (**73/B-D. ábra**). A CFTR modulátorok kombinációjával kezelt sejtekben az FSK/IBMX jelenlétében mért ionáram erősség összevethető volt a vad típusú CFTR-t expresszáló sejtek kiindulási helyzetében mért adatokkal (~20 pA/pF), de kisebb mértékű volt az FSK/IBMX által aktivált wt-CFTR-re jellemző értékekhez (~80 pA/pF) képest. A TEZ/IVA kissé nagyobb mértékben növelte a F508del-CFTR klorid ionáramot a LUM/IVA kombinációhoz képest (P=0,560) (**73/E. ábra**). Összegzésképpen, a LUM/IVA és TEZ/IVA alkalmazása részlegesen helyreállította a CFTR funkciót a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtekben, így a HE4 méréssel kapott eredmények specifikusnak mondhatók.



73. ábra A kloridáram helyreállítása a LUM/IVA és TEZ/IVA kezelt F508del-CFTR CFBE 41o⁻ sejtekben. A mért kloridáram erősségének jellegzetes változásai vad típusú CFTR CFBE sejtekben (A), a F508del-CFTR CFBE sejtekben (B), illetve LUM/IVA (3/10 μM) (C) és TEZ/IVA (5/10 μM) kezelt F508del-CFTR CFBE sejtekben (D). Felső képsor: bazális áram; középső képsor: FSK/IBMX (10/100 μM) kezelés után; alsó képsor: FSK/IBMX (10/100 μM) és CFTR inhibitor CFTR_{inh172} (20 μM) együtt. A legalsó ábrarészen a csúcsáram-feszültség (pA/pF) mértékét követtük nem kezelt, csak FSK/IBMX és FSK/IBMX + CFTR_{inh172} jelenlétében. Az oszlopok a pA/pF értékek összesítését ábrázolják a különböző körülmények között kezelt normál és a F508del-CFTR CFBE sejtekben (E). *P<0,05, **P<0,01.

Megvizsgáltuk ezt követően, hogy a *WFDC2/HE4* expresszió fokozható-e gyulladásoos stimulus alkalmazásával *in vitro* körülmények között. Ennek érdekében a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejteket rekombináns TNF- α -val stimuláltuk egy óra hosszától egy hétig terjedő időintervallumban, majd RT-qPCR módszerrel lemértük a HE4 mRNS szintet. A gyulladásoos sejtaktiváció eredményeképpen a HE4 mRNS szint már egy óráso kezelés hatására szignifikánsan emelkedett a nem kezelt mintákhoz képest ($P < 0,05$) és még tovább emelkedett a 4 óráig kezelt mintákban ($P < 0,001$). Meglepetésünkre, a HE4 mRNS szintek 24 óra után visszatértek a kiindulási értékre. Abban az esetben, ha a TNF- α stimulust hosszabb ideig alkalmaztuk (48 órától 1 hétig), még magasabb HE4 mRNS expressziót mértünk a nem stimulált kontroll sejtekhez képest ($P < 0,0001$) (**74/A. ábra**).

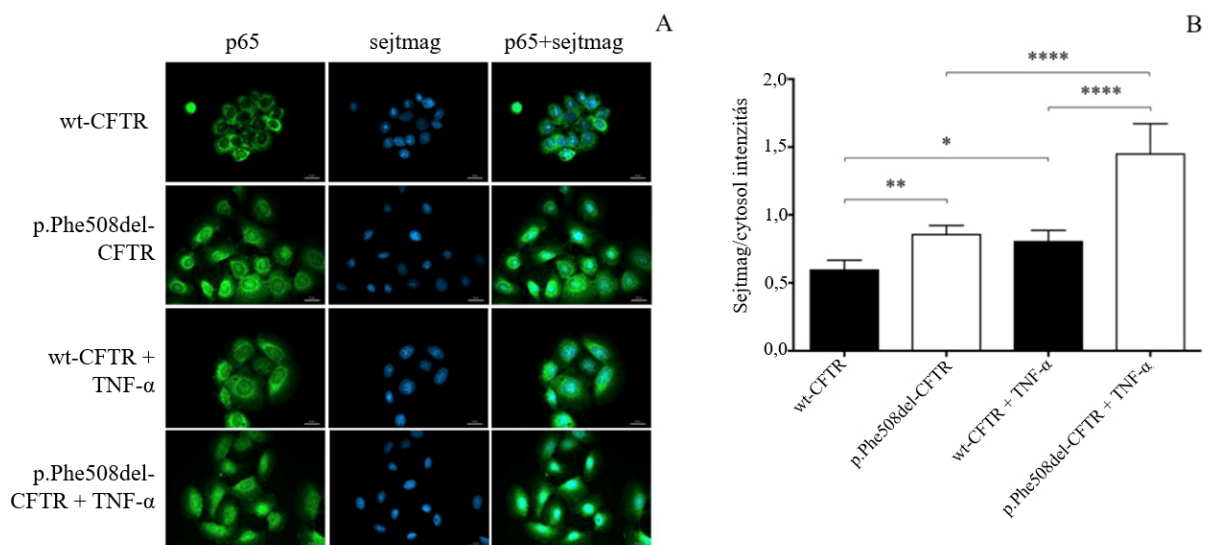
Ugyanezen kísérleti körülmények között a proinflammatórikus citokinek közül az IL6, IL8 és IL1B mRNS szinteket is meghatárooztuk annak érdekében, hogy igazoljuk, hogy a TNF- α stimulus ezen gyulladásoos mediátorok termelődését is ténylegesen fokozta, párhuzamosan a HE4 expresszióval (**74/B-D. ábra**). Az eredmények azt mutatták, hogy az IL6 és IL8 expresszió időbeli változásának mintázata a HE4 mRNS szintek változásához hasonlóan alakult, míg a szintén 1 órán belül megemelkedett IL1B számottevő változás nélkül emelkedett maradt a teljes vizsgálati periódus alatt. Megmértük továbbá a HE4 és IL-6 protein szinteket is a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtek felülúsozójában néhány kiválasztott időpontban (4-168 óra között). Ennek során a HE4 szint 4 óra után jelentősen emelkedett, és 1 héten keresztül fokozatosan tovább nőtt, míg az IL-6 koncentráció az összes kiválasztott mérési időpontban szignifikánsan emelkedett volt (**74/B-D. ábra**). Nemcsak mRNS szinten, hanem fehérje szinten is emelkedő értékeket mutattak a HE4 és az IL-6 koncentrációk a F508del-CFTR CFBE 41o⁻ sejtek felülúsozójában a különböző kezelési időpontokban. Míg a HE4 szint - „elcsúszva” az mRNS szintjétől - csak 24 óra után mutatott szignifikáns növekedést ($P < 0,0001$), addig az IL-6 fehérjeszint mindvégig emelkedett volt, már 4 órát követően is (**74/E-F. ábra**). Ezek az eredmények alátámasztják azt, hogy a fokozott HE4 mRNS szintézis, majd az ebből következő magasabb HE4 fehérje koncentráció a TNF- α hatására a különböző gyulladásoos citokinek emelkedett szintjével együtt következik be a CFBE sejtekben.



74. ábra A HE4, IL6, IL8 és IL1B mRNS szintek, valamint a HE4 és az IL-6 fehérje koncentrációjának kvantálása F508del-CFTR CFBE 410⁻ sejtekben *in vitro* TNF- α stimuláció után. A HE4 mRNS szint 1-4 óra (h) között fokozatosan nőtt a TNF- α (100 ng/mL) hatására, majd 24 órára visszatért a bazális szintre, míg ezt követően még magasabb expressziós szintet mutatott egészen 1 hétig (A). Az IL6 mRNS szint indukálódott már 1–2 óra után, majd 24 óra után további növekedést jelzett (B). Az IL8 expresszió hasonló változást mutatott a HE4-hez és az IL6-hoz (C), míg az IL1B mRNS tartósan emelkedett maradt a teljes aktivációs periódusban (D). A HE4 fehérje szint csak 24 óra után nőtt szignifikánsan (D), míg az IL-6 végig magas maradt (E). Az eredmények átlag \pm SEM formában vannak ábrázolva, (n=4–5 minta/kondíció). *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001 vs. kiindulási állapot.

Az NF- κ B jelátviteli útvonal és a CFTR-csatorna diszfunkció kapcsolatáról korábban már jelentek meg adatok [226]. Jelen kísérleteinkben vizsgáltuk, hogy a kóros CFTR működés által kiváltott fokozott proinflammatorikus aktivitás és az emelkedett HE4 expresszió között

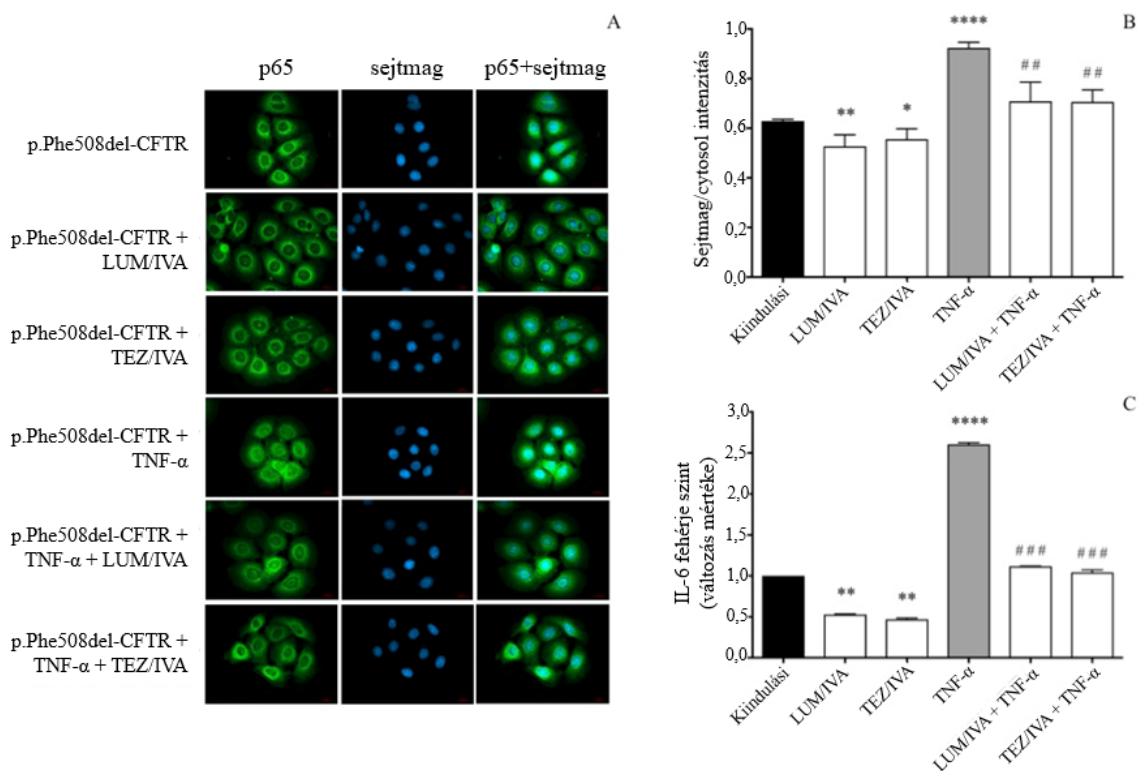
van-e direkt összefüggés. Ennek érdekében két kísérleti megközelítést alkalmaztunk. Először, az NF- κ B útvonal aktivitását értékeltük a p65 alegység nukleáris transzlokációjának vizsgálatával immunfluoreszcens mikroszkóppal. Ez a protein (másik nevén RelA, MIM: 164014) az NF- κ B transzkripció faktor család 5 tagjának az egyike, és az NF- κ B útvonal aktivációjának markereként használatos. A p65 nukleáris transzlokáció mértékét összehasonlítottuk a TNF- α -val kezelt, illetve nem kezelt F508del-CFTR-t, valamint a wt-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtekben (75/A-B. ábra). A F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtek magjában alaphelyzetben is szignifikánsan magasabb p65 pozitivitást találtunk a normális sejtekhez képest ($P < 0,01$). A TNF- α hatására mindkét sejt típusban magasabb nukleáris p65 pozitívitas látszott ($P < 0,05$; $P < 0,0001$), továbbá a p65 transzlokáció tekintetében a normál és a CF-es sejtek közötti különbség még szembetűnőbb volt a kezelést követően ($P < 0,0001$). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a kóros CFTR működéssel bíró CFBE sejtekben alaphelyzetben és gyulladásos stimulus hatására is magasabb a gyulladásos aktivitás szintje az egészséges CFBE sejtekhez képest (75/A-B. ábra).



75. ábra A nukleáris/citoszol p65 pozitívítási arány vizsgálata immunfluoreszcens jelöléssel az NF- κ B útvonal aktivációjának detektálásáért nem stimulált és TNF- α kezelt F508del-CFTR-t vagy wt-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtekben. A bazális p65 transzlokáció a CFTR funkció vonatkozásában került megvizsgálva, amikor normál és F508del-CFTR pozitív CFBE 41o⁻ sejteket 100 ng/ml TNF- α -val vagy PBS kezeltünk 4 óráig. Zöld szín: p65 jelölés; kék: sejtmag. Méretarány: 20 μ m (A). Az NF- κ B jelölődés analízise a mag/citoplazma fluoreszcens intenzitás alapján történt (B). Az adatok átlag \pm SEM formában vannak bemutatva (n=6–7 sejt/kísérlet). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ és **** $P < 0,0001$.

Másodszor, *in vitro* vizsgáltuk a CFTR modulátoroknak a bazális és indukált NF- κ B útvonal aktivitásra gyakorolt hatását ugyanezen CFBE sejt kultúrákban. Ennek érdekében

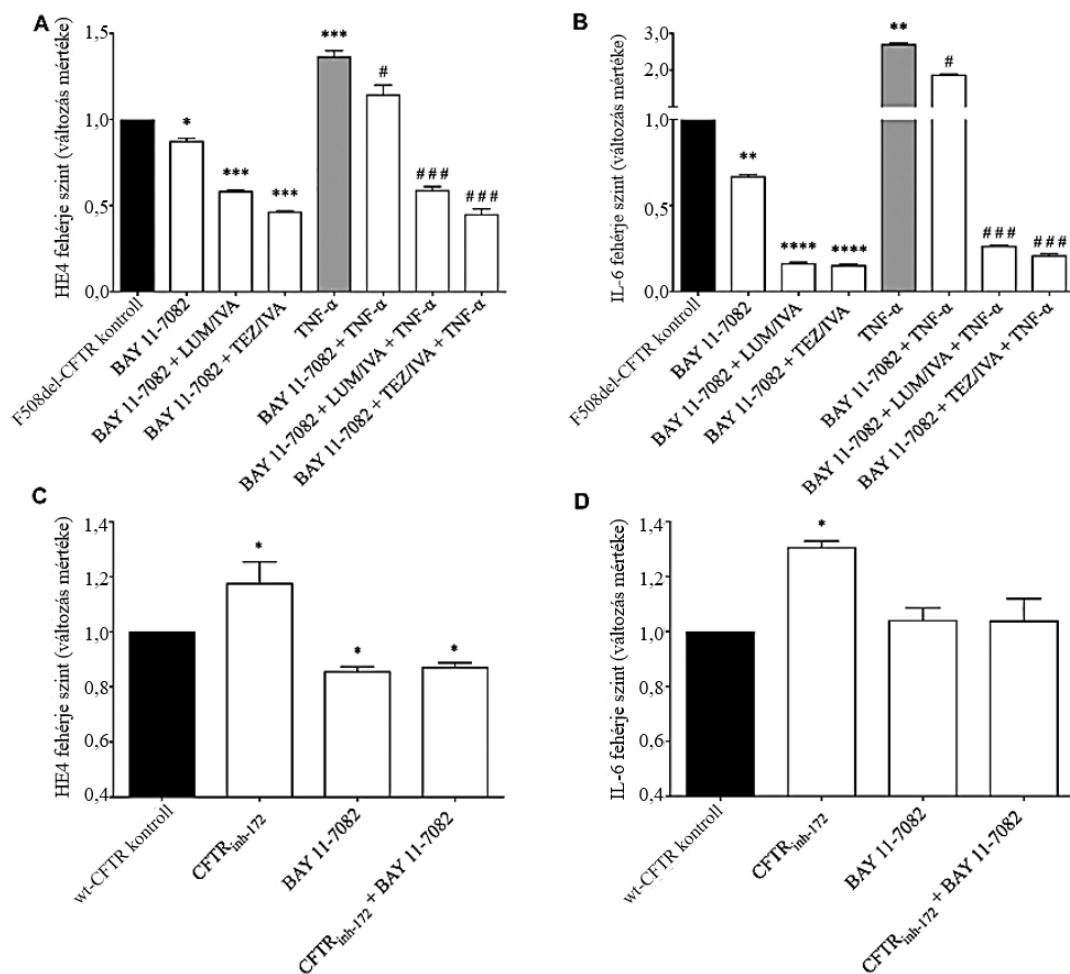
LUM/IVA vagy TEZ/IVA hozzáadása után vizualizáltuk a p65 nukleáris transzlokációját, valamint mértük az IL-6 koncentrációját a sejtek felülűsójában (76. ábra). A CFTR modulátorok lényegesen csökkentették a p65 pozitivitást ($P < 0,05$) nemcsak a nem stimulált F508del-CFTR pozitív CFBE sejtekben, de TNF- α kezelést követően is szignifikáns csökkenés következett be ($P < 0,001$) a kontroll mintákhoz képest (DMSO) (76/A-B. ábra). Ezzel párhuzamosan a korrigált CFTR funkció mellett a F508del-CFTR CFBE sejttényeszetek felülűsójában mért csökkent IL-6 protein szintén igazolták az alkalmazott CFTR modulátorok gyulladáscsökkentő hatását mind a bazális, mind pedig a TNF- α indukált IL-6 expresszió csökkentése révén (76/C. ábra). Eredményeink bizonyítékot adnak arra, hogy az NF- κ B út vonal CFTR diszfunkció következtében kialakult fokozott aktivációja eredményesen csökkenthető LUM/IVA vagy TEZ/IVA gyógyszeres beavatkozással a CFBE sejtkultúrákban.



76. ábra A p65 alegység nukleáris transzlokációjának immunfluoreszcens festése és kvantálása IL-6 protein méréssel együtt CFTR modulátorok jelenlétében nem stimulált, illetve TNF- α kezelt F508del-CFTR CFBE 410⁻ sejtekben. A sejtek LUM/IVA vagy TEZ/IVA vagy DMSO kezelést kaptak 24 óráig, majd 100 ng/mL TNF- α -val vagy PBS-sel stimuláltuk 4 óráig. A reprezentatív mikroszkópos képeken (A) a zöld szín: p65 jelölést; a kék szín: sejtmag festést jelenti. A méretarány: 20 μ m (A). Az NF- κ B jelölődés analízise a mag/citoplazma fluoreszcens intenzitás alapján történt (B). A csökkent IL-6 fehérjeszint jelezte az NF- κ B út vonal aktiválódásának mérséklődését a CFTR modulátorok által (C). Az adatok átlag \pm SEM formában vannak bemutatva. $n=4-5$ sejt/kísérlet. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ és **** $P < 0,0001$ vs. kontroll sejtekkel (DMSO); ### $P < 0,01$ és #### $P < 0,001$ vs. CFBE sejtek TNF- α -val és DMSO-val együtt.

Azt a kérdést is megvizsgáltuk, hogy a TNF- α által indukált HE4 expresszió csökkenthető-e CFTR modulátorok alkalmazásával a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 410⁻ sejtekben. A LUM/IVA vagy TEZ/IVA hozzáadása a sejtekhez csökkent HE4 szinteket eredményezett ($P < 0,001$) a TNF- α által aktivált CFBE sejtek felülúszójában a kontrollhoz (TNF- α -t és DMSO) képest. A FSK/IBMX alkalmazása önmagában a HE4 szintet mérsékelte, és szignifikáns csökkenést eredményezett a TNF- α jelenlétében ($P < 0,05$), míg a LUM/IVA ($P < 0,01$) vagy TEZ/IVA ($P < 0,001$) kombinált alkalmazása a FSK/IBMX-szel együtt még nagyobb mértékben csökkentette a HE4 koncentrációt (nem ábrázolt eredmények). Ezen eredmények bizonyítékul szolgálnak arra, hogy a korrigált CFTR funkciónak egyfajta protektív szerepe van a HE4 expresszió TNF- α indukálta fokozódásával szemben a CFBE sejtekben.

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy vajon a CF-re jellemző fokozott HE4 expresszió a károsodott CFTR funkció által indukált NF- κ B útvonal direkt hatásának tulajdonítható-e (**77. ábra**). A kérdés tisztázása érdekében a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 410⁻ sejteket specifikus NF- κ B útvonal inhibitorral (BAY 11-7082) kezeltük CFTR modulátorok és TNF- α jelenlétében vagy hiányában, majd mértük a felülúszó HE4 és IL-6 koncentrációját. Eredményeink szerint a BAY 11-7082 által kifejtett gátló hatás önmagában szignifikánsan csökkentette a kiindulási HE4 ($P < 0,05$) és IL-6 ($P < 0,01$) koncentrációkat ($P < 0,05$) 24 óra után, míg a BAY 11-7082 gátlószer és a LUM/IVA ($P < 0,001$) vagy TEZ/IVA ($P < 0,0001$) együttes adása mindkét fehérje szintjének sokkal nagyobb mértékű csökkenésével járt együtt. Az NF- κ B útvonal specifikus gátlása a TNF- α által indukált HE4 expresszió fokozódást is nagy mértékben redukálta ($P < 0,05$). A gyulladáshoz induktor TNF- α alkalmazása mellett a HE4 és IL-6 szintek további csökkenését tapasztaltuk az NF- κ B útvonal gátló és a CFTR modulátorok együttes hozzáadását követően a TNF- α -t és DMSO-t tartalmazó kontroll mintákhoz képest ($P < 0,001$) (**77/A-B. ábra**). Amikor a vad típusú CFBE sejtekben CFTR_{inh172} hozzáadásával gátltuk a CFTR-t az NF- κ B-t gátló BAY 11-7082 jelenlétében vagy hiányában, azt láttuk, hogy a CFTR gátlása nem eredményezett magasabb HE4 koncentrációkat az NF- κ B gátlószer jelenlétében ($P < 0,05$) (**77/C. ábra**). Az IL-6 szintek hasonló kísérleti körülmények között megfigyelt változásai a HE4 koncentrációk alakulásához hasonló mintázatot követtek, ami a CFTR diszfunkció és a CF-re jellemző általánosan fokozott proinflammatorikus állapot közötti szoros összefüggésre vetít fényt (**77/D. ábra**). Mindezek alapján a CFBE sejt kultúrák felülúszó mintáiban mért HE4 koncentrációk változása nemcsak az NF- κ B útvonal közvetítette gyulladáshoz vezető szabályozásának a következménye, de a CFTR funkció közvetlen befolyásoló hatásának is köszönhető.



77. ábra A HE4 és IL-6 koncentráció mérés nem aktivált és TNF- α stimulált F508del-CFTR CFBE 410⁻ sejtek felülszójában NF- κ B út vonal inhibitor és CFTR modulátorok jelenlétében. BAY 11-7082-t (5 μ M) használtuk az NF- κ B-mediált gyulladásos szignálút vonal blokkolására, hogy megvizsgáljuk a kiindulási és a TNF- α indukálta HE4 expressziót F508del-CFTR pozitív CFBE 410⁻ sejt kultúrákban 24 órás LUM/IVA vagy TEZ/IVA vagy DMSO (kontroll) kezelés után. A TNF- α indukált HE4 (A) és IL-6 (B) expresszió fokozódást a BAY 11-7082 kezelés csökkentette, és még kifejezettebb csökkenés volt detektálható a HE4 és IL-6 szintekben az NF- κ B inhibitor és a CFTR modulátorok együttes használatakor szemben a TNF- α -val és DMSO-val kezelt kontroll sejtekkel. A wt-CFTR CFBE 410⁻ sejtekben a CFTR_{inh172} (20 μ M) inhibitor nem tudta emelni a HE4 szintet az NF- κ B inhibitor használata mellett, ami a CFTR működéssel összefüggő NF- κ B szignálút vonal szerepét bizonyítja (C). Az IL-6 koncentrációban talált változások hasonló trendet mutattak, amely a CFTR funkció és a proinflammatorikus körülmények szoros kapcsolatát erősíti CF-ben (D). Az adatok átlag \pm SEM formában vannak ábrázolva, n=5-6 minta/kondíció. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 és ****P<0,0001 vs. kontroll minták DMSO-val; #P<0,05 és ###P<0,001 vs. kontroll minták TNF- α -val és DMSO-val kezelve.

Összefoglalásként megállapítható, hogy a CF-es betegekben mérhető emelkedett HE4 koncentráció kialakulásához hozzájárulnak a légúti gyulladásos körülmények között működő epithelsejtek. Ezekben a sejtekben a CFTR diszfunkció által aktiválódik az NF- κ B szignálút vonal, ami indukált HE4 expresszióhoz vezet. A HE4 fokozott felszabadulásában esetlegesen szerepet játszó más sejt típusokat, pl. fibroblasztok, illetve a tartósan magas HE4 fehérjeszint patofiziológiai szerepét jelenleg is vizsgáljuk.

6 MEGBESZÉLÉS

6.1 A PKC θ részvétele a thrombocyta aktiváció szabályozásában

A PKC izoenzimek vérlemezkékben történt kimutatása után intenzíven kezdték el vizsgálni azok funkcionális szerepét [35]. 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 [269]. 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 [270]. Vizsgálatainkat megelőzően még keveset tudtunk a thrombocyta PKC θ -ról, ezért többféle genetikai analízis alkalmazásával részleteiben vizsgáltuk a szerepét.

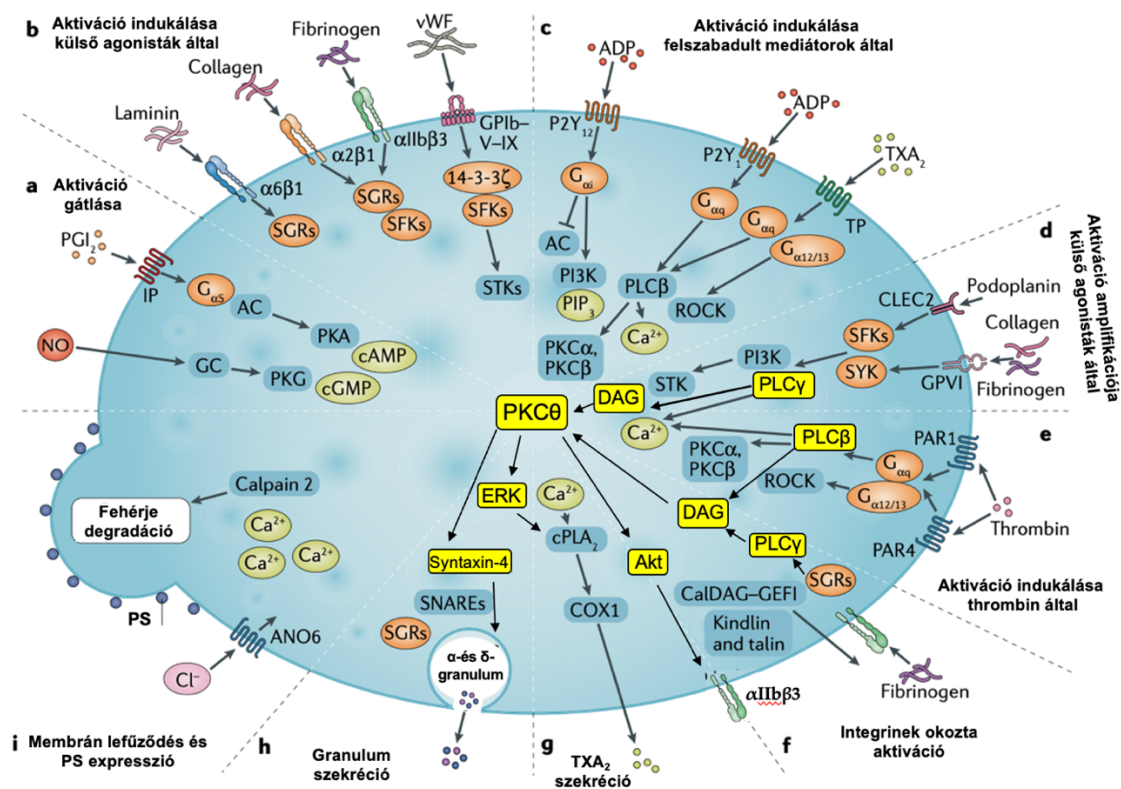
A PKC θ az intracellulárisan felszabaduló DAG hatására tud aktiválódni, ami mind a PAR, mind a GPVI receptor mediált útvonal mentén aktiválódott PLC enzim működése által termelődik (**3. ábra**). Az aktivált PKC θ foszforilációja a Thr538 pozícióban - TXA₂ felszabadulása nélkül is - bekövetkezik, viszont a gyengébb agonista ADP nem képes aktiválni hasonlóan a PKC δ -hoz [271]. Korábban a PKC θ tirozin foszforilációját (Tyr90) is igazolták „outside-in” szignalizációban és GPVI receptor agonista hatására [272]. 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 [273]. 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. Míg Cohen és munkatársai hasonlóan csökkent thrombin-indukált aggregációt és P-selectin expressziót tapasztaltak a PKC $\theta^{-/-}$ egerek mintáiban a WT állatokhoz képest [274], 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 [275]. A másik sokat vizsgált „novel” izoenzim, a PKC δ szintén

fokozza a PAR-mediált funkciókat, viszont a GPVI útvonal mentén egyértelműen gátolja azokat [271, 276], aminek köszönhetően a PKC δ hiányos egerek a FeCl $_3$ indukálta *in vivo* trombozismodellben nem mutattak különbséget a normál egerekhez viszonyítva [276]. 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 [37].

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 [277]. 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 [277].

Az α Ib 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 Ib β 3 integrin aktivációt közöltek a *CBFA2* génmutációval összefüggésbe hozott csökkent PKC θ aktivitás mellett humán vérlemezkékben [278]. Mindezen eredmények összhangban vannak olyan korábbi adatokkal is, amelyek szerint a Ca $^{2+}$ indukált CalDAG-GEFI mellett a DAG aktivált PKC izoenzimnek párhuzamos, és egyben szinergista hatása van a PAR-indukálta α Ib β 3 integrin aktivációban [279]. A teljes vérlemezke aktiváció megvalósulásában tevékenyen részt vevő TXA $_2$ termelődésére a PKC θ szintén kihat, mivel jelentősen csökkentek a GPVI és PAR agonisták által indukált TXA $_2$ szintek a PKC θ deficiens egerekben és egyben a cPLA $_2$ enzim aktivációját befolyásoló ERK foszforiláció [280] is kisebb volt szemben a WT állatokkal. A többi „novel” PKC izoenzim vérlemezke aktivációval kapcsolatos szerepéről jelenleg még kevés adat áll rendelkezésre: a PKC $\epsilon^{-/-}$ egerekben csökkent aggregációt és szekréciót írtak le GPVI receptor függő stimuláció után [281], míg az ADP-indukálta szekréció, Ca $^{2+}$ beáramlás és TXA $_2$ szintézis fokozódott, ami rövidebb vérzési időt okozott [282, 283]. Ezzel szemben a PKC η izoenzim elősegíti az ADP által kiváltott TXA $_2$ felszabadulást [284].



78. ábra A PKC θ legfontosabb funkcióinak összefoglalása (sárgával kiemelve) a GPVI, a PAR receptor és az aktivált α IIb β 3 integrin által mediált humán thrombocyta aktivációs folyamatokban. A PKC θ ezen szignálútvonalon keresztül aktiválódik a DAG felszabadulása révén, aminek köszönhetően részt vesz a granulum szekréció, a TXA₂ szintézis és az „outside-in” szignalizáció (α IIb β 3 integrin aktiváció) regulációjában, így hozzájárulva a vérrög stabilizációjához. Forrás: van der Meijden és Heemskerck 2019-es összefoglaló közleményéből adaptálva és módosítva [4].

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* vérrögek képződést. A PKC θ deficiens egerekben jelentősen csökkent a stabil thrombus kialakulásának a lehetősége. Ezek az eredmények jól összevágnek a vérlemezke aggregációs és szekréciós *in vitro* eredményeinkkel, illetve a mások által a PKC θ deficiens egerekben mért megnyúlt vérzési idővel [274], 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 [283]. Mindezen adatok alapján a PKC θ izoenzim egy fontos mediátora a thrombocyta aktivációnak (78. ábra), és egyben aktívan részt vesz a vérrög stabilizálásában is [285].

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

A DM2-ben gyakran kialakuló és akár hosszan fennálló hiperglikémiás állapot miatt nemcsak a keringésben funkcionáló sejtek működése változhat meg jelentősen, de a csontvelőben a megakaryocytáké is [48, 49, 52, 286]. A megváltozott metabolikus környezetben emelkedik a vérlemezkék aktiváltsági állapota, ezáltal a reaktív thrombocyták kisebb stimulus hatására könnyebben és akár nagyobb mértékben aktiválódhatnak [13, 41] (4. ábra). DM2-ben, de már obezitasban is kimutatható vérlemezke aktiváció többek között magasabb sejtfelszíni és szolubilis P-selectin expresszióval [17, 42] és megváltozott keringő és celluláris miRNS expressziókkal jellemezhető [134, 287, 288], amik elősegíthetik a vaszkuláris szövődmények kialakulását [12]. Ugyanakkor kevés információ állt rendelkezésre a humán megakaryocytá és vérlemezke miRNS-ek szintjének és funkciójának változásáról a metabolikus betegségekben.

Korábbi irodalmi adatok [138-140], valamint publikusan elérhető adatbázisok és predikciós programok (pl. www.mirbase.org) alapján kiválasztott néhány olyan miRNS analízisét végeztük el DM2-ben, amelyek a vérlemezke aktivációhoz biztosan kapcsolható fehérjereceptorok expresszióját szabályozhatják. Tudomásunk szerint korábban nem vizsgálták a P2Y12 és a P-selectin receptorok szabályozásában részt vevő vérlemezke miRNS-ek expresszióját DM2-ben. Ezért diabeteses betegek vérlemezke és plazma mintáiban kvantáltuk a miR-223, miR-26b, miR-140 és miR-126 expressziót, valamint két fontos célgénjük (*P2RY12*, *SELP*) mRNS szintjét. A hiperglikémia hatását megakaryocytá sejt kultúrákban *in vitro* is modelleztük, illetve külön analizáltuk a miR-26b és a miR-140 direkt funkcionális kapcsolatát is a *SELP* mRNS-sel.

A vizsgálatainkban korban és nemből illesztett egészséges kontroll személyek mellett nem diabeteses, de obez egyéneket is bevontunk, hogy kizárjuk a miRNS szinteket potenciálisan befolyásoló demográfiai paramétereket (pl. kor, nem, BMI). A thrombocytá funkció gátló gyógyszerek alkalmazásában sem volt különbség a vizsgálati csoportok között, ami szintén kihatott volna a miRNS szintekre [287, 289]. Erre egyik példa, hogy diabeteses betegek között a clopidogrelt szedőkben a miR-126 expressziója fals módon magasabb volt szemben az ilyen kezelésben nem részesülőkkel [290]. 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 [259]. Kiemelendő, hogy már obezekben is kb. 2x-es volt ez a P-selectin % különbsége, tehát már prediabeteses állapotban is elkezd nőni a vérlemezke aktiváció mértéke, aminek köszönhetően emelkedett szolubilis P-

selectin szintek megmutatkoztak obez személyekben az egészségesekhez viszonyítva [53]. Az obezitáshoz kötődő kóros thrombocyta aktivitásról a következő alfejezetben olvashatunk még. A jelen diabeteses vizsgáltunkban emellett jelentősen magasabb P-selectin fehérjekoncentrációt mértünk nemcsak a plazma mintákban, de a lizált DM2 vérlemezkék intracelluláris kompartmentjében is ELISA-val az egészséges kontrollokhoz hasonlítva, ami arra utalhat, hogy a P-selectin receptornak nemcsak egy fokozott, gyors szekrécija következik be ilyenkor, hanem több fehérje is termelődhet a tartósan fennálló metabolikus stimulusok hatására. Hasonlóan emelkedett P2Y₁₂ és GPIIIa receptor fehérjekoncentrációkat közöltek nemrég Szelenberger és munkatársai akut koronária szindrómában szenvedő betegek thrombocyta lizátumában [291].

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 [137], megvizsgáltuk ennek a miRNS-nek az expresszióját a diabeteses vérlemezkékben, 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 [286]. Ezen összefüggéseket olyan transzgén egerekben már vizsgálták, amelyekben a P2Y₁₂ receptor folyamatosan aktív konformáció állapotának kialakítása sokkal rövidebb vérzési időhöz, illetve a FeCl₃ indukálta trombózismodellben gyorsabb és stabilabb mikrotrombusok képződéséhez vezetett [292]. Ezen receptor expressziójának és funkciójának fontosságát DM2-ben szintén bizonyítja, hogy a receptor blokkolása (AR-C69931MX) hatékonyan csökkentette a mikroaggregátumok mennyiségét diabeteses betegekben [45], míg a magas glükózkoncentráció jelentősen fokozta nemcsak a PAR, de az ADP-receptor mediált P-selectin expressziót is *in vitro* [46]. Azóta több más humán gyulladási kórképben, pl. bakteriális arthritisben, illetve szepszisben is vizsgálták ennek a receptornak a központi szerepét a fokozott vérlemezke aktiváció lezajlásában [32, 33]. 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 alvadékretakció is ezt támasztja alá [142]. A miR-223 mellett egy

másik fontos vérlemezke miRNS-t, a miR-126 expresszióját is kisebbnek találtuk DM2-ben, ami az ADAM9 protein expresszió regulációján keresztül fokozhatja a kollagénhez való kötődést [148]. A fentiekkel ellentétben Stratz és munkatársai nem tapasztaltak hasonló thrombocytá expresszió változásokat diabetesben [290]. 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.

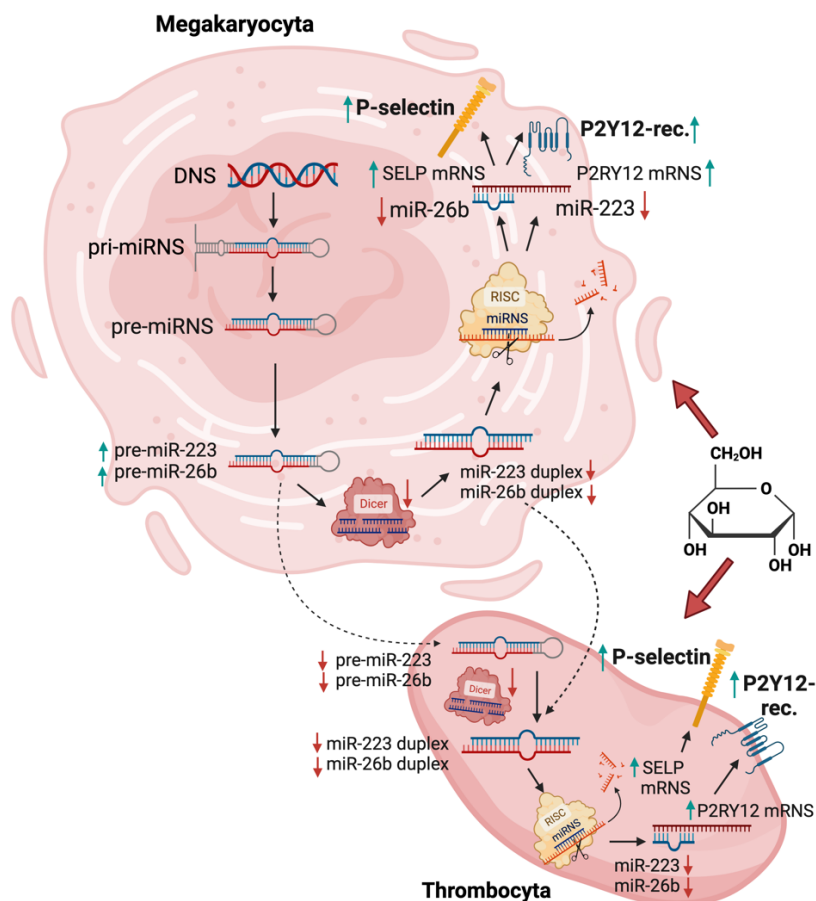
Az adatbázisok és predikciós programok alapján erős komplementaritás áll fenn a miR-26b és miR-140, valamint a SELP mRNS szekvenciája között, ezért elsőként analizáltuk ezek funkcionális kapcsolatát a thrombocytá működésben. A korábbiakban mindössze a miR-26b és az IL-6 expresszió kapcsolatát írták be [293], illetve vizsgálataink óta - eredményeinket alátámasztva - igazolták a miR-26a/b *SELP* expresszióra kifejtett hatását luciferáz reporter assay-vel is [294]. A P-selectin amellet, hogy a vérlemezke aktiváció érzékeny biomarkere [19], fontos szerepet játszik a vérlemezke-fehérvérsejt interakciókban és ezáltal az angiopáthia kialakulásában 1-es és 2-es típusú diabetesben [295]. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a vérlemezkek 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 kontrollokhoz 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 thrombocytá 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 [296]. Ezen adatok alátámasztják a csökkent thrombocytá miR-26b-nek a kóros vérlemezke funkcióban betöltött szerepét DM2-ben. Bár a miR-26b deficiens egerek thrombocytá P-selectin felszíni pozitivitása nem volt magasabb a WT egerekhez képest, ugyanakkor a receptor RNS, illetve fehérjeszintű vizsgálatát nem végezték el [296]. 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 megakaryocita 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 [162] - nem befolyásolta a miRNS expressziókat. A glükózzal *in vitro* kezelt MEG-01 sejtekben a csökkent miRNS szintek - a vérlemezkékhez hasonlóan - emelkedett P2RY12 és SELP mRNA 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 [48]. Hu és munkatársai 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- κ B útvonalnak van jelentősége [286]. Ehhez hasonlóan, a hiperglikémia az endothelsejtek működését is jelentősen befolyásolhatja, amikor a kóros glükózsint által lecsökkentett miR-24 szint emelkedett vWF expresszióhoz és szekrécióhoz vezetett egy diabeteses egérmodellben [297]. Ezek a kóros celluláris folyamatok mind hozzájárulnak a trombotikus komplikációk kialakulásához DM2-ben [46, 49, 287].

A diabetesben tapasztalt lecsökkent thrombocytá miRNS expressziók egyik okaként - a hiperglikémiás megakaryocytákban mért emelkedett pre-miRNS expressziók ellenére - alacsonyabb vérlemezke pre-miRNS szintek állnak, ami összességében kevesebb pre-miRNS átjutását jelenheti a képződő vérlemezkékbe. A másik fő ok a csökkent megakaryocytá/thrombocytá Dicer1 enzim funkció, amit korábban mások is kimutattak [142]. Saját kísérleteinkben a hiperglikémiás megakaryocytákhoz adott calpeptin korrigálta a glükóz által lecsökkentett Dicer1 szintet, ami megemelte a thrombocytá 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 [298]. Nemrégiben rossz glikémiás státuszú betegekben a PAR4 agonista által fokozott thrombocytá mikropartikula termelődést egy Ca²⁺-calpain függő mechanizmusnak írták el, amit a calpain inhibitor jelentősen blokkolt [299]. A calpain inhibitorok vérlemezke funkciót gátló hatását a citoszkéletális „remodelling”-en keresztül egyébként már jóval korábban - még a thrombocytá miRNS-ek azonosítása előtt - felismerték, amikor a calpastat hatékonyan blokkolta a thrombocytá aggregációt, szekréciót és a kitapadást a PAR-aktiválta vérlemezkékben *in vitro* [300]. Összességében a megváltozott megakaryocytá

RNS szintek megalapozzák az eltérő vérlemezke RNS tartalmát és azon keresztül a kóros aktivációs állapot kialakulását DM2-ben (79. ábra).



79. ábra A hiperglikémiás környezetben megváltozott miRNS és mRNA expressziók celluláris hatásai a megakaryocytákban és a thrombocytákban. A diabeteses csontvelőben a megakaryocytákban csökken a Dicer aktivitás, ami alacsonyabb (pirossal jelölt) érett miRNS expresszióval és emelkedett (zölddel jelölt) cél mRNA szinttel jár együtt. Ráadásul ilyenkor kevesebb pre-miRNS kerülhet be az „anyasejtből” a vérlemezkekbe. Mindezek miatt megváltozott RNS tartalmú thrombocyták képződnek, amit a magas glükózsztint a keringésben tovább fokozhat az alacsonyabb Dicer szint által. Végeredményben mindez elősegíti a thrombocyt P2Y12 receptor és P-selectin fehérje fokozott expresszióját, ami hozzájárulhat a vérlemezkek kóros aktiválásához és funkciójához. A glükóz szerkezeti képlete a diabeteses körülményeket reprezentálja. Az ábra a Biorender.com program alkalmazásával készült.

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 kontrollokhhoz képest, amely összhangban van korábban megfigyelt eredményekkel DM2-ben [134, 287]. 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 plazma miR-495 és a miR-107 mások vizsgálatában sem mutatott eltérést a stroke-kal kezelt és abban nem szenvedő DM2 betegek, valamint a kontrollok között [162]. 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 [134, 166].

6.3 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 vérlemezék aktiváltsági állapota a hipertónia, inzulin rezisztencia és diszlipidémia jelenlétében [16, 51, 301]. Aktivált vérmezzékkel ugyanis nemcsak a már előrehaladott atherosclerosisos folyamatok járnak együtt (**2. ábra**), de maga az érlemezésedés iniciálásához is szükséges kóros thrombocytá funkció, amit egérmodellben igazoltak [302, 303]. Bár a diabetesre jellemző thrombocytá reaktivitásról számtalan eredeti és összefoglaló közlemény jelent meg [12, 13, 41, 42], a „diabetes előszobájának” tekinthető obezításban a koagulációs abnormalitásokról [53, 304], a vérlemezke aktivációs markerek szintjének változásáról [56, 305], illetve az ebben részt vevő vérlemezke intracelluláris folyamatokról viszont még kevés információ áll rendelkezésre [17].

Ezért egyrészt egy klinikai vizsgálat keretén belül egy nagy obez betegcsoportban analizáltuk a különböző thrombocytá aktivációs markerek expressziójának alakulását, figyelembe véve a korai rizikófaktorok meglétét. Másrészt a P2Y12 receptor függő thrombocytá aktiválódást tanulmányoztuk egy hiperkoleszterinémiás LDLR-deficiens állatmodell segítségével. A DM2-s betegekhez hasonlóan [259] már obezításban is egyértelműen kimutatható a thrombocytá aktivitás növekedése, ami szoros összefüggést mutat több rutinszerűen mért markerrel, két klinikai indexszel (HOMA, PAI), továbbá a carotis IMT értékével. Az utóbbi paraméter egy fontos előre jelzője a későbbi vaszkuláris történéseknek [306] és elősegíti az atherosclerosis propagálását [307]. A dohányzás szintén nagy mértékben befolyásolta a vaszkuláris és a thrombocytá aktivációs eredményeket, mert jóval nagyobb IMT értékek mellett jelentősen magasabb felszíni CD62 pozitívitas mérhető. Ezek az eredmények

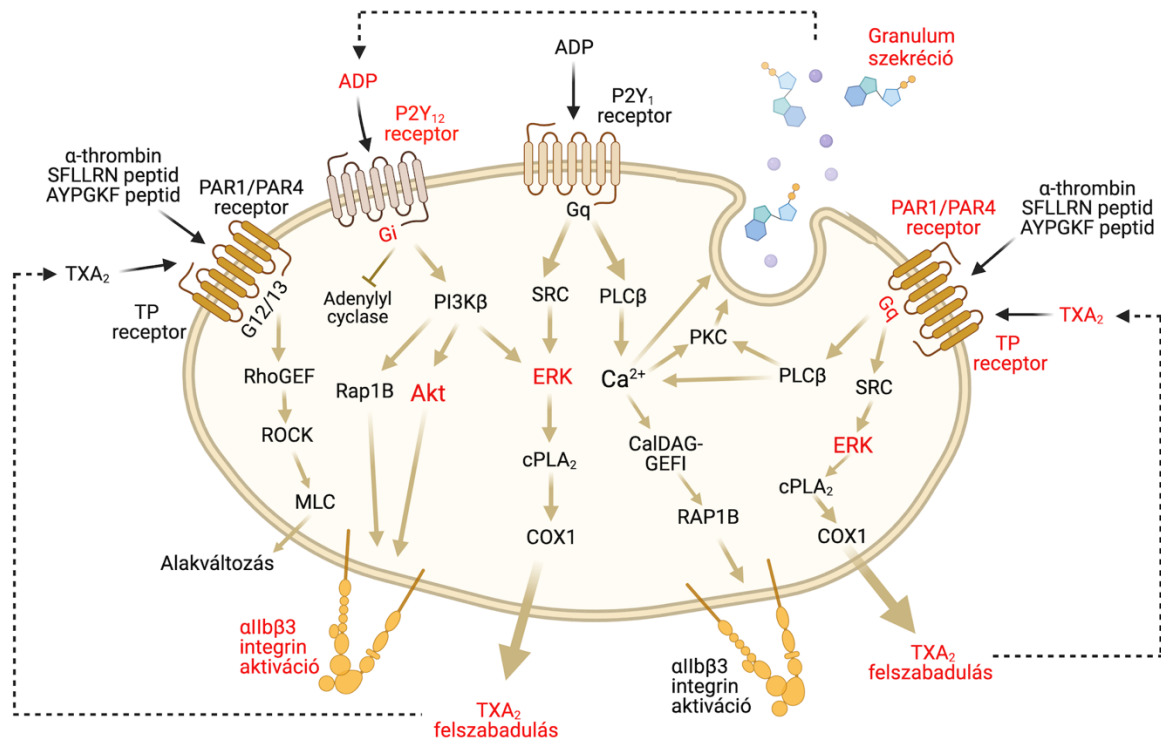
jól összevethetők mások korábbi vizsgálataival, ahol az össz koleszterin koncentráció jól korrelált a szolubilis P-selectin és a D-dimer szinttel [53], míg a P-selectin pozitív vérelemezkek százalékos aránya erős korrelációt mutatott a carotis IMT-vel és az artéria merevségi indexszel, továbbá szignifikáns pozitív összefüggést mutatott az életkorral, a BMI-vel, a vérnyomás szisztolés és diasztolés értékeivel, és a HgbA1C-vel [38]. Érdekes módon, a carotis IMT nem minden pro-inflammatórikus mediátorral mutatott szoros összefüggést: a CD40L és a CD40 plazma szintekkel korábban nem találtak erős korrelációt carotis elzáródásban szenvedő betegek körében [309]. Mások a szolubilis P-selectin szint szoros összefüggését állapították meg obezitásban a BMI-vel, a HOMA indexszel, a vérnyomás értékével, az éhomi inzulinnal, a trigliceriddel és PAI-1 szinttel [305]. A vérelemezke 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 [310]. Ugyanakkor ischémiás stroke-ot követően a fokozott mértékben termelődött thrombocytá mikropartikulák mennyisége nagyon jól korrelált az IMT eredményével [311]. 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 vélelmezték csökkentve a plazma P-selectin szintet a kardiovaszkuláris betegekben [312, 313], sőt, az akut koronária szindróma kialakulásának rizikóját is mérsékelte [314]. Hasonlóan egy korábbi DM2-s vizsgáltunkhoz [259], illetve egy másik kutatócsoport stroke-ban végzett tanulmányához [315], obezitásban sem találtunk ennek a polimorfizmusnak számottevő szolubilis P-selectint befolyásoló hatását.

A cukorbetegséghez társuló kóros thrombocytá funkció mellett [13] a különböző súlyosságú lipidanyagcsere zavarban is jelentős vérelemezke aktiváció alakul ki [316], ami elősegíti az érlemezsedés asszociált atherotrombózis kialakulását [302]. Ezért a thrombocytá funkciót gátló gyógyszerek, így a P2Y12 receptor inhibitorok jó eredményt mutattak a kardiovaszkuláris elhalálozás rizikójának csökkentésében AMI-ban, DM2-ben és hiperkoleszterinémiában [317, 318]. Régóta ismert tény, hogy a statinok a lipidszint csökkentése mellett egyéb kedvező hatással is bírnak, úgy, mint gyulladáscsökkentő, antioxidáns és antitrombotikus (a thrombocytámembrán koleszterintartalmának csökkentésén keresztül) hatásokkal [319, 320]. Ezt azóta igazolták humán [321, 322] és állatvizsgálatokban is [323], hogy a lipidcsökkentők jelentősen mérsékeltek a vérelemezke aktivációt mértékét hiperkoleszterinémiában. Ezen korábbi előzmények alapján vizsgáltuk a P2Y12 receptor indukálta szignalizáció szerepét különböző súlyosságú diszlipidémias egerekben, amit 8 hétig

eltérő lipidösszetételű diétán tartott LDLR^{-/-} és WT egerekben tudtuk megtenni. Ezt az egérmodellt más csoportok is használták korábban a hiperkoleszterinémia okozta celluláris diszfunkciók analizésére [324, 325], bár több esetben hosszabb ideig (akár 6 hónapig) kezelték az egereket a lipid eltérések elérése érdekében [326, 327]. 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 [16]. Az LDLR^{-/-} egerekben mért kb. 10x össz koleszterinszint növekedés viszont a familiáris hiperkoleszterinémiára jellemző extrém növekedésnek felel meg [60]. 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 szekréción 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 [327]. Ezzel párhuzamosan az ATP szekréción szignifikánsan nőtt, ami tovább triggerelte a thrombocytá reaktivitást a G_i szignalizáción keresztül [328]. A P-selectin expresszió emelkedése szintén kimutatható volt a hiperkoleszterinémiás egerekben, hasonlóan az ilyen kórképben szenvedő betegekhez [259, 316], 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 szekréción befolyásolja ilyen metabolikus körülmények között és kevésbé fontos az α -granulum szekréciónban. 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 [329]. Ezekkel az indukált funkcionális változásokkal jól korrelált, hogy a hiperkoleszterinémiás egerekben a G_i-hoz kötött útvonalon keresztül fokozott volt az ERK és az Akt fehérjék foszforilációja. Az előbbi a TXA₂ szintézis, az utóbbi fehérje az α Ib β 3 receptor aktiváció regulációjában vesz részt [280, 330]. Shankar és

munkatársai korábban hasonló összefüggéseket találtak, amikor a P2Y₁₂ receptor inhibitor (pl. clopidogrel) használatával jelentősen csökkent a PAR-indukált TXA₂ termelődés, amit a cPLA₂ aktivitással való interferenciával magyaráztak [331]. Ugyanakkor az egérkísérleteinkben a vérlemezke aktiváció mértéke nem kizárólagosan a TXA₂ által növekedett, hiszen a TXA₂ termelődés blokkolása mellett is fokozódott a thrombocyta reaktivitás. A P2Y₁₂ receptor gátlásakor általunk is tapasztalt jelentős aggregáció csökkenés alátámasztja ezen gyógyszerek jelentőségét a diszlipidémiában szenvedő betegek kezelésében [318]. Állatkísérletes vizsgálatokban ezt mások is megfigyelték, amikor diszlipidémiás ApoE^{-/-} egerekben a clopidogrel kezelés jól gátolta az atheroma kialakulását [332]. Sőt, ennek a receptornak a cigaretta füst által kiváltott adverz vérlemezkefunkció eltérések kialakulásában is felvették a szerepét, amit szintén ApoE^{-/-} egerekben tanulmányoztak [333]. Végül Evan és munkatársai P2Y₁₂^{-/-} egerekben igazolták a receptor FeCl₃ által indukált neointima képződésben betöltött funkcióját, mivel ezek a deficiens állatok jóval kisebb mértékben mutattak érfal elváltozásokat a WT egerekkel szemben [334]. A sejtmembránban „lebegő” lipid tutajok és néhány thrombocyta szignalizációs folyamat, pl. maga a P2Y₁₂ receptor mediált útvonal közötti szoros funkcionális kapcsolat szintén egy fontos promotáló körülmény obezításban [335], amit az is alátámaszt, hogy a metil-béta-ciclodextrinnel végzett membránkoleszterin depléció jelentősen csökkentette az ADP-indukált vérlemezke aggregációt [65], illetve a megnövelt zsírbevitel a sejtmembránok koleszterintartalmát is emeli több arachidonsav termelődését okozva [336]. 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 [337]. Mindezen kísérletes adatok megerősítik azon eredeti hipotézisünket, hogy a P2Y₁₂ receptoron keresztül lejátszódó kóros intracelluláris folyamatok hozzájárulnak a hiperkoleszterinémiára jellemző fokozott thrombocyta reaktivitáshoz (**80. ábra**).



80. ábra Hiperkoleszterinémiás egerek thrombocyta mintáiban a P2Y12 receptor mediált útvonal mentén tapasztalt kóros vérlemezke aktivációs történések összefoglalása. Pirossal az általunk vizsgált és kórosnak igazolt folyamatokat tüntettük fel. A kóros intracelluláris eltérések eredményeként fokozott aggregáció és δ -granulum szekréció, megnőtt α IIb β 3 integrin aktiváció, valamint több TXA₂ szintézise következik be. Az ábra a Biorender.com program segítségével került megszerkesztésre.

Természetesen a fentiekben ismertetett túlzottan aktív P2Y12 receptor függő folyamatok mellett a korábban vizsgált ApoE-R2' és CD36 receptorok [63, 64] és a thrombocyta-lipid interakció eredményeként indukálódó egyéb kóros vérlemezke aktivációs események is bekövetkeznek diszlipidémiában, többek között fokozott mitokondriális ROS szintézis, illetve lipid oxidáció és peroxidáció, és mindezek együtt vezetnek a rendellenes thrombocyta aktivációhoz obezításban [338].

6.4 Megváltozott megakaryocyta-thrombocyta 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 [66, 339]. 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 [340] (**11. ábra**). Az aktivált vérlemezkék 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 [69] (**5. ábra**). 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 [130].

A gyulladós folyamatok indukálásában kulcsszerepet játszó TLR-ek közül a TLR4 receptor is megtalálható mind a thrombocytákon, mind a megakaryocyták felszínén [89], aminek az egyik legfontosabb ligandja az LPS [90]. Ennek köszönhetően számos korábbi *in vitro* vizsgálat [83, 85, 341-344] 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 [86]. A klinikai szempontból releváns Gram-negatív baktériumok (pl. *E. coli*) változatos felépítésű LPS molekulákat termelnek, amelyek változó számú poliszacharid egységekből épülnek fel [345]. 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 [83, 85, 341-344]. Ezzel szemben a *S. minnesota* eredetű Re-LPS (Re595) ugyan hatékonyan aktiválta a TLR4 receptort expresszáló hízósejteket [345], a humán monocytákat és neutrophileket hasonló aktivitással, mint az S-LPS [346], 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) [83, 85, 341-344].

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 expresszáldó P-selectin receptor (CD62P) szintén részt vett az LPS megkötésében, ahogy ezt korábban mások is találták [341].

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 [342]. 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 pozitívitas 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 [85, 344]. A thrombocytá 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 [347]. A fentiek alapján a két különböző LPS forma eltérő módon befolyásolja a vérlemezkek 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 thrombocytá TLR4 receptorral CD14 nélkül is. A S-LPS aktivációhoz biztosan szükséges a CD14, hogy kötődjön a TLR4-hez [345, 348]. Mivel a thrombocyták nem expresszálnak CD14-t [341], 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. Így megerősítettük mások korábbi eredményeit, miszerint az Re-LPS CD14 nélkül is kötődik a TLR4-hez [345]. 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 vérlemezkek aktivációját.

Szepszisben nemcsak a keringő vérlemezkek, de a csontvelői sejtek, így a megakaryocyták is ki vannak téve a gyulladási mediátorok direkt hatásának a TLR4 receptoron keresztül [89]. 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 [349]. Ezen felül a TLR2 receptoron keresztül indukálódó intracelluláris folyamatok szabályozzák a megakaryocyták működését is, ami kihathat a megakaryocyta-thrombocyta vonal működésére, így pl. fokozott GPIb receptor és COX-2 enzim expressziót okozva [88]. Ugyanakkor a TLR4-mediálta megakaryocyta 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 vérlemezkéknek tulajdonították [350, 351]. Összeségében minden olyan trigger, amely a megakaryocytákat érinti a csontvelőben, a thrombocyták „előaktivált”, protrombotikus fenotípusához vezethet szepszisben a vér nagyobb prokoaguláns aktivitása mellett [68, 69, 77].

Az elmúlt években a miRNS-ek finomszabályozó szerepe a tudományos érdeklődés középpontjába került nemcsak a thrombocyták, de a megakaryocyták működésének vonatkozásában is [140, 151, 352]. A közelmúltban került publikálásra, hogy a thrombocyta miR-27b képes szabályozni a trombospondin-1 szintézisét [252], míg a miR-15a a megakaryocytákban modulálja a GPVI által közvetített α IIb β 3 integrin aktivációt és az α -granulum szekréciót [150]. Ugyanakkor számos megakaryocyta-vérlemezke funkció és fehérje expresszió esetében még nem ismert a miRNS-ek finomszabályozó szerepe az egyes kórképekben.

Ezért első szepszises vizsgálatsorozatunkban szeptikus betegektől izoláltunk nagy tisztaságú, fehérvérsejt-depletált thrombocytákat, és 3 szeptikus beteg vérlemezke mintájában miRNS-profilát analizáltuk TaqMan OpenArray módszerrel. Az egészséges személyekhez viszonyítva 121 miRNS csökkent, míg 61 fokozott mértékben expresszálódott a szeptikus vérlemezkekben. A szeptikus csoportban a fokozott thrombocyta aktiváció hátterében 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 szepszishoz társuló thrombocyta reaktivitás előrejelzésében úgy, mint a thrombocyta miR-223 és miR-146a koronária betegségben vagy diabetesben [162, 164]. Ezen túlmenően a perifériás vérsejtek miR-

199b szintje jól korrelált a szepszis súlyosságával, míg az exoszomális miR-125b, valamint a plazma miR-150 előre jelezte a szepszis progresszióját [170, 353].

A szeptikus vérlemezkék 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 vérlemezkékben leírtak [111]. Fontos kiemelni, hogy amikor a thrombocyták méretét és reaktivitását kifejező MPV értékek [354] alapján tovább elemeztük a *SELP* expressziót a betegek vérlemezke mintáiban, magasabb SELP mRNS szintet találtunk azoknál, akiknél a vérlemezkék nagy MPV értéket mutattak ($\geq 11,1$ fL). A nagyobb vérlemezkék általában több granulomot és RNS-t is tartalmaznak, ezáltal valóban reaktívabbá válhatnak, mint a kisebb thrombocyták [355]. Bár ezeknél a betegeknél a *SELP* expresszió nem korrelált szignifikánsan a szepszis súlyosságával és kimenetelével, a megnövekedett MPV értékek előre jelezték a betegség prognózisát [356]. A P-selectin expressziót elősegítő megnövekedett SELP mRNS szint mellett viszont magasabb P-selectin fehérjetartalmat is detektáltunk a szepszises thrombocytá lizátumokban, amihez hozzájárul a megakaryocyták és a vérlemezkék megváltozott miRNS és mRNS expressziója. Egy peritoneális szepszises állatkísérletben az egér vérlemezkék 48 órán át emelkedő P-selectin pozitivitást mutattak [357]. Az aktivált thrombocyták felszínén a fokozott P-selectin expresszió nagymértékben részt vesz a heterotipikus aggregátumok kialakulásában, ami mikrovaszkuláris trombozishoz vezethet [78]. A thrombocytá P-selectin blokkolása a CD11b receptor egyidejű, neutrophileken történt gátlásával hatékonyan gátolta a thrombocytá-neutrophil kölcsönhatásokat szeptikus sokkban [358]. Összeségében a vérlemezkékben indukálódó *SELP* gén expressziója még inkább hozzájárulhat a sejt-sejt interakciók nagyobb mértékű kialakulásához [19], és ezáltal a P-selectin receptor új terápiás célpontot jelenthet szepszisben. A különböző (P-)selectin specifikus blokkoló antitestek lehetséges alkalmazhatóságát a 2012-es összefoglaló közleményünk 1. táblázatában gyűjtöttük össze.

A szepszis vérlemezke transzkriptomát érintő hatását nemrégiben karakterizálták [359], ugyanakkor kevés tanulmány foglalkozott eddig a megakaryocytákat közvetlenül érintő szepszises folyamatokkal, amely megváltozott RNS expressziót eredményezhet nemcsak bennük, hanem a keringő vérlemezkékben is [349, 360]. Ezért részleteiben megvizsgáltuk az LPS által kiváltott transzkripciós változásokat egy régóta alkalmazott, könnyen fenntartható, és jól kezelhető megakaryocytá modellrendszerben [249-253], a MEG-01 sejtekben. A szepszis során a vérlemezkékben emelkedett ITGA2B mRNS expressziót figyeltük meg mind a humán, mind az egér vérlemezkékben, ami az α IIB thrombocytá fehérje *de novo* szintézisét eredményezte az α IIB β 3 integrin tartós aktivációjával [360]. Ennek érdekében a MEG-01

sejtkultúrákat 4 órán keresztül LPS-sel stimuláltuk a megakaryocita transzkriptóma elemzésére. Az LPS indukálja az NF- κ B útvonalat a MEG-01 sejtekben [89], amelyet a p65 fokozott nukleáris transzlokációjával fluoreszcens mikroszkóppal vizualizáltunk. RNS szekvenálással 1060 szignifikánsan csökkent és 354 nagyobb mértékben expresszáldó 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-ral, 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 megakaryocita-thrombocita tengelyben, ami változatos fenotípusú vérlemezkék termelődéséhez vezethet [89]. Ezt a mechanizmust a fokozott vérlemezke aktivációra vonatkozóan akut koronária szindrómában is felvetették korábban [354].

Jelen kísérleteinkben az LPS-sel aktivált MEG-01 sejtekben a miR-26b szint a normálhoz képest jelentősen alacsonyabb volt, hasonlóan az *ex vivo* szeptikus vérlemezkékhez. Mukai és munkatársai szerint kardiopulmonális bypass műtét után a thrombocita miR-10b és miR-96 fokozott expressziója csökkentette a GPIB és VAMP8 mRNS expressziót, valamint az azok által kódolt fehérjék szintjét, ami thrombocita diszfunkciót okozott [361]. A miR-26b-nek a *SELP* mRNS expresszióra gyakorolt funkcionális hatását ezen gyulladáshoz köthető körülmények között MEG-01 sejtekben erősítettük meg specifikus miRNS mimic segítségével, amit azóta mások is igazoltak egy állatmodellben [294].

Bár más gyulladáshoz köthető kórképekben (pl. rheumatoid arthritis) csökkent *DICER1* expressziót mutattak ki, amely jelentősen megváltoztatta a miRNS expressziókat és ezen keresztül a gyulladáshoz köthető válaszütemet [362], szepszisben ilyen adatok előttünk nem álltak rendelkezésre. Vizsgálataink során a Dicer1 fehérjésint csökkenését figyeltük meg az *ex vivo* szeptikus betegek thrombocita 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 siRNS-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 [363]. 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 [142], 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 [364], valamint asztmában [365], továbbá egy friss szérum proteom vizsgálat alapján a *SELP* fehérje egy prokoaguláns prognosztikai faktor esszenciális thrombocytopeniában [366].

A thrombocyták aktiválódását a mikropartikulák lefűződése és ily módon a vérlemezke miRNS-ek szekréciója kíséri. A kiszabadult miRNS-ek bejuthatnak a macrophágokba [367] és az endothelsejtekbe [159], ahol szabályozhatják a különböző gyulladásos folyamatokat és a sejtadhéziós molekulák expresszióját [368]. Korábbi eredmények alapján kiderült, hogy a miR-223 HDL-hez kötött formában képes *in vitro* regulálni az ICAM-1 expressziót HCAEC sejtekben [132], míg a thrombocytá miR-320b jelentős parakrin hatást kifejtve az endothelsejteken szintén az ICAM-1 receptor felszínen való megjelenését modulálja AMI-ban [180]. 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 lejátszódását az endothelsejtekben [155]. Azonban nem állnak rendelkezésre olyan eredmények, hogy a thrombocytá miR-223 szeptikus körülmények között miként tudja befolyásolni az endothélium ICAM-1 expresszióját. A vizsgálatához használt szepszises minták vérlemezkéinek fokozott aktiválódását ezúttal is a magas felszíni P-selectin expresszióval igazoltuk, ami megnövekedett mikropartikula számmal járt együtt a kontrollokhoz képest. A szolubilis ICAM-1 szintet vizsgálva a szeptikus szérumokban szignifikáns emelkedést találtunk a kontroll csoporthoz képest, ami az endothelsejtek fokozott aktivációját jelzi [173]. 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 thrombocytá 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 szepszisben fokozott thrombinképződés által indukált vérlemezke aktivációt [369], és a thrombocytá „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 thrombocytá aktiválódásakor a mikropartikulákban lévő miRNS átvitele valóban megtörténik a keringésbe. Egy hasonló tanulmányban beszámoltak arról, hogy a thrombin által kiváltott vérlemezke aktivációkor keletkezett exoszómák is miR-223-ban gazdagok [181]. Mások vizsgálata szerint a thrombin aktiváció a cel-miR-39 expressziójának jelentős emelkedését okozta a vérlemezkek felülúszójában, ami az intracelluláris miR-39 tartalom kikerülését jelentette [180].

Mivel az endothélium a keringő mikrovezikula tartalom fontos célpontja a szív- és érrendszeri megbetegedésekben, valamint a gyulladási kórképekben [155], ezért mi is megvizsgáltuk és detektáltuk a miRNS-ek thrombocytá eredetű mikropartikulákon keresztüli bejutását az endothelsejtekbe. A HCAEC sejteket együtt tenyésztettük szepszises, illetve kontroll egyének mintáiból izolált mikropartikulákkal. Azt tapasztaltuk, hogy 24 óra elteltével nagyobb mértékű volt a szepszises mikropartikulák felvétele az endothelsejtekbe, mint a kontroll minták esetében. Korábbi tanulmányok dokumentálták a normál mikropartikulák és exoszómák internalizációját a HUVEC sejtekbe [159, 181]. Jelen tanulmányunkban a szepszis eredetű thrombocytá 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 [260, 261]. Ezután megfigyeltük a szepszises mikropartikulák hatását az endothelsejtek működésére a „szekretált” miRNS-ek révén. A HCAEC sejteket előkezeltük szepszises 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-

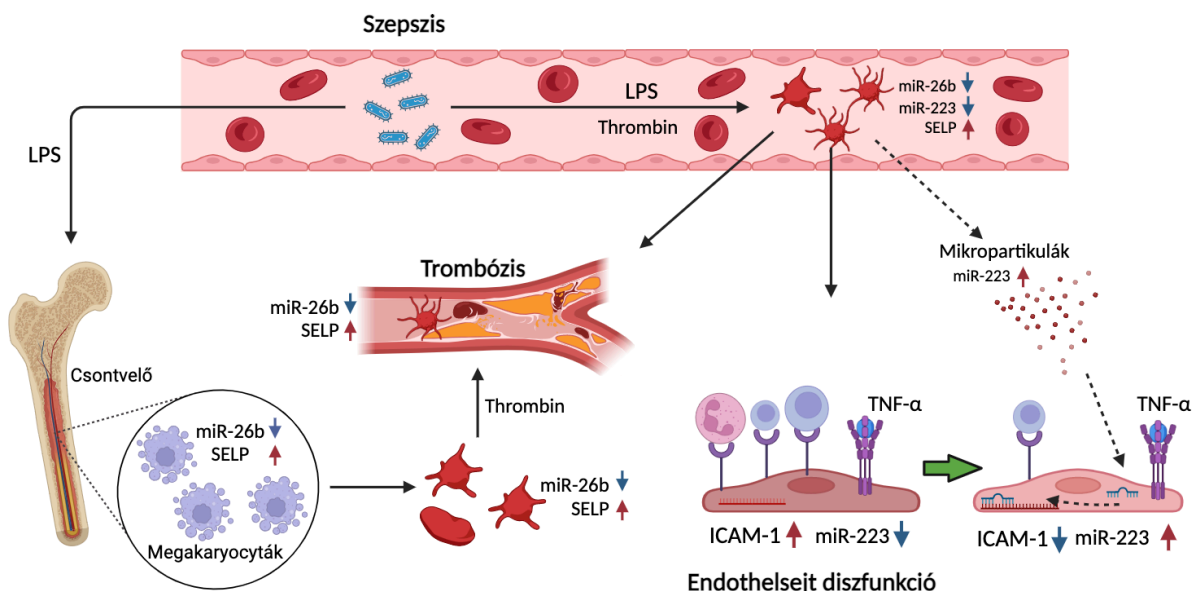
223 szint emelkedett volt a mikropartikula nélküli kontroll endothelsejt mintákhoz képest. Ezek az eredmények együttesen megerősítik, hogy a miR-223-at hordozó mikropartikulák endocitózisa egyértelműen növeli a miRNS expresszióját az endothelsejtekben. Ezen kívül a thrombocytá mikropartikulák által átjutott miR-223 képes a gyulladáshoz vezető körülmények miatt indukált ICAM-1 receptor expresszióját csökkenteni az endothelsejtekben. Korábbi eredmények alapján a thrombocytá eredetű miR-223 képes szabályozni az *EFNA1* és *FBXW7* gének expresszióját is mRNA szinten HUVEC sejtekben [159]. Szintén kiemelendő, hogy az ICAM-1 expressziót nemcsak a miR-223 szabályozza, hanem más miRNS-ek, például a miR-141 is, ami csökkentette az ICAM-1 expresszióját a szívizom ischémia-reperfúziós sérülésének kivédése érdekében [182]. A miR-223 ugyanakkor más receptor, így pl. az inzulinszerű növekedési faktor 1 (IGF-1) receptorának expresszióját is szabályozza a vaszkuláris simaizomsejteken [370].

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 siRNA-val 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 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 [176], 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) [371] vagy éppen gátolhatják a megakaryopoiesist és thrombopoiesist (pl. IFN- α) [372]. Hasonlóan, egy coecum ligációs és punkciós (CLP) szepszises egérmódel szerint az LPS is képes penetrálni az állatok csontvelőjébe és a megakaryocyták fokozott IL6 mRNS expressziót mutattak [373]. Mindennek köszönhetően megváltozott működésű, protrombotikus új vérlemezkék termelődnek, amit nemcsak bakteriális szepszisben [349, 360, 373], hanem koronavírus-betegség 2019 (COVID-19) betegségben is nemrégiben leírtak [374]. 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 [360]. 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 [155]. Tehát szepszisben a megváltozott thrombocytá miRNS expressziók kialakításában mindkét mechanizmus egyszerre részt vehet. Ugyanakkor érdekes adat az is, hogy az aktiválódott vérlemezke funkció következménye nemcsak a kóros alvadási zavarok bekövetkezése, hanem a túlzott mértékű, akár elhúzódó endothelsejt aktiváció kompenzációja is (**82. ábra**).



82. ábra A kóros thrombocytá aktiváció és a vérlemezke-eredetű miRNS-ek „kettős élete” súlyos gyulladásos körülmények között. Szepszis során az LPS nemcsak a vérlemezkéket stimulálja direkt módon a keringésben, hanem a véráram útján bejuthat a csontvelőbe, ahol a megakaryocytákat is tudja aktiválni, és ez új protrombotikus vérlemezkék termelődéséhez vezet. Ezek a thrombocyták megváltozott RNS profillal (pl. csökkent miR-223, miR-26b stb.) bírnak, amelynek révén pl. a P-selectin fehérje (SELP) termelődése is fokozódhat. Ezzel párhuzamosan az aktiválódott vérlemezkék mikropartikulákat szekretálnak, amelyekbe a miRNS-ek is bepakolódnak, és bejutva az endothelsejtekbe megváltoztatják azok működését, pl. az ICAM1 expressziót.

Kiemelendő, hogy az aktiválódott vérlemezke funkció következménye nemcsak a kóros alvadási zavarok, hanem a túlzott mértékű endothelsejt aktiváció mérséklése is. Az ábra a Biorender.com program segítségével került megszerkesztésre.

6.5 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 [189-193]. 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 [375, 376]. A legújabb klinikai tapasztalatok továbbra is támogatják a DES széles körű alkalmazását olyan kardiológiai betegekben, akiknél nem kontraindikált a tartós thrombocyta funkció gátló kezelés [377]. Napjainkban DES implantációra kerül sor akkor is, amikor a fémszentes beavatkozást követően újabb sztentelés szükséges, vagy trombotikus komplikációkra hajlamosító társbetegségek van jelen, pl. DM2 [191, 192, 378]. A DES-ek valamilyen gyulladáscsökkentő és sejtproliferációt gátló hatással bíró gyógyszert (pl. everolimus, paclitaxel, sirolimus stb.) két fázisban bocsátanak 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 [379]. A DES és a BMS különböző típusainak hatékonyságát bár számos klinikai tanulmányban vizsgálták [189, 190, 195-198], mégis kevés *ex vivo* és még inkább *in vitro* adat állt rendelkezésre a két sztenttípus különböző sejtekre kifejtett direkt aktiváló hatásáról [380].

Tanulmányunkban összesen 28 BMS és 21 DES kezelésben részesült stabil anginás betegtől 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, nemben, 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 [381]. A véralvadási kaszkád általában nem aktiválódik sztentelés után, és ballonos koronáriatágítás során is csak átmeneti emelkedést tapasztaltak a D-dimer és a TF szintben, illetve a FVII aktivitásban [200]. 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 [382].

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 [188]. Bár a CD62 pozitivitás átmenetileg csökkent a keringésből kikerült aktivált vérlemezkek miatt [383], 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 [383], 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 [384], vagy inkább csökkent a koncentrációja a beavatkozást követő 24 órában [202]. 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 [199, 201].

Az endothelsejt aktivációs markerek közül egyszerre vizsgáltunk korai markereket (pl. vWF) és késői, *de novo* szintetizálódó fehérjét (pl. VCAM-1) [172]. Előző közleményekben emelkedett vWF szinteket mértek BMS kezelés után 24-96 óra elteltével [186, 385]. Itt 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 [202], valamint az ISR kialakulása után is jóval magasabb koncentrációját írták le emelkedett TNF- α értékek mellett [187]. 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 [186], ugyanakkor Munk és munkatársai csökkenő E-selectin plazma koncentrációkról számoltak be, különösen a DES betegek körében [202]. Az ICAM-1 szintekben mi csak lassan növekvő értékeket detektáltunk, ami más betegkohorszok sztentelés utáni eredményeinek megfelel szoros összefüggést mutatva a keringő endothelsejtekkel [385].

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 [386]. Ennek ellenére korábban nem mindig figyeltek meg PDGF-BB szint emelkedést PCI után [387]. Végül a szignifikánsan magasabb TNF- α szint az ISR kialakulása során lejátszódó kóros gyulladós folyamatokat jelzi [187].

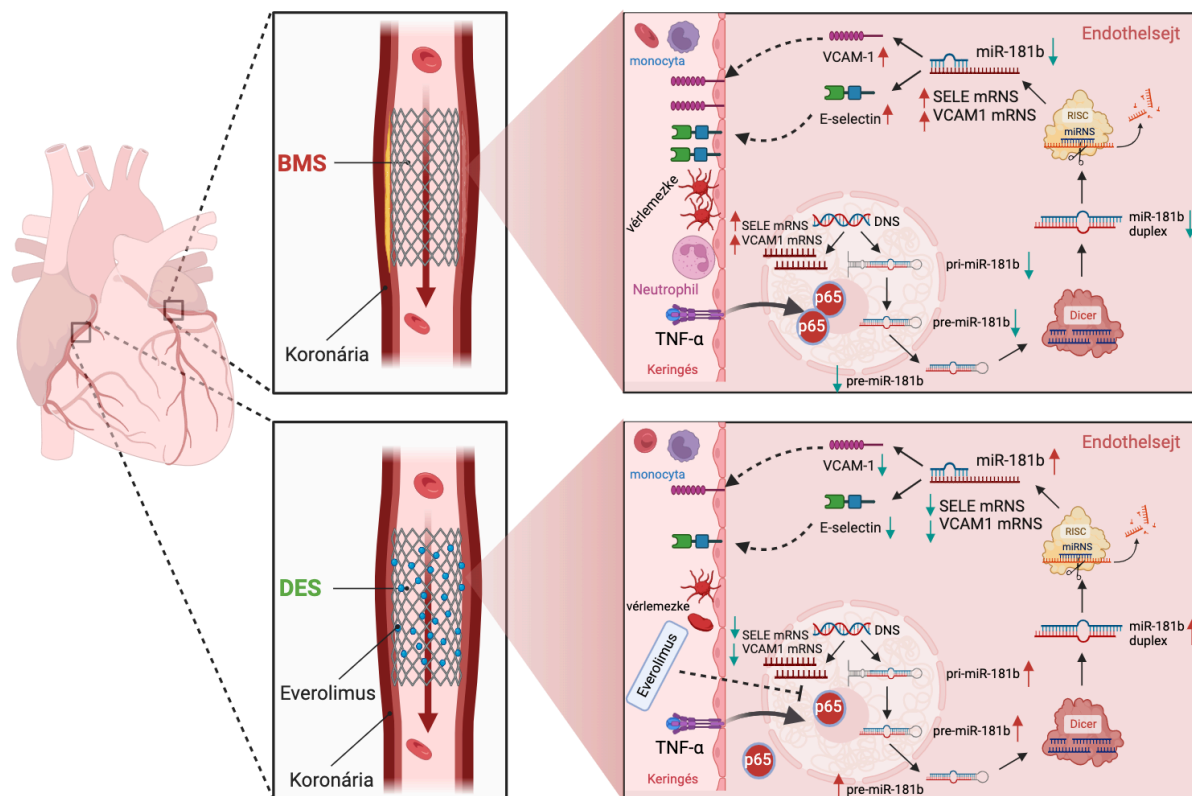
Az ISR jelenlétében mért magasabb E-selectin és VCAM-1 plazma szintek háttérben álló génextpressziók transzkripciós és poszttranszkripciós szintű szabályozásáról, valamint az everolimus sejtaktivációt csökkentő hatásáról még kevés információ állt rendelkezésre. Ezért a vaszkuláris gyulladós folyamatokat Palmieri és munkatársaihoz [388] hasonlóan 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 [257], míg a szélesebb körben használt HUVEC sejtekben [389, 390] 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 gyulladós folyamatokat az emelkedett IL1B és IL-6 mRNS szintek igazolták, amik már 1-4 órával a kezelés után jelentős magasabbak voltak. Ezt a nagyfokú gyulladós válaszreakciót az everolimus 1 óra alatt szignifikánsan redukálta, ami 4 órát követően még kifejezőbbé vált. Az everolimus tehát csökkenteni tudta az endothelsejtek gyulladós folyamatait. Ezekből következően az everolimus antiproliferatív hatása [204] 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 [205, 391]. Hasonlóan, a sirolimus szintén csökkenteni

tudta a TNF- α kezeléssel kiváltott VCAM-1 szintjét a HUVEC sejtekben [206]. 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 [265]. 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 [214] újra elemzésével. A közelmúltban megjelent közleményekben bemutatták, hogy az enhanszerek aktivitására jól lehet következtetni az enhanszer RNS expressziók változásának mérésével [392-394]. 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 órási 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 posztranszkripciós szabályozása miRNS-ek által is történhet, mint ahogy azt HUVEC sejtekben már korábban vizsgálták [211]. 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 [392]. 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-kel (**83. ábra**).



83. ábra A BMS és a DES implantáció eltérő hatásának következményei és vizsgált molekuláris mechanizmusa. A BMS fokozott vaszkuláris gyulladást idézhet elő a beavatkozás területén, ami fokozott thrombocytá és endothelsejt aktivációval járhat együtt. Ezzel szemben a DES gyógyszert bocsát ki az érintett érszakaszban, pl. everolimust, ami képes az endothelsejtek aktivációs folyamatait több ponton is kedvezően befolyásolni. Hatására csökken az NF- κ B út vonal aktivációja, nő a miR-181b szintje, ezáltal csökken a SELE és VCAM1 mRNA expresszió, és mindez kevesebb fehérje termelődéséhez, kisebb felszíni expresszióhoz vezet csökkentve a celluláris interakciók kialakulásának a valószínűségét. Az ábra a Biorender.com program segítségével került megszerkesztésre.

Az ISR kialakulásának hátterében a keringő miRNS-ek mennyiségének változását is megvizsgáltuk, ezért a betegektől 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 [395], 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 [396]. Az ISR-ben lecsökkent miR-126 és miR-34 a vaszkuláris gyulladós folyamatokban töltnek be funkciót, amit már mások azonosítottak [397, 398], 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 (**83. ábra**).

6.6 A szérum/plazma HE4 fehérje egy új diagnosztikai és követéses biomarker CF-ben és a fokozott HE4 expressziót elősegíti a CF-es légúti epithelsejtek gyulladós 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 [219]. A CF diagnózisának alapja a családi anamnézis, az újszülöttkori szűrés pozitív eredménye vagy a klinikus által felvetett gyanú, valamint az emelkedett verejték klorid teszteredmény és két *transz* helyzetben lévő patogén CFTR mutáció azonosítása [234]. Ugyanakkor a tüdőbetegség monitorizálására a klinikai gyakorlatban használt standard vizsgálati lehetőségek, így a spirometria korlátozott értékűek vagy a tüdő funkcionális MR vizsgálata korlátozott az elérhetőségük [399], 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 [223], ami alapján kézenfekvőnek tűnik a gyulladós biomarkerek meghatározása különböző testváladékokból a betegség aktivitásának követése céljából. A BAL mintából meghatározott gyulladós biomarkerek között vannak erős prognosztikai vagy prediktív értékkel bíró mediátorok, pl. NE [400], 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 interindividuális variabilitása [401]. 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 [402], valamint a plazma IL-8 [403] 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 [404].

A HE4 rutinszerű mérése elsőként epitheliális petefészekrákban került bevezetésre tumor markerként [231]. Azóta számos közlemény bizonyította, hogy a CA 125-höz képest nagyobb diagnosztikus értékkel bír a tumorok ezen formájában [405], de egyéb tumorokban, pl. tüdőrák is megemelkedhet a szintje [233]. Kóros HE4 szintek viszont nemcsak malignitásokban, hanem egyéb, nem daganatos betegségekben is kimutathatók, így pl. tüdőtuberculosisban [406]. 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 betegekből származó tüdőbiopsziás mintákban [228]. Azt viszont nem vizsgálták, hogy a fokozott pulmonális HE4 expresszió vezethet-e emelkedett szérumszinthez 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 [245], különösen a rendkívül drága CFTR-specifikus kezelés követésére [399], ezért nagy népegészségügyi jelentősége van új laboratóriumi tesztek kidolgozásának.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy mind a gyermek, mind a felnőtt nem kezelt CF-es betegek szérumszintjeiben szignifikánsan magasabb HE4 koncentráció mérhető az egészséges személyek, illetve a nem CF-es tüdőbetegek szintjeihez 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 [407]. Bár az életkor általában befolyásolja a HE4 értékek alakulását [408], 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 [409]. A súlyos tüneteket mutató CF-es betegekben lemerített 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 szérumszintű 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 szérumszintű 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 szérums 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 szérums HE4 a CF-es légúti hám által fokozott termelt fehérjének lehet köszönhető. Eredményeinket alátámasztotta Clarke és munkatársainak egyik korábbi munkája, amiben a *WFDC2* gént a fokozott expressziót mutató gének között igazolták a CF-es orrnyálkahártya mintákban [410]. Számos közlemény vizsgálta előzőekben a gének gyulladás indukálta expresszió változását CF-ben [411, 412]. A fokozott expressziót mutató gének enyhe CF-ben inkább a lipid metabolizmusban, a G-proteinhez kapcsolt receptor expresszióban, valamint az iontranszportok regulációjában játszottak szerepet, míg súlyos CF-ben az oxidoreduktáz folyamatokban és az ubiquitin ciklusban vettek részt [412]. Érdekes módon mások a p.Phe508del-CFTR mutációnak csak minimális hatását találták a génexpressziós profilra a CF-es légúti epitheliális sejt kultúrákban [413]. A HE4 transzkripció szabályozása viszont ezidáig nem volt kellően ismert. A HE4-nek mint tumormarkernak a kóros termelődése CF-ben összefügghet azzal, hogy a bronchoepithelsejtek kevésbé differenciált állapotban vannak a nem CF-es körülményekhez képest [414]. Génexpressziós profilok metaanalízise alapján a CF-es nazális epithelsejtek profilja jelentős átfedést mutatott a nem differenciált epithélium fenotípus génjeivel [415]. Ezen túlmenően, 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 [416]. Hasonlóan, a HE4 promóter régiójától -322 pozícióban is leírtak egy NF- κ B kötőhelyet [417]. Így feltételeztük, hogy a HE4 transzkripciója az NF- κ B útvonal befolyása alatt is 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 [418]. 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 [419], továbbá az IVA, vagy a LUM/IVA terápia jelentősen csökkentette a bakteriális fertőzés (*P. aeruginosa*) indukálta proinflammatorikus citokinek termelődését a macrophag funkció javításával [420]. Alacsonyabb CXCL8 expressziót és p38 MAPK foszforilációt detektáltak a CFBE sejtekben Orkambi® kezelést követően [421]. A

CFTR korrektorok és potenciátorok gyulladáscsökkentő képességéről csak klinikai vizsgálatokból származó közvetett bizonyítékok álltak rendelkezésre [418, 422]. Ezért is fontos a CFTR-modulátorok ilyen típusú hatásának *in vitro* vizsgálatokkal történő alátámasztása [423].

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 expresszáló 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 expresszáló kontroll sejtek eredményeihez hasonlítottuk. Kiemelendő, hogy F508del-CFTR CFBE sejtek felülúszójában 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 [226, 424-426].

A CFTR modulátorok általi CFTR-csatorna funkció korrekciót korábban *in vitro* vizsgálatok már igazolták CF-es epithelsejt kultúrákban [425, 426], de patch-clamp technikával mi is igazoltuk a CFTR funkció helyreállítását a CFTR modulátorok által egy korábbi publikációban bemutatott módszer alapján [262]. 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 [262]. 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 expresszáló 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 [226].

A HE4 expresszió és a gyulladási sejtaktiváció lehetséges kapcsolatát is vizsgáltuk, amikor TNF- α -val kezelt F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtenyészeten a HE4 mRNS szint már 1 óra 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 gyulladási citokinek emelkedett szintjével párhuzamosan a HE4 bazális expressziója is megnövekedett, tehát tovább fokozódhat gyulladási körülmények között. Hasonló HE4 expresszió időbeli változást mutattak ki az NF- κ B jelátvitellel asszociált TLR2-mediált út vonalon keresztül tumorsejtekben [427]. Az ugyancsak a WFDC fehérjecsaldába tartozó SLPI és az Elafin termelődése hasonlóan indukálható volt TNF- α -val humán alveoláris epithelsejtekben [428].

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 41o⁻ 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 [424]. 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.

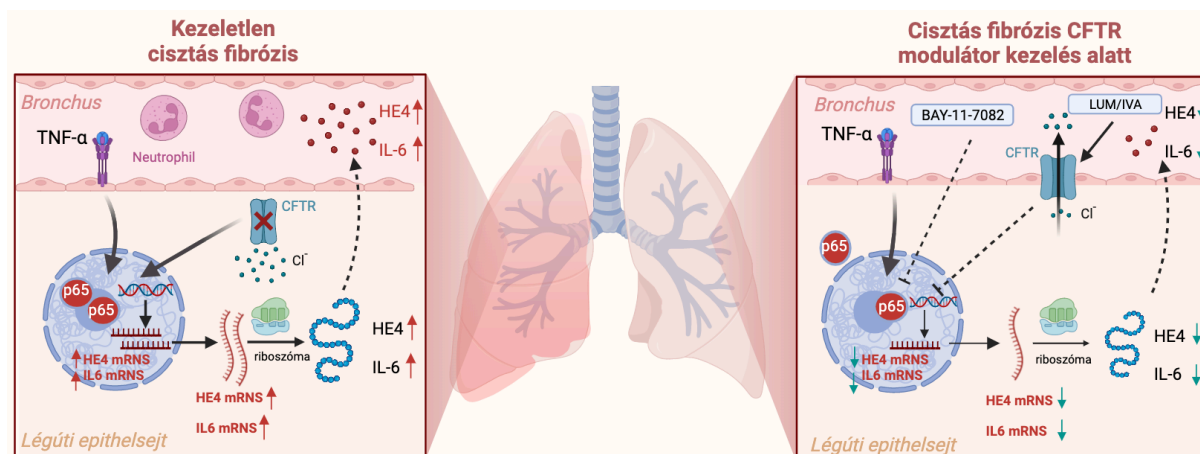
Ezt követően kíváncsiak voltunk arra, hogy a LUM/IVA vagy a TEZ/IVA kezelés képes-e csökkenteni az alap és a TNF- α aktivált NF- κ B jelátvitelt, amely folyamat végsősoron felelős lenne a felülúszóban mért csökkent HE4 plazmaszintekért a CFTR-specifikus terápia alatt. A CFTR modulátorok nemcsak az aktiválatlan 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 [418, 429]. A CF-es légúti epithelsejtek gyulladásozó 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 [419]. Az Orkambi® kezelés helyreállította a CFTR-dependens kloridáramot [429] és javította a sérült légúti epithélium gyógyulását [430]. Végül a Symdeko® (TEZ/IVA) terápia szintén csökkentette a szérum IL-1 β szintet CF-es betegekben [419].

Érdekes módon léteznek olyan irodalmi adatok is, amelyek ellentmondanak a fenti eredményeknek. Stanton és munkatársai egy *P. aeruginosa* törzs (PAO1) alkalmazásával magasabb IL-6 és IL-8 expressziót találtak CFBE sejtekben, azonban sem a LUM, sem a LUM/IVA kombinált kezelés nem csökkentette a kiindulási (nem fertőzött sejtek) vagy a PAO1 által indukált citokin termelődést [431]. Eredményeik szerint a baktériummal fertőzött CFBE sejtekben a CFTR modulátorok nem tudták a kloridáramot helyreállítani. Ugyanakkor egy másik munkacsoport szerint a PAO1 kezelt F508del-CFTR pozitív CFBE sejtekben az Orkambi® kezelés egy, a *P. aeruginosa* fertőzést elimináló antimikrobiális peptid (6K-F17), illetve a *tobramycin* jelenlétében képes volt helyreállítani a CFTR funkciót és csökkenteni az IL-6, IL-8 és TNF- α szinteket [432]. Véleményünk szerint a fenti vizsgálataink alátámasztják a CFTR modulátorok intraepitheliális gyulladásozó folyamatokat csökkentő tulajdonságát.

Mivel a F508del-CFTR pozitív CFBE 41o⁺ sejtekben az NF- κ B útvonal megnövekedett alapaktivitását találtuk, megvizsgáltuk, hogy egy specifikus NF- κ B útvonal inhibitorral (BAY 11-7082) gátolható-e a HE4 expressziója. Az NF- κ B inhibitor szignifikánsan csökkentette nem csak az alap, de az indukált HE4 és IL-6 koncentrációt is. Az eredmény arra utal, hogy az NF- κ B 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- κ B 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. Bár Bitam és munkatársai 6 órás TNF- α kezelés hatására fokozott CFTR érést és következményes növekvő kloridáramot detektáltak F508del-CFTR-t transzfektált HeLa sejtekben és primer

bronchoepitheliális sejt kultúrákban, a későbbi időpontban (24 óra után) a CFTR funkció már alig javult a kontroll mintákhoz képest [433]. Így nem gondoljuk, hogy a CFTR funkció TNF- α által indukált esetleges javulása számottevően befolyásolta volna a HE4 szinteket a saját kísérletes körülményeink között. 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- κ B út vonal kóros aktivitása (**84. ábra**).



84. ábra A kóros HE4 expresszió regulációjában résztvevő CFTR-csatorna által mediált, valamint egyéb stimulusok (pl. TNF- α) által kiváltott intracelluláris gyulladási folyamatok CF-es bronchoepitheliális sejtekben. Csökkent CFTR expresszió vagy nem megfelelő csatorna működés esetén, valamint gyulladási környezetben a HE4 bazális termelődése jelentősen megnő egyéb citokinnel (pl. IL-6) együtt (bal oldal). Amennyiben a CFTR funkció korrigálódik CFTR-specifikus kezelés (pl. LUM/IVA, Orkambi[®]) hatására és/vagy az NF- κ B út vonal gátlása révén (pl. BAY 11-7082) jelentősen csökken a HE4 és az IL-6 expressziója (jobb oldal). Az ábra a Biorender.com program segítségével került megszerkesztésre.

A CFTR funkció helyreállítása konzekvensen alacsonyabb HE4 szinteket eredményezett *in vitro* kísérleteink során, ami összhangban volt a különböző CFTR modulátor kezelések alatt álló CF-es betegcsoportok plazma mintáinak mért csökkenő HE4 értékekkel. Munkacsoportunk elsőként vizsgálta a plazma HE4 lehetséges biomarker szerepét a CFTR modulátor kezelések 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 [238, 266, 267]. 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 [434]. Bár szoros összefüggés mutatkozott a HE4 és a CRP értékek között a vizsgálati populációkban, 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 [239, 268], mivel a betegek kb. 80%-a a p.Phe508del-CFTR variánst hordozza [217]. 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 [419], illetve egy friss közlemény alapján a *tezacaftor/elixacaftor/ivacaftor* kezelést legérzékenyebben a plazma HE4 követte szemben az IL-6, IL-8 és MMP-9 értékekkel [435]. Az utóbbi CFTR-specifikus terápia monitorozására munkacsoportunk jelenleg is teszteli a HE4-t.

Jelenleg még nem tisztázott, hogy mi lehet a HE4 fehérje funkcionális szerepe a CF-es tüdőbetegség lezajlásában. A fehérje ismert tulajdonságai és a gyulladással való szoros kapcsolata alapján feltételezzük, hogy a CF-es gyulladással járó folyamatok által kiváltott immunológiai válasz következményeként tovább fokozódik az expressziója a tüdőbetegség progressziójában [229]. COPD-ben maga a cigarettafüst is képes fokozni a HE4 expressziót a bronchiális epithelsejtekben, ami további IL-6 felszabaduláshoz is vezet az NF- κ B útvonal aktiválódásán keresztül [436]. Antiproteáz aktivitása révén gátolja a MMP-9 aktivitását *in vitro* [437], mely enzim részt vesz az extracelluláris mátrix degradációjában CF-ben [438]. A fibroblaszt eredetű HE4 vesefibrózist indukált egy egérmodellben az MMP-9 gátlása révén, ami HE4-ellenes blokkoló antitest segítségével megelőzhető volt [439]. A hipoxia a HE4 expresszió indukálásán keresztül vesefibrózist váltott ki a HIF-1 α /HE4/NF- κ B szignalizáción keresztül [440]. Mi több, nem CF-es primer tüdőfibrózisban is emelkedett szérumban HE4 koncentrációkat találtak nemrégiben [441]. Így összességében lehetséges, hogy a tartósan magas HE4 szint a metalloproteinázok, pl. az MMP-9 gátlásán át hozzájárulhat a CF-es tüdő fibrotikus átépüléséhez. Ennek bizonyításához további vizsgálatok szükségesek.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a szervezetben bárhol, bármely okból kiváltott akut vagy krónikus gyulladás képes különböző sejttípusokban - sokszor egyidőben - olyan káros 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.

7 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, szekréción 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 megakaryocita-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 obezitásban 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 megakaryocita-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 transzkripciós és poszttranszkripciós 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 gyulladásoz folyamatoknak a következménye.

8 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 témavezetésemet, 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 végeztek 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, Berhész 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.

9 REFERENCIÁK

1. Machlus KR, Italiano Jr. JE. The incredible journey: from megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol.* 2013; 201(6):785–96.
2. Lefrançais E, Ortiz-Muñoz G, Cadrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, Thornton EE, Headley MB, David T, Coughlin SR, Krummel MF, Leavitt AD, Passequé E, Looney MR. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature.* 2017; 544: 105-109.
3. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 2002; 8: 1227-1234.
4. van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol.* 2019; 16(3): 166-79.
5. Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets in lung biology. *Annu Rev Physiol.* 2013; 75: 569-91.
6. Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Circ Res.* 2018; 122: 337-351.
7. Yan C, Wu H, Fang X, He J, Zhu F. Platelet, a key regulator of innate and adaptive immunity. *Front Med (Lausanne).* 2023; 10: 1074878.
8. Middleton EA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets in Pulmonary Immune Responses and Inflammatory Lung Diseases. *Physiol Rev.* 2016; 96(4): 1211-59.
9. Cognasse F, Nguyen KA, Damien P, McNicol A, Pozzetto B, Hamzeh-Cognasse H, Garraud O. The Inflammatory Role of Platelets via Their TLRs and Siglec Receptors. *Front Immunol.* 2015; 6: 83.
10. Rondina MT, Schwertz H, Harris ES, Kraemer BF, Campbell RA, Mackman N, Grissom CK, Weyrich AS, Zimmerman GA. The septic milieu triggers expression of spliced tissue factor mRNA in human platelets. *J Thromb Haemost.* 2011; 9(4): 748-58.
11. Youssefian T, Drouin A, Massé JM, Guichard J, Cramer EM. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood.* 2002; 99(11): 4021-9.
12. Sagar RC, Ajjan RA, Naseem KM. Non-Traditional Pathways for Platelet Pathophysiology in Diabetes: Implications for Future Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9): 4973.

13. Kaur R, Kaur, M, Singh J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: Molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc Diabetol*. 2018; 17: 121.
14. Rao AK, Freishtat RJ, Jalagadugula G, Singh A, Mao G, Wiles A, Cheung P, Boden G. Alterations in insulin-signaling and coagulation pathways in platelets during hyperglycemia-hyperinsulinemia in healthy non-diabetic subject. *Thromb Res*. 2014; 134: 704-710.
15. Hamzeh-Cognasse H, Berthelot P, Tardy B, Pozzetto B, Bourlet T, Laradi S, Garraud O, Cognasse F. Platelet toll-like receptors are crucial sensors of infectious danger moieties. *Platelets*. 2018; 29: 533-540.
16. Ferroni P, Basili S, Davi G. Platelet activation, inflammatory mediators and hypercholesterolemia. *Curr Vasc Pharmacol*. 2003; 1(2): 157-69.
17. Santilli F, Vazzana N, Liani R, Guagnano MT, Davi G. Platelet activation in obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev*. 2012; 13(1): 27-42.
18. Nagy B Jr, Debreceni IB, Kappelmayer J. Flow Cytometric Investigation of Classical and Alternative Platelet Activation Markers. *EJIFCC*. 2013; 23(4): 124-34.
19. 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.
20. Rolling CC, Barrett TJ, Berger JS. Platelet-monocyte aggregates: molecular mediators of thromboinflammation. *Front Cardiovasc Med*. 2023; 10: 960398.
21. Huang J, Zhang P, Solari FA, Sickmann A, Garcia A, Jurk K, Heemskerk JWM. Molecular Proteomics and Signalling of Human Platelets in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(18): 9860.
22. Gresele P, Momi S. Novel approaches to antiplatelet therapy. *Biochem Pharmacol*. 2022; 206: 115297.
23. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*. 1999; 94(11): 3791-9.
24. Brisson AR, Tan S, Linares R, Gounou C, Arraud N. Extracellular vesicles from activated platelets: a semiquantitative cryo-electron microscopy and immuno-gold labeling study. *Platelets*. 2017; 28(3): 263-71.

25. van der Zee PM, Bíró É, Ko Y, de Winter RJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R. P- selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. *Clin Chem*. 2006; 52: 657-64.
26. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Panteleev MA, Krymskaya OV, Ataullakhanov FI. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost*. 2007; 97: 425-34.
27. Aatonen MT, Ohman T, Nyman TA, Laitinen S, Grönholm M, Siljander PR. Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014; 3: 24692.
28. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science*. 2010; 327(5965): 580–3.
29. Clemetson KJ. The origins of major platelet receptor nomenclature. *Platelets*. 2017; 28(1): 40-42.
30. Kim S, Kunapuli SP. P2Y12 receptor in platelet activation. *Platelets*. 2011; 22: 54–58.
31. Andre P, Delaney SM, LaRocca T, Vincent D, DeGuzman F, Jurek M, Koller B, Phillips DR, Conley PB. P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J Clin Invest*. 2003; 112(3): 398-406.
32. Garcia AE, Mada SR, Rico MC, Dela Cadena RA, Kunapuli SP. Clopidogrel, a P2Y12 receptor antagonist, potentiates the inflammatory response in a rat model of peptidoglycan polysaccharide-induced arthritis. *PLoS One*. 2011; 6(10): e26035.
33. Liverani E, Rico MC, Tsygankov AY, Kilpatrick LE, Kunapuli SP. P2Y12 Receptor Modulates Sepsis-Induced Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016; 36(5): 961-71.
34. Passacuale G, Sharma P, Perera D, Ferro A. Antiplatelet therapy in cardiovascular disease: Current status and future directions. *Br J Clin Pharmacol*. 2022; 88(6): 2686-99.
35. Zaid Y, Senhaji N, Naya A, Fadainia C, Kojok K. PKCs in thrombus formation. *Pathol Biol (Paris)*. 2015; 63(6): 268-71.
36. Parker PJ, Murray-Rust J. PKC at a glance. *J Cell Sci*. 2004; 117(Pt 2): 131-2.

37. Gilio K, Harper MT, Cosemans JM, Konopatskaya O, Munnix IC, Prinzen L, Leitges M, Liu Q, Molkentin JD, Heemskerk JW, Poole AW. Functional divergence of platelet protein kinase C (PKC) isoforms in thrombus formation on collagen. *J Biol Chem*. 2010; 285(30): 23410-9.
38. Harper MT, Poole AW. Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. *J Thromb Haemost*. 2010; 8(3): 454-62.
39. Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, Toker A. Regulation of protein kinase C ζ by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol*. 1998; 8: 1069-77.
40. Fox CS, Coady S, Sorlie PD. Trends in cardiovascular complications of diabetes. *JAMA*. 2004; 292: 2495-9.
41. Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost*. 2004; 2: 1282-1291.
42. Ferreira JL, Gomez-Hospital JA, Angiolillo DJ. Platelet abnormalities in diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res*. 2010;7:251-9.
43. Stratmann B, Tschoepe D. Atherogenesis and atherothrombosis— focus on diabetes mellitus. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009; 23: 291-303.
44. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet*. 2014; 383: 1068-83.
45. Matsuno H, Tokuda H, Ishisaki A, Zhou Y, Kitajima Y, Kozawa O. P2Y₁₂ receptors play a significant role in the development of platelet microaggregation in patients with diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90: 920-7.
46. Sudic D, Razmara M, Forslund M, Ji Q, Hjemdahl P, Li N. High glucose levels enhance platelet activation: involvement of multiple mechanisms. *Br J Haematol*. 2006; 133: 315-22.
47. Ferreira IA, Mocking AI, Feijge MA, Gorter G, van Haefen TW, Heemskerk JW, Akkerman JW. Platelet inhibition by insulin is absent in type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 417-22.
48. Tschoepe D. The activated megakaryocyte-platelet-system in vascular disease: focus on diabetes. *Semin Thromb Hemost*. 1995; 21: 152-160.

49. Fadini GP, Ferraro F, Quaini F, Asahara T, Madeddu P. Concise review: diabetes, the bone marrow niche, and impaired vascular regeneration. *Stem Cells Transl Med.* 2014; 3: 949–57.
50. Kraakman MJ, Lee MK, Al-Sharea A, Dragoljevic D, Barrett TJ, Montenont E, Basu D, Heywood S, Kammoun HL, Flynn M, Whillas A, Hanssen NM, Febbraio MA, Westein E, Fisher EA, Chin-Dusting J, Cooper ME, Berger JS, Goldberg IJ, Nagareddy PR, Murphy AJ. Neutrophil-derived S100 calcium-binding proteins A8/A9 promote reticulated thrombocytosis and atherogenesis in diabetes. *J Clin Invest.* 2017; 127: 2133–47.
51. Undas A, Wiek I, Stêpien E, Zmudka K, Tracz W. Hyperglycemia is associated with enhanced thrombin formation, platelet activation, and fibrin clot resistance to lysis in patients with acute coronary syndrome. *Diabetes Care.* 2008; 31(8): 1590-5.
52. Rondina MT, Weyrich AS. Regulation of the genetic code in megakaryocytes and platelets. *J Thromb Haemost.* 2015; 13 Suppl 1: S26-32.
53. Gallistl S, Sudi KM, Borkenstein M, Weinhandl G, Zotter H, Muntean W. Correlation between cholesterol, soluble P-selectin, and D-dimer in obese children and adolescents. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2000; 11(8): 755-60.
54. Davì G, Guagnano MT, Ciabattoni G, Basili S, Falco A, Marinopicolì M, Nutini M, Sensi S, Patrono C. Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. *JAMA.* 2002; 288: 2008–14.
55. Santilli F, Liani R, Di Fulvio P, Formoso G, Simeone P, Tripaldi R, Ueland T, Aukrust P, Davì G. Increased circulating resistin is associated with insulin resistance, oxidative stress and platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *Thromb Haemost.* 2016; 116: 1089–99.
56. Basili S, Pacini G, Guagnano MT, Manigrasso MR, Santilli F, Pettinella C, Ciabattoni G, Patrono C, Davì G. Insulin resistance as a determinant of platelet activation in obese women. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48(12): 2531-8.
57. 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.

58. Tremoli E, Colli S, Maderna P, Baldassarre D, Di Minno G. Hypercholesterolemia and platelets. *Semin Thromb Hemost.* 1993; 19: 115–21.
59. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002; 420: 868–74.
60. Davi G, Averna M, Catalano I, Barbagallo C, Ganci A, Notarbartolo A, Ciabattini G, Patrono C. Increased thromboxane biosynthesis in type IIa hypercholesterolemia. *Circulation.* 1992; 85: 1792–8.
61. Lacoste L, Lam JY, Hung J, Letchacovski G, Solymoss CB, Waters D. Hyperlipidemia and coronary disease. Correction of the increased thrombogenic potential with cholesterol reduction. *Circulation.* 1995; 92: 3172–7.
62. Calkin AC, Drew BG, Ono A, Duffy SJ, Gordon MV, Schoenwaelder SM, Sviridov D, Cooper ME, Kingwell BA, Jackson SP. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates platelet function in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux. *Circulation.* 2009; 120: 2095–104.
63. Korporaal SJ, Relou IA, van Eck M, Strasser V, Bezemer M, Gorter G, van Berkel TJ, Nimpf J, Akkerman JW, Lenting PJ. Binding of low-density lipoprotein to platelet apolipoprotein E receptor 2 ϵ results in phosphorylation of p38MAPK. *J Biol Chem.* 2004; 279: 52526–34.
64. Korporaal SJ, van Eck M, Adelmeijer J, Ijsseldijk M, Out R, Lisman T, Lenting PJ, van Berkel TJ, Akkerman JW. Platelet activation by oxidized low-density lipoprotein is mediated by CD36 and scavenger receptor-A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 2476–83.
65. Quinton TM, Kim S, Jin J, Kunapuli SP. Lipid rafts are required in Galpha(i) signaling downstream of the P2Y12 receptor during ADP- mediated platelet activation. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 1036–41.
66. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Sock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016; 315(8): 801-10.
67. de Stoppelaar SF, van 't Veer C, van der Poll T. The role of platelets in sepsis. *Thromb Haemost.* 2014; 112(4): 666-77.
68. Vardon-Bounes F, Ruiz S, Gratacap MP, Garcia C, Payrastre B, Minville V. Platelets are critical key players in sepsis. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(14): 3494.

69. Dewitte A, Lepreux S, Villeneuve J, Rigotherier C, Combe C, Ouattara A, Ripoche J. Blood platelets and sepsis pathophysiology: A new therapeutic prospect in critically ill patients? *Ann Intensive Care*. 2017; 7(1): 115.
70. Reid VL, Webster NR. Role of microparticles in sepsis. *Br J Anaesth*. 2012; 109(4): 503-13.
71. Joop K, Berckmans RJ, Nieuwland R, Berkhout J, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb Haemost*. 2001; 85(5): 810-20.
72. Russwurm S, Vickers J, Meier-Hellmann A, Spangenberg P, Bredle D, Reinhart K, Lösche W. Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock*. 2002; 17(4): 263-8.
73. Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S, Neumann FJ. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med*. 1997; 23(4): 379-85.
74. Akinosoglou K, Theodoraki S, Xanthopoulou I, Perperis A, Gkavogianni T, Pistiki A, Giamarellos-Bourboulis E, Gogos CA. Platelet reactivity in sepsis syndrome: results from the PRESS study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017; 36(12): 2503-12.
75. Yaguchi A, Lobo FL, Vincent JL, Pradier O. Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost*. 2004; 2(12): 2096-102.
76. Adamzik M, Görlinger K, Peters J, Hartmann M. Whole blood impedance aggregometry as a biomarker for the diagnosis and prognosis of severe sepsis. *Crit Care*. 2012; 16(5): R204.
77. Assinger A, Schrottmaier WC, Salzman M, Rayes J. Platelets in sepsis: An update on experimental models and clinical data. *Front Immunol*. 2019; 10: 1687.
78. Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K. Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Invest*. 1995; 25(11):843-51.
79. Rondina MT, Carlisle M, Fraughton T, Brown SM, Miller RR 3rd, Harris ES, Weyrich AS, Zimmerman GA, Supiano MA, Grissom CK. Platelet-monocyte aggregate formation and mortality risk in older patients with severe sepsis and septic shock. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015; 70(2): 225-31.
80. Mosad E, Elsayh KI, Eltayeb AA. Tissue factor pathway inhibitor and P-selectin as markers of sepsis-induced non-overt disseminated intravascular coagulopathy. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2011; 17(1): 80-7.

81. O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13(6): 453-60.
82. D' Atri LP, Schattner M. Platelet toll-like receptors in thromboinflammation. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2017; 22: 1867-83.
83. Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KV, Patel KD, Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood.* 2005; 106(7): 2417-23.
84. Montrucchio G, Bosco O, Del Sorbo L, Fascio Pecetto P, Lupia E, Goffi A, Omedè P, Emanuelli G, Camussi G. Mechanisms of the priming effect of low doses of lipopoly-saccharides on leukocyte-dependent platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost.* 2003; 90(5): 872-81.
85. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Delezay O, Pozzetto B, McNicol A, Garraud O. Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *Br J Haematol.* 2008; 141(1): 84-91.
86. Cox D, Kerrigan SW, Watson SP. Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *J Thromb Haemost.* 2011; 9(6): 1097-107.
87. Blair P, Rex S, Vitseva O, et al. Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide 3-kinase. *Circ Res.* 2009; 104(3): 346-54.
88. Beaulieu LM, Lin E, Morin KM, Tanriverdi K, Freedman JE. Regulatory effects of TLR2 on megakaryocytic cell function. *Blood.* 2011; 117(22): 5963-74.
89. Beaulieu LM, Freedman JE. The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes. *Thromb Res.* 2010; 125(3): 205-9.
90. Schattner MJ. Platelet TLR4 at the crossroads of thrombosis and the innate immune response. *Leukoc Biol.* 2019; 105(5): 873-80.
91. Tsujimoto H, Ono S, Efron PA, Scumpia PO, Moldawer LL, Mochizuki H. Role of Toll-like receptors in the development of sepsis. *Shock.* 2008; 29(3): 315-21.
92. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010; 140(6): 805-20.

93. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008; 42(2): 145-51.
94. Spinelli SL, Casey AE, Pollock SJ, Gertz JM, McMillan DH, Narasipura SD, Mody NA, King MR, Maggirwar SB, Francis CW, Taubman MB, Blumberg N, Phipps RP. Platelets and megakaryocytes contain functional nuclear factor-kappaB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30(3): 591-8.
95. Kojok K, El-Kadiry AE, Merhi Y. Role of NF- κ B in Platelet Function. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(17): 4185.
96. Bray PF, McKenzie SE, Edelstein LC, Nagalla S, Delgrosso K, Ertel A, Kupper J, Jing Y, Londin E, Loher P, Chen HW, Fortina P, Rigoutsos I. The complex transcriptional landscape of the anucleate human platelet. *BMC Genomics*. 2013; 14(1): 1.
97. Angénieux C, Maître B, Eckly A, Lanza F, Gachet C, de la Salle H. Time-Dependent Decay of mRNA and Ribosomal RNA during Platelet Aging and Its Correlation with Translation Activity. *PLoS One*. 2016; 11(1): e0148064.
98. Teruel-Montoya R, Kong X, Abraham S, et al. MicroRNA expression differences in human hematopoietic cell lineages enable regulated transgene expression. *PLoS One*. 2014; 9(7): e102259.
99. Schubert S, Weyrich AS, Rowley JW. A tour through the transcriptional landscape of platelets. *Blood*. 2014; 124(4): 493–502.
100. Bray PF, Shuman MA. Identification of an abnormal gene for the GPIIIa subunit of the platelet fibrinogen receptor resulting in Glanzmann's thrombasthenia. *Blood*. 1990; 75(4): 881–8.
101. Bray PF, Leung CS, Shuman MA. Human platelets and megakaryocytes contain alternately spliced glycoprotein IIb mRNAs. *J Biol Chem*. 1990; 265(17): 9587–90.
102. Rowley JW, Oler AJ, Tolley ND, Hunter BN, Low EN, Nix DA, Yost CC, Zimmerman GA, Weyrich AS. Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood*. 2011; 118(14): e101-11.
103. McRedmond JP, Park SD, Reilly DF, Coppinger JA, Maguire PB, Shields DC, Fitzgerald DJ. Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Mol Cell Proteomics*. 2004; 3(2): 133-44.

104. Cecchetti L, Tolley ND, Michetti N, Bury L, Weyrich AS, Gresele P. Megakaryocytes differentially sort mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors into platelets: a mechanism for regulating synthetic events. *Blood*. 2011; 118: 1903-11.
105. Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost*. 2009; 7(2): 241-6.
106. Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell*. 2005; 122: 379-91.
107. Schwertz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, Tilley RE, Rondina MT, Harris EM, Kraiss LW, Mackman N, Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med*. 2006; 203(11): 2433-40.
108. Allam O, Samarani S, Jenabian MA, Routy JP, Tremblay C, Amre D, Ahmad A. Differential synthesis and release of IL-18 and IL-18 Binding Protein from human platelets and their implications for HIV infection. *Cytokine*. 2017; 90: 144-54.
109. Brogren H, Karlsson L, Andersson M, Wang L, Erlinge D, Jern S. Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1. *Blood*. 2004; 104(13): 3943-8.
110. Corduan A, Plé H, Laffont B, Wallon T, Plante I, Landry P, Provost P. Dissociation of SERPINE1 mRNA from the translational repressor proteins Ago2 and TIA-1 upon platelet activation. *Thromb Haemost*. 2015; 113 (5): 1046-59.
111. Shashkin PN, Brown GT, Ghosh A, Marathe GK, McIntyre TM. Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *J Immunol*. 2008; 181: 3495-502.
112. Hottz ED, Lopes JF, Freitas C, Valls-de-Souza R, Oliveira MF, Bozza MT, Da Poian AT, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza FA, Bozza PT. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood*. 2013; 122(20): 3405-14.
113. Weyrich AS, Denis MM, Schwertz H, Tolley ND, Foulks J, Spencer E, Kraiss LW, Albertine KH, McIntyre TM, Zimmerman GA. mTOR-dependent synthesis of Bcl-3 controls the retraction of fibrin clots by activated human platelets. *Blood*. 2007; 109(5): 1975-83.

114. Rondina MT, Voora D, Simon LM, Schwertz H, Harper JF, Lee O, Bhatlekar SC, Li Q, Eustes AS, Montenont E, Campbell RA, Tolley ND, Kosaka Y, Weyrich AS, Bray PF, Rowley JW. Longitudinal RNA-Seq Analysis of the Repeatability of Gene Expression and Splicing in Human Platelets Identifies a Platelet SELP Splice QTL. *Circ Res.* 2020; 126(4): 501-16.
115. Friedman RC, Fahr KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009; 19(1): 92-105.
116. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116: 281-97.
117. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature.* 2010; 466(7308): 835-40.
118. Croce CM, Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell.* 2005; 122(1): 6-7.
119. Rottiers V, Näär AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13(4): 239-50.
120. Wiemer EAC. The role of microRNAs in cancer: No small matter. *Eur J Cancer.* 2007; 43(10): 1529-44.
121. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004; 23(20): 4051-60.
122. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003; 425(6956): 415-9.
123. Knight SW, Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 2001; 293(5538): 2269-71.
124. Lau PW, Guiley KZ, De N, Potter CS, Carragher B, MacRae IJ. The molecular architecture of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol.* 2012; 19: 436-40.
125. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science.* 2002; 297: 2056-60.
126. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 9779-84.

127. Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*. 2002; 110: 513-20.
128. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009; 136: 642-55.
129. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, How HK, Jen LM, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010; 56: 1733-41.
130. Provost P. The clinical significance of platelet microparticle-associated microRNAs. *Clin Chem Lab Med*. 2017; 55: 657-66.
131. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(8): 581-93.
132. Tabet F, Vickers KC, Cuesta Torres LF, Wiese CB, Shoucri BM, Lambert G, Catherinet C, Prado-Lourenco L, Levin MG, Thacker S, Sethupathy P, Barter PJ, Remaley AT, Rye KA. HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nat Commun*. 2014; 5: 3292.
133. Turchinovich A, Tonevitsky AG, Burwinkel B. Extracellular miRNA: A collision of two paradigms. *Trends Biochem Sci*. 2016; 41(10): 883-92.
134. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, Mayr M. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res*. 2010; 107: 810-7.
135. Benz F, Roy S, Trautwein C, Roderburg C, Luedde T. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(1): 78.
136. Boilard E, Belleannée C. (Dicer)phering roles of microRNA in platelets. *Blood*. 2016; 127(14): 1733-4.
137. Landry P, Plante I, Ouellet DL, Perron MP, Rousseau G, Provost P. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol*. 2009; 16(9): 961-6.
138. Plé H, Landry P, Benham A, Coarfa C, Gunaratne PH, Provost P. The repertoire and features of human platelet microRNAs. *PLoS One*. 2012; 7: e50746.

139. Nagalla S, Shaw C, Kong X, Kondkar AA, Edelstein LC, Ma L, Chen J, McKnight GS, López JA, Yang L, Jin Y, Bray MS, Leal SM, Dong JF, Bray PF. Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity. *Blood*. 2011; 117: 5189-97.
140. Edelstein LC, McKenzie SE, Shaw C, Holinstat MA, Kunapuli SP, Bray PF. MicroRNAs in platelet production and activation. *J Thromb Haemost*. 2013; 11 Suppl 1: 340-350.
141. Simon LM, Edelstein LC, Nagalla S, Woodley AB, Chen ES, Kong X, Ma L, Fortina P, Kunapuli S, Holinstat M, McKenzie SE, Dong JF, Shaw CA, Bray PF. Human platelet microRNA-mRNA networks associated with age and gender revealed by integrated plateletomics. *Blood*. 2014; 123: 37-45.
142. Elgheznawy A, Shi L, Hu J, Wittig I, Laban H, Pircher J, Mann A, Provost P, Randriamboavonjy V, Fleming I. Dicer cleavage by calpain determines platelet microRNA levels and function in diabetes. *Circ Res*. 2015; 117: 157-65.
143. Rowley JW, Chappaz S, Corduan A, Chong MM, Campbell R, Khoury A, Manne BK, Wurtzel JG, Michael JV, Goldfinger LE, Mumaw MM, Nieman MT, Kile BT, Provost P, Weyrich AS. Dicer1-mediated miRNA processing shapes the mRNA profile and function of murine platelets. *Blood*. 2016; 127: 1743-51.
144. Felli N, Pedini F, Romania P, Biffoni M, Morsilli O, Castelli G, Santoro S, Chicarella S, Sorrentino A, Peschle C, Marziali G. MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis. *Haematologica*. 2009; 94: 479-86.
145. Lu J, Guo S, Ebert BL, Zhang H, Peng X, Bosco J, Pretz J, Schlanger R, Wang JY, Mak RH, Dombkowski DM, Preffer FI, Scadden DT, Golub TR. MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Dev Cell*. 2008; 14: 843-53.
146. Romania P, Lulli V, Pelosi E, Biffoni M, Peschle C, Marziali G. MicroRNA-155 modulates megakaryopoiesis at progenitor and precursor level by targeting Ets-1 and Meis1 transcription factors. *Br J Haematol*. 2008; 143: 570-80.
147. Kondkar AA, Bray MS, Leal SM, Nagalla S, Liu DJ, Jin Y, Dong JF, Ren Q, Whiteheart SW, Shaw C, Bray PF. VAMP8/endobrevin is overexpressed in hyperreactive human platelets: suggested role for platelet microRNA. *J Thromb Haemost*. 2010; 8: 369-78.

148. Kaudewitz D, Skroblin P, Bender LH, Barwari T, Willeit P, Pechlaner R, Sunderland NP, Willeit K, Morton AC, Armstrong PC, Chan MV, Lu R, Yin X, Gracio F, Dudek K, Langley SR, Zampetaki A, de Rinaldis E, Ye S, Warner TD, Saxena A, Kiechl S, Storey RF, Mayr M. Association of MicroRNAs and YRNAs With Platelet Function. *Circ Res*. 2016; 118: 420-32.
149. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, Iuliano R, Cimmino A, Aqeilan R, Volinia S, Bhatt D, Alder H, Marcucci G, Calin GA, Liu CG, Bloomfield CD, Andreeff M, Croce CM. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci*. 2006; 103: 5078-83.
150. Basak I, Bhatlekar S, Manne BK, Stoller M, Hugo S, Kong X, Ma L, Rondina MT, Weyrich AS, Edelstein LC, Bray PF. miR-15a-5p regulates expression of multiple proteins in the megakaryocyte GPVI signaling pathway. *J Thromb Haemost*. 2019; 17(3): 511-24.
151. Garcia A, Dunoyer-Geindre S, Zapilko V, Nolli S, Reny JL, Fontana P. Functional Validation of microRNA-126-3p as a Platelet Reactivity Regulator Using Human Haematopoietic Stem Cells. *Thromb Haemost*. 2019; 119(2): 254-63.
152. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007; 9: 654-9.
153. Umezu T, Ohyashiki K, Kuroda M, Ohyashiki JH. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene*. 2013; 32: 2747-55.
154. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, Sun Q, Wang K, Ba Y, Wang Q, Wang D, Yang J, Liu P, Xu T, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Molecular Cell*. 2010; 39: 133-44.
155. Shu Z, Tan J, Miao Y, and Zhang Q. The role of microvesicles containing microRNAs in vascular endothelial dysfunction. *J Cell Mol Med*. 2019; 23: 7933-45.
156. Clancy L, Freedman JE. The role of circulating platelet transcripts. *J Thromb Haemost*. 2015; 13 Suppl 1: S33-9.
157. Zaldivia MTK, McFadyen JD, Lim B, Wang X, Peter K. Platelet-derived microvesicles in cardiovascular diseases. *Front Cardiovasc Med*. 2017; 4: 74.

158. Real JM, Ferreira LRP, Esteves GH, Koyama FC, Dias MVS, Bezerra-Neto JE, Cunha-Neto E, Machado FR, Salomão R, Azevedo LCP. Exosomes from patients with septic shock convey miRNAs related to inflammation and cell cycle regulation: new signaling pathways in sepsis? *Crit Care*. 2018; 22(1): 68.
159. Laffont B, Corduan A, Plé H, Duchez AC, Cloutier N, Boilard E, Provost P. Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood*. 2013; 122(2): 253-61.
160. Pan Y, Liang H, Liu H, Li D, Chen X, Li L, Zhang CY, Zen K. Platelet-secreted microRNA-223 promotes endothelial cell apoptosis induced by advanced glycation end products via targeting the insulin-like growth factor 1 receptor. *J Immunol*. 2014; 192(1): 437-46.
161. Pordzik J, Pisarz K, De Rosa S, Jones AD, Eyileten C, Indolfi C, Malek L, Postula M. The Potential Role of Platelet-Related microRNAs in the Development of Cardiovascular Events in High-Risk Populations, Including Diabetic Patients: A Review. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9: 74.
162. Duan X, Zhan Q, Song B, Zeng S, Zhou J, Long Y, Lu J, Li Z, Yuan M, Chen X, Yang Q, Xia J. Detection of platelet microRNA expression in patients with diabetes mellitus with or without ischemic stroke. *J Diabetes Complications*. 2014; 28: 705-10.
163. Luo M, Li R, Ren M, Chen N, Deng X, Tan X, Li Y, Zeng M, Yang Y, Wan Q, Wu J. Hyperglycaemia-induced reciprocal changes in miR-30c and PAI-1 expression in platelets. *Sci Rep*. 2016; 6: 36687.
164. Shi R, Zhou X, Ji WJ, Zhang YY, Ma YQ, Zhang JQ, Li YM. The Emerging Role of miR-223 in Platelet Reactivity: Implications in Antiplatelet Therapy. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 981841.
165. Luo M, Li R, Deng X, Ren M, Chen N, Zeng M, Yan K, Xia J, Liu F, Ma W, Yang Y, Wan Q, Wu J. Platelet-derived miR-103b as a novel biomarker for the early diagnosis of type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2015; 52: 943-49.
166. Dangwal S, Stratmann B, Bang C, Lorenzen JM, Kumarswamy R, Fiedler J, Falk CS, Scholz CJ, Thum T, Tschoepe D. Impairment of Wound Healing in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus Influences Circulating MicroRNA Patterns via Inflammatory Cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015; 35: 1480-88.
167. Yao J, Lui KY, Hu X, Liu E, Zhang T, Tong L, Xu J, Huang F, Zhu Y, Lu M, Cai C. Circulating microRNAs as novel diagnostic biomarkers and prognostic predictors for septic patients. *Infect Genet Evol*. 2021; 95: 105082.

168. Trung NT, Lien TT, Sang VV, Hoan NX, Manh ND, Thau NS, Quyen DT, Hien TTT, Hoan PQ, Bang MH, Velavan TP, Song LH. Circulating miR-147b as a diagnostic marker for patients with bacterial sepsis and septic shock. *PLoS One*. 2021; 16(12): e0261228.
169. Antonakos N, Gilbert C, Th roude C, Schrijver IT, Roger T. Modes of action and diagnostic value of miRNAs in sepsis. *Front Immunol*. 2022; 13: 951798.
170. Reithmair M, Buschmann D, M rte M, Kirchner B, Hagl D, Kaufmann I, Pfob M, Chouker A, Steinlein OK, Pfaffl MW, Schelling G. Cellular and extracellular miRNAs are blood-compartment-specific diagnostic targets in sepsis. *J Cell Mol Med*. 2017; 21(10): 2403-11.
171. Maneta E, Aivalioti E, Tual-Chalot S, Emini Veseli B, Gatsiou A, Stamatelopoulos K, Stellos K. Endothelial dysfunction and immunothrombosis in sepsis. *Front Immunol*. 2023; 14: 1144229.
172. Zhang J, Defelice AF, Hanig JP, Colatsky T. Biomarkers of endothelial cell activation serve as potential surrogate markers for drug-induced vascular injury. *Toxicol Pathol*. 2010; 38(6): 856-71.
173. Skibsted S, Jones AE, Puskarich MA, Arnold R, Sherwin R, Trzeciak S, Schuetz P, Aird WC, Shapiro NI. Biomarkers of endothelial cell activation in early sepsis. *Shock*. 2013; 39: 427-32.
174. Formosa A, Turgeon P, Dos Santos CC. Role of miRNA dysregulation in sepsis. *Mol Med*. 2022; 28(1): 99.
175. Chu M, Qin S, Wu R, Zhou X, Tang X, Zhang S, Zhao Q, Wang H, Liu Y, Han X, Xiao J, Li X, Zhang C. Role of MiR-126a-3p in Endothelial Injury in Endotoxic Mice. *Crit Care Med*. 2016; 44(8): e639-e50.
176. Vestweber D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15: 692-704.
177. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Sch mig A, Neumann F. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2000; 148: 75-85.
178. de Pablo R, Monserrat J, Reyes E, D az D, Rodr guez-Zapata M, de la Hera A, Prieto A,  lvarez-Mon M. Circulating sICAM-1 and sE-Selectin as biomarker of infection and prognosis in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Eur J Intern Med*. 2013; 24: 132-8.

179. Fang Y, Li C, Shao R, Yu H, Zhang Q. The role of biomarkers of endothelial activation in predicting morbidity and mortality in patients with severe sepsis and septic shock in intensive care: a prospective observational study. *Thromb Res.* 2018; 171: 149–54.
180. Gidlöf O, van der Brug M, Ohman J, Gilje P, Olde B, Wahlestedt C, Erlinge D. Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression. *Blood.* 2013; 121: 3908-17.
181. Li J, Tan M, Xiang Q, Zhou Z, Yan H. Thrombin-activated platelet-derived exosomes regulate endothelial cell expression of ICAM-1 via microRNA-223 during the thrombosis-inflammation response. *Thromb Res.* 2017; 154: 96-105.
182. Liu RR, Li J, Gong JY, Kuang F, Liu JY, Zhang YS, Ma QL, Song CJ, Truax AD, Gao F, Yang K, Jin BQ, Chen LH. MicroRNA-141 regulates the expression level of ICAM-1 on endothelium to decrease myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015; 309(8): H1303-13.
183. Munk PS, Butt N, Larsen AI. Endothelial dysfunction predicts clinical restenosis after percutaneous coronary intervention. *Scand Cardiovasc J.* 2011; 45(3): 139-45.
184. McDonald RA, Hata A, MacLean MR, Morrell NW, Baker AH. MicroRNA and vascular remodelling in acute vascular injury and pulmonary vascular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2012; 93(4): 594-604.
185. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, Byrne RA, Collet JP, Falk V, Head SJ, Jüni P, Kastrati A, Koller A, Kristensen SD, Niebauer J, Richter DJ, Seferović PM, Sibbing D, Stefanini GG, Windecker S, Yadav R, Zembala MO. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *EuroIntervention.* 2019; 14(14): 1435-1534.
186. Boos CJ, Balakrishnan B, Jessani S, Blann AD, Lip GY. Effects of percutaneous coronary intervention on peripheral venous blood circulating endothelial cells and plasma indices of endothelial damage/dysfunction. *Chest.* 2007; 132: 1920-26.
187. McNair ED, Wells CR, Mabood Qureshi A, Basran R, Pearce C, Orvold J, Devilliers J, Prasad K. Soluble receptors for advanced glycation end products (sRAGE) as a predictor of restenosis following percutaneous coronary intervention. *Clin Cardiol.* 2010; 33: 678-85.
188. 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.

189. Horst B, Rihal CS, Holmes DR Jr, Bresnahan JF, Prasad A, Gau G, Lennon R, Lerman A. Comparison of drug-eluting and bare-metal stents for stable coronary artery disease. *JACC Cardiovasc Interventions*. 2009; 2: 321-8.
190. De Felice F, Fiorilli R, Parma A, Musto C, Nazzaro MS, Stefanini GG, Caferri G, Violini R. Comparison of one-year cardiac events with drug-eluting versus bare metal stent implantation in rescue coronary angioplasty. *Am J Cardiol*. 2011; 107: 210-14.
191. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med*. 2003; 349: 1315-23.
192. Colombo A, Iakovou I. Drug-eluting stents: The new gold standard for percutaneous coronary revascularisation. *Eur Heart J*. 2004; 25: 895-7.
193. Fauchier L, Pellegrin C, Bernard A, Clementy N, Angoulvant D, Lip GY, Babuty D. Comparison of frequency of major adverse events in patients with atrial fibrillation receiving bare-metal versus drug-eluting stents in their coronary arteries. *Am J Cardiol*. 2012; 110: 7-12.
194. Bavry AA, Bhatt DL. Appropriate use of drug-eluting stents: balancing the reduction in restenosis with the concern of late thrombosis. *Lancet*. 2008; 371: 2134-43.
195. Patel MR, Pfisterer ME, Betriu A, Widmisky P, Holmes DR Jr, O'Neill WW, Stebbins A, Van de Werf F, Armstrong PW, Granger CB; APEX-AMI Investigators. Comparison of six-month outcomes for primary percutaneous revascularization for acute myocardial infarction with drug- eluting versus bare metal stents (from the APEX-AMI study). *Am J Cardiol*. 2009; 103: 181–86.
196. Gilis-Siek N, Fijalkowski M, Jaguszewski M, Targonski R, Strozyk A, Cackowska M, Masiewicz E, Skarzynski P, Burakowski S, Chmielecki M, et al. Major adverse cardiovascular events after drug-eluting stent implantation in patients with single chronic total occlusion: A single-center registry. *J Invasive Cardiol*. 2013; 25: 567–72.
197. Ielasi A, Brugaletta S, Silvestro A, Cequier A, Iñiguez A, Serra A, Hernandez-Antolin R, Mainar V, Valgimigli M, den Heijer P, Bethencourt A, Vazquez N, Serruys P, Sabate M, Tespili M. Everolimus-eluting stent versus bare-metal stent in elderly (≥ 75 years) versus non-elderly (< 75 years) patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: insights from the examination trial. *Int J Cardiol*. 2015; 179: 73–8.

198. Uthamalingam S, Ahmado I, Selvaraj V, Dewey R, Flynn J. Long term outcomes in octogenarians undergoing percutaneous coronary intervention: Comparison of bare metal versus drug eluting stent. *Int J Cardiol.* 2015; 179: 385–89.
199. Gibson CM, Karpaliotis D, Kosmidou I, Murphy SA, Kirtane AJ, Budiu D, Ray KK, Herrmann HC, Lakkis N, Kovach R, French W, Blankenship J, Lui HH, Palabrica T, Jennings LK, Cohen DJ, Morrow DA; TIMI Study Group. Comparison of effects of bare metal versus drug-eluting stent implantation on biomarker levels following percutaneous coronary intervention for non-ST-elevation acute coronary syndrome. *Am J Cardiol.* 2006; 97: 1473–77.
200. Mahemuti A, Meneveau N, Seronde MF, Schiele F, Descotes-Genon V, Ecartot F, Blonde MC, Mercier M, Racadot E, Bassand JP. Early changes in local hemostasis activation following percutaneous coronary intervention in stable angina patients: A comparison between drug-eluting and bare metal stents. *J Thromb Thrombol.* 2009; 28: 333–41.
201. Mizia-Stec K, Gasior Z, Haberka M, Mizia M, Chmiel A, Janowska J, Holecki M, Mielczarek M, Zahorska-Markiewicz B. In-stent coronary restenosis, but not the type of stent, is associated with impaired endothelial-dependent vasodilatation. *Kardiol Pol.* 2009; 67: 9–17.
202. Munk PS, Breland UM, Aukrust P, Skadberg O, Ueland T, Larsen AI. Inflammatory response to percutaneous coronary intervention in stable coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis.* 2011; 31(1): 92-8.
203. Kei CY, Singh K, Dautov RF, Nguyen TH, Chirkov YY, Horowitz JD. Coronary "Microvascular Dysfunction": Evolving Understanding of Pathophysiology, Clinical Implications, and Potential Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(14): 11287.
204. Panoulas VF, Mastoris I, Konstantinou K, Tsepili M, Ielasi A. Everolimus-eluting stent platforms in percutaneous coronary intervention: comparative effectiveness and outcomes. *Med Devices (Auckl.)* 2015; 8: 317-29.
205. Vitiello D, Neagoe PE, Sirois MG, White M. Effect of everolimus on the immunomodulation of the human neutrophil inflammatory response and activation. *Cell Mol Immunol.* 2015; 12: 40-52.
206. Wang C, Qin L, Manes TD, Kirkiles-Smith NC, Tellides G, Pober JS. Rapamycin antagonizes TNF induction of VCAM-1 on endothelial cells by inhibiting mTORC2. *J Exp Med.* 2014; 211: 395-404.
207. Zampetaki A, Mayr M. MicroRNAs in vascular and metabolic disease. *Circ Res.* 2012; 110: 508-22.

208. De Rosa S, Fichtlscherer S, Lehmann R, Assmus B, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs. *Circulation*. 2011; 124: 1936-44.
209. Hulsmans M, Holvoet P. MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease. *Cardiovasc Res*. 2013; 100: 7-18.
210. He M, Gong Y, Shi J, Pan Z, Zou H, Sun D, Tu X, Tan X, Li J, Li W, Liu B, Xue J, Sheng L, Xiu C, Yang N, Xue H, Ding X, Yu C, Li Y. Plasma microRNAs as potential noninvasive biomarkers for in-stent restenosis. *PLoS One*. 2014; 9: e112043.
211. Sun X, Icli B, Wara AK, Belkin N, He S, Kobzik L, Hunninghake GM, Vera MP; MICU Registry, Blackwell TS, Baron RM, Feinberg MW. MicroRNA-181b regulates NF- κ B-mediated vascular inflammation. *J Clin Invest*. 2012; 122: 1973-90.
212. Kim TK, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, Harmin DA, Laptewicz M, Barbara-Haley K, Kuersten S, Markenscoff-Papadimitriou E, Kuhl D, Bito H, Worley PF, Kreiman G, Greenberg ME. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers *Nature*. 2010; 465: 182-87.
213. Brown JD, Lin CY, Duan Q, Griffin G, Federation AJ, Paranal RM, Bair S, Newton G, Lichtman A, Kung A, Yang T, Wang H, Lusinskas FW, Croce K, Bradner JE, Plutzky J. NF-kappaB directs dynamic super enhancer formation in inflammation and atherogenesis. *Mol Cell*. 2014; 56: 219-31.
214. Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*. 2012; 14: 178-92.
215. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005; 352(19): 1992-2001.
216. Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations - correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*. 2002; 19(6): 575-606.
217. ECFS Patient Registry Annual Report, 2021. (<https://www.ecfs.eu/projects/ecfs-patient-registry/annual-reports>)
218. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, Sermet I, Schwarz M, Tzetzis M, Wilschanski M, Bareil C, Bilton D, Castellani C, Cuppens H, Cutting GR, Drevínek P, Farrell P, Elborn JS, Jarvi K, Kerem B, Kerem E, Knowles M, Macek M Jr, Munck A, Radojkovic D, Seia M, Sheppard DN, Southern KW, Stuhmann M, Tullis E, Zielenski J, Pignatti PF, Ferec C. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros*. 2011; 10 Suppl 2: S86-102.

219. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr.* 2020; 109(5): 893-899.
220. Boucher RC. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends Mol Med.* 2007; 13(6): 231-240.
221. Borowitz D. CFTR, bicarbonate, and the pathophysiology of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2015; 50 Suppl 40: S24-S30.
222. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168(8): 918-51.
223. Yonker LM, Cigana C, Hurley BP, Bragonzi A. Host-pathogen interplay in the respiratory environment of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2015; 14(4): 431-39.
224. De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med.* 2016; 4(8): 662-74.
225. Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros.* 2015; 14(4): 419-30.
226. Hunter MJ, Treharne KJ, Winter AK, Cassidy DM, Land S, Mehta A. Expression of Wild-type CFTR Suppresses NF-kappaB-Driven Inflammatory Signalling. *PLoS One* 2010; 5: e11598.
227. Clauss A, Lilja H, Lundwall A. A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein. *Biochem J.* 2002; 368 (Pt1): 233-42.
228. Bingle L, Cross SS, High AS, Wallace WA, Rassl D, Yuan G, Hellstrom I, Campos MA, Bingle CD. WFDC2 (HE4): a potential role in the innate immunity of the oral cavity and respiratory tract and the development of adenocarcinomas of the lung. *Respir Res.* 2006; 7(1): 61.
229. Small DM, Doherty DF, Dougan CM, Weldon S, Taggart CC. The role of whey acidic protein four-disulfide-core proteins in respiratory health and disease. *Biol Chem.* 2017; 398(4): 425-40.
230. Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF Jr. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol.* 2006; 19(6): 847-53.

231. Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, Ledbetter JA, Schummer M, McIntosh M, Drescher C, Urban N, Hellström KE. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2003; 63(13): 3695-3700.
232. Bignotti E, Ragnoli M, Zanotti L, Calza S, Falchetti M, Lonardi S, Bergamelli S, Bandiera E, Tassi RA, Romani C, Todeschini P, Odicino FE, Facchetti F, Pecorelli S, Ravaggi A. Diagnostic and prognostic impact of serum HE4 detection in endometrial carcinoma patients. *Br J Cancer.* 2011; 104(9): 1418-25.
233. 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.
234. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, Howenstine M, McColley SA, Rock M, Rosenfeld M, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Marshall BC, Sosnay PR. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr.* 2017; 181S: S4-S15.e1.
235. Ivády G, Koczok K, Madar L, Gombos E, Toth I, Gyori K, Balogh I. Molecular Analysis of Cystic Fibrosis Patients in Hungary - An Update to the Mutational Spectrum. *J Med Biochem.* 2015; 34(1): 46-51.
236. Bell SC, Mall MA, Gutierrez H, Macek M Jr, Madge S, Davies JC, Burgel PR, Tullis E, Castaños C, Castellani C, Byrnes CA, Cathcart F, Chotirmall SH, Cosgriff R, Eichler I, Fajac I, Goss CH, Drevinek P, Farrell PM, Gravelle AM, Havermans T, Mayer-Hamblett N, Kashirskaya N, Kerem E, Mathew JL, McKone EF, Naehrlich L, Nasr SZ, Oates GR, O'Neill C, Pypops U, Raraigh KS, Rowe SM, Southern KW, Sivam S, Stephenson AL, Zampoli M, Ratjen F. The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir Med.* 2020; 8(1): 65-124.
237. Amaral MD. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *J Intern Med.* 2015; 277(2): 155-166.
238. Rowe SM, Heltshe SL, Gonska T, Donaldson SH, Borowitz D, Gelfond D, Sagel SD, Khan U, Mayer-Hamblett N, Van Dalfsen JM, Joseloff E, Ramsey BW; GOAL Investigators of the Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics Development Network. Clinical mechanism of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator potentiator ivacaftor in G551D-mediated cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014; 190(2): 175-84.

239. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, Colombo C, Davies JC, De Boeck K, Flume PA, Konstan MW, McColley SA, McCoy K, McKone EF, Munck A, Ratjen F, Rowe SM, Waltz D, Boyle MP; TRAFFIC Study Group; TRANSPORT Study Group. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med.* 2015; 373(3): 220-31.
240. Taylor-Cousar JL, Munck A, McKone EF, van der Ent CK, Moeller A, Simard C, Wang LT, Ingenito EP, McKee C, Lu Y, Lekstrom-Himes J, Elborn JS. Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *N Engl J Med.* 2017; 377(21): 2013-23.
241. Zemanick ET, Taylor-Cousar JL, Davies J, Gibson RL, Mall MA, McKone EF, McNally P, Ramsey BW, Rayment JH, Rowe SM, Tullis E, Ahluwalia N, Chu C, Ho T, Moskowitz SM, Noel S, Tian S, Waltz D, Weinstock TG, Xuan F, Wainwright CE, McColley SA. A Phase 3 Open-Label Study of Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor in Children 6 through 11 Years of Age with Cystic Fibrosis and at Least One F508del Allele. *Am J Respir Crit Care Med.* 2021; 203(12): 1522-32.
242. Szczesniak R, Heltshe SL, Stanojevic S, Mayer-Hamblett N. Use of FEV1 in cystic fibrosis epidemiologic studies and clinical trials: A statistical perspective for the clinical researcher. *J Cyst Fibros.* 2017; 16(3): 318-26.
243. Vermeulen F, Lebecque P, De Boeck K, Leal T. Biological variability of the sweat chloride in diagnostic sweat tests: A retrospective analysis. *J Cyst Fibros.* 2017; 16(1): 30-5.
244. Fidler MC, Beusmans J, Panorchan P, Van Goor F. Correlation of sweat chloride and percent predicted FEV1 in cystic fibrosis patients treated with ivacaftor. *J Cyst Fibros.* 2017; 16(1): 41-4.
245. 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.
246. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985; 28(7): 412-9.
247. Dobiášová M. Atherogenic index of plasma [log(triglycerides/HDL-cholesterol)]: theoretical and practical implications. *Clin Chem.* 2004; 50: 1113-5.

248. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992; 101(6): 1644-55.
249. Micallef M, Matsuo Y, Takayama K, Ariyasu T, Otani T, Minowada J. Differential platelet-associated factor gene expression by a panel of human cell lines with megakaryoblastic properties after treatment with phorbol myristate acetate. *Hematol Oncol*. 1994; 12(4): 163-74.
250. Schweinfurth N, Hohmann S, Deuschle M, Lederbogen F, Schloss P. Valproic acid and all trans retinoic acid differentially induce megakaryopoiesis and platelet-like particle formation from the megakaryoblastic cell line MEG-01. *Platelets*. 2010; 21(8): 648-57.
251. López E, Berna-Erro A, López JJ, Granados MP, Bermejo N, Brull JM, Salido GM, Rosado JA, Redondo PC. Role of mTOR1 and mTOR2 complexes in MEG-01 cell physiology. *Thromb Haemost*. 2015; 114(5): 969-81.
252. Miao X, Rahman MF, Jiang L, Min Y, Tan S, Xie H, Lee L, Wang M, Malmström RE, Lui WO, Li N. Thrombin-reduced miR-27b attenuates platelet angiogenic activities in vitro via enhancing platelet synthesis of anti-angiogenic thrombospondin-1. *J Thromb Haemost*. 2018; 16(4): 791-801.
253. Frydman GH, Ellett F, Jorgensen J, Marand AL, Zukerberg L, Selig MK, Tessier SN, Wong KHK, Olaleye D, Vanderburg CR, Fox JG, Tompkins RG, Irimia D. Megakaryocytes respond during sepsis and display innate immune cell behaviors. *Front Immunol*. 2023; 14: 1083339.
254. Westerweel PE, Teraa M, Rafii S, Jaspers JE, White IA, Hooper AT, Doevendans PA, Verhaar MC. Impaired endothelial progenitor cell mobilisation and dysfunctional bone marrow stroma in diabetes mellitus. *PLoS One*. 2013; 8: e60357.
255. Zhai PF, Wang F, Su R, Lin HS, Jiang CL, Yang GH, Yu J, Zhang JW. The regulatory roles of microRNA-146b-5p and its target platelet-derived growth factor receptor α (PDGFRA) in erythropoiesis and megakaryocytopoiesis. *J Biol Chem*. 2014; 289(33): 22600-13.
256. Duncan MT, Shin S, Wu JJ, Mays Z, Weng S, Bagheri N, Miller WM, Shea LD. Dynamic transcription factor activity profiles reveal key regulatory interactions during megakaryocytic and erythroid differentiation. *Biotechnol Bioeng*. 2014; 111: 2082-94.

257. Li JB, Wang HY, Yao Y, Sun QF, Liu ZH, Liu SQ, Zhuang JL, Wang YP, Liu HY. Overexpression of microRNA-138 alleviates human coronary artery endothelial cell injury and inflammatory response by inhibiting the PI3K/Akt/eNOS pathway. *J Cell Mol Med.* 2017; 21(8): 1482-91.
258. Czimmerer Z, Hulvely J, Simandi Z, Varallyay E, Havelda Z, Szabo E, Varga A, Dezso B, Balogh M, Horvath A, Domokos B, Torok Z, Nagy L, Balint BL. A versatile method to design stem-loop primer-based quantitative PCR assays for detecting small regulatory RNA molecules. *PLoS One.* 2013; 8: e55168.
259. 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: 186-91.
260. Jiao CY, Delaroché D, Burlina F, Alves ID, Chassaing G, Sagan S. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *J Biol Chem.* 2009; 284: 33957-65.
261. Mizusako H, Tagami T, Hattori K, Ozeki T. Active Drug Targeting of a Folate-Based Cyclodextrin-Doxorubicin Conjugate and the Cytotoxic Effect on Drug-Resistant Mammary Tumor Cells In Vitro. *J Pharm Sci.* 2015; 104: 2934-40.
262. Boinot C, Jollivet Souchet M, Ferru-Clément R, Becq F. Searching for combinations of small-molecule correctors to restore f508del-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and processing. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014; 350(3): 624-34.
263. Bagoly Z, Sarkady F, Magyar T, Kappelmayer J, Pongrácz E, Csiba L, Muszbek L. Comparison of a new P2Y₁₂ receptor specific platelet aggregation test with other laboratory methods in stroke patients on clopidogrel monotherapy. *PLoS One.* 2013; 8: e69417.
264. Xu ZB, Chaudhary D, Olland S, Wolfrom S, Czerwinski R, Malakian K, Lin L, Stahl ML, Joseph-McCarthy D, Benander C, Fitz L, Greco R, Somers WS, Mosyak L. Catalytic domain crystal structure of protein kinase C-theta (PKCtheta). *J Biol Chem.* 2004; 279(48): 50401-9.
265. Hortelano S, López-Fontal R, Través PG, Villa N, Grashoff C, Boscá L, Luque A. ILK mediates LPS-induced vascular adhesion receptor expression and subsequent leucocyte transendothelial migration. *Cardiovasc Res.* 2010; 86: 283-92.
266. Wood ME, Smith DJ, Reid DW, Masel PJ, France MW, Bell SC. Ivacaftor in severe cystic fibrosis lung disease and a G551D mutation. *Respirol Case Rep.* 2013; 1(2): 52-4.

267. Ronan NJ, Einarsson GG, Twomey M, Mooney D, Mullane D, NiChroinin M, O'Callaghan G, Shanahan F, Murphy DM, O'Connor OJ, Shortt CA, Tunney MM, Eustace JA, Maher MM, Elborn JS, Plant BJ. CORK Study in Cystic Fibrosis: Sustained Improvements in Ultra-Low-Dose Chest CT Scores After CFTR Modulation With Ivacaftor. *Chest*. 2018; 153(2): 395-403.
268. Sagel SD, Khan U, Heltshe SL, Clancy JP, Borowitz D, Gelfond D, Donaldson SH, Moran A, Ratjen F, VanDalfsen JM, Rowe SM. Clinical effectiveness of Lumacaftor/Ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR. A clinical trial. *Ann Am Thorac Soc*. 2021; 18(1): 75-83.
269. Harper MT, Poole AW. Isoform-specific functions of protein kinase C: the platelet paradigm. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35(Pt 5): 1005-8.
270. Kostyak JC, Kunapuli SP. PKC θ is dispensable for megakaryopoiesis. *Platelets*. 2015; 26(6): 610-1.
271. Murugappan S, Tuluc F, Dorsam RT, Shankar H, Kunapuli SP. Differential role of protein kinase C delta isoform in agonist-induced dense granule secretion in human platelets. *J Biol Chem*. 2004; 279(4): 2360-7.
272. Soriani A, Moran B, de Virgilio M, Kawakami T, Altman A, Lowell C, Eto K, Shattil SJ. A role for PKC θ in outside-in α (IIb) β 3 signaling. *J Thromb Haemost*. 2006; 4(3): 648-55.
273. Covic L, Gresser AL, Kuliopulos A. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry*. 2000; 39(18): 5458-67.
274. Cohen S, Braiman A, Shubinsky G, Ohayon A, Altman A, Isakov N. PKC θ is required for hemostasis and positive regulation of thrombin-induced platelet aggregation and alpha-granule secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 385(1): 22-7.
275. Hall KJ, Harper MT, Gilio K, Cosemans JM, Heemskerk JW, Poole AW. Genetic analysis of the role of protein kinase C θ in platelet function and thrombus formation. *PLoS One*. 2008; 3(9): e3277.
276. 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.
277. Chung SH, Polgar J, Reed GL. Protein kinase C phosphorylation of syntaxin 4 in thrombin-activated human platelets. *J Biol Chem*. 2000; 275(33): 25286-91.

278. Sun L, Mao G, Rao AK. Association of CBFA2 mutation with decreased platelet PKC-theta and impaired receptor-mediated activation of GPIIb-IIIa and pleckstrin phosphorylation: proteins regulated by CBFA2 play a role in GPIIb-IIIa activation. *Blood*. 2004; 103(3): 948-54.
279. Cifuni SM, Wagner DD, Bergmeier W. CalDAG-GEFI and protein kinase C represent alternative pathways leading to activation of integrin alphaIIb beta3 in platelets. *Blood*. 2008; 112(5): 1696-703.
280. Garcia A, Shankar H, Murugappan S, Kim S, Kunapuli SP. Regulation and functional consequences of ADP receptor-mediated ERK2 activation in platelets. *Biochem J*. 2007; 404(2): 299-308.
281. Pears CJ, Thornber K, Auger JM, Hughes CE, Grygielska B, Prottly MB, Pearce AC, Watson SP. Differential roles of the PKC novel isoforms, PKCdelta and PKCepsilon, in mouse and human platelets. *PLoS One*. 2008; 3(11): e3793.
282. Bynagari-Settipalli YS, Lakhani P, Jin J, Bhavaraju K, Rico MC, Kim S, Woulfe D, Kunapuli SP. Protein kinase C isoform ϵ negatively regulates ADP-induced calcium mobilization and thromboxane generation in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32: 1211-9.
283. Unsworth AJ, Finney BA, Navarro-Nunez L, Severin S, Watson SP, Pears CJ. Protein kinase C ϵ and protein kinase C θ double-deficient mice have a bleeding diathesis. *J Thromb Haemost*. 2012; 10(9): 1887-94.
284. Bynagari YS, Nagy Jr B, Tuluc F, Bhavaraju K, Kim S, Vijayan KV, Kunapuli SP. Mechanism of activation and functional role of protein kinase C η in human platelets. *J Biol Chem*. 2009; 284: 13413-21.
285. Cohen S, Braiman A, Shubinsky G, Isakov N. Protein kinase C-theta in platelet activation. *FEBS Lett*. 2011; 585(20): 3208-15.
286. Hu L, Chang L, Zhang Y, Zhai L, Zhang S, Qi Z, Yan H, Yan Y, Luo X, Zhang S, Wang Y, Kunapuli SP, Ye H, Ding Z. Platelets express activated P2Y₁₂ receptor in patients with diabetes mellitus. *Circulation*. 2017; 136: 817-33.
287. Olivieri F, Bonafè M, Spazzafumo L, Gobbi M, Prattichizzo F, Recchioni R, Marcheselli F, La Sala L, Galeazzi R, Rippon MR, Fulgenzi G, Angelini S, Lazzarini R, Bonfigli AR, Brugè F, Tiano L, Genovese S, Ceriello A, Boemi M, Franceschi C, Procopio AD, Testa R. Age- and glycaemia-related miR-126-3p levels in plasma and endothelial cells. *Aging*. 2014; 6: 771-87.

288. Pescador N, Pérez-Barba M, Ibarra JM, Corbatón A, Martínez-Larrad MT, Serrano-Ríos M. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. *PLoS One*. 2013; 8: e77251.
289. Willeit P, Zampetaki A, Dudek K, Kaudewitz D, King A, Kirkby NS, Crosby-Nwaobi R, Prokopi M, Drozdov I, Langley SR, Sivaprasad S, Markus HS, Mitchell JA, Warner TD, Kiechl S, Mayr M. Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation. *Circ Res*. 2013; 112: 595-600.
290. Stratz C, Nührenberg T, Fiebich BL, Amann M, Kumar A, Binder H, Hoffmann I, Valina C, Hochholzer W, Trenk D, Neumann FJ. Controlled type II diabetes mellitus has no major influence on platelet microRNA expression. Results from microarray profiling in a cohort of 60 patients. *Thromb Haemost*. 2014; 111: 902-11.
291. Szelenberger R, Karbownik MS, Kacprzak M, Synowiec E, Michlewska S, Bijak M, Zielińska M, Olender A, Saluk-Bijak J. Dysregulation in the Expression of Platelet Surface Receptors in Acute Coronary Syndrome Patients-Emphasis on P2Y12. *Biology (Basel)*. 2022; 11(5): 644.
292. Zhang Y, Ye J, Hu L, Zhang S, Zhang SH, Li Y, Kunapuli SP, Ding Z. Increased platelet activation and thrombosis in transgenic mice expressing constitutively active P2Y12. *J Thromb Haemost*. 2012; 10(10): 2149-57.
293. Jones MR, Quinton LJ, Blahna MT, Neilson JR, Fu S, Ivanov AR, Wolf DA, Mizgerd JP. Zcchc11-dependent uridylation of microRNA directs cytokine expression. *Nat Cell Biol*. 2009; 11: 1157-63.
294. Dai M, Jiang T, Luo CD, Du W, Wang M, Qiu QY, Wang H. Radiofrequency ablation reduces expression of SELP by upregulating the expression of microRNA-26a/b in the treatment of atrial fibrillation. *J Interv Card Electrophysiol*. 2022; 65(3): 663-73.
295. Káplár M, Kappelmayer J, Veszprémi A, Szabo K, Udvardy M. The possible association of *in vivo* leukocyte-platelet heterophilic aggregate formation and the development of diabetic angiopathy. *Platelets*. 2001; 12: 419-22.
296. Peters LJF, Baaten CCFMJ, Maas SL, Lu C, Nagy M, Jooss NJ, Bidzhekov K, Santovito D, Moreno-Andrés D, Jankowski J, Biessen EAL, Döring Y, Heemskerk JWM, Weber C, Kuijpers MJE, van der Vorst EPC. MicroRNA-26b Attenuates Platelet Adhesion and Aggregation in Mice. *Biomedicines*. 2022; 10(5): 983.

297. Xiang Y, Cheng J, Wang D, Hu X, Xie Y, Stitham J, Atteya G, Du J, Tang WH, Lee SH, Leslie K, Spollett G, Liu Z, Herzog E, Herzog RI, Lu J, Martin KA, Hwa J. Hyperglycaemia repression of miR-24 coordinately upregulates endothelial cell expression and secretion of von Willebrand factor. *Blood*. 2015; 125: 3377-87.
298. Randriamboavonjy V, Isaak J, Elgheznawy A, Pistrosch F, Frömel T, Yin X, Badenhoop K, Heide H, Mayr M, Fleming I. Calpain inhibition stabilizes the platelet proteome and reactivity in diabetes. *Blood*. 2012; 120: 415-23.
299. Giannella A, Ceolotto G, Radu CM, Cattelan A, Iori E, Benetti A, Fabris F, Simioni P, Avogaro A, Vigili de Kreutzenberg S. PAR-4/Ca²⁺-calpain pathway activation stimulates platelet-derived microparticles in hyperglycemic type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2021; 20(1): 77.
300. Croce K, Flaumenhaft R, Rivers M, Furie B, Furie BC, Herman IM, Potter DA. Inhibition of calpain blocks platelet secretion, aggregation, and spreading. *J Biol Chem*. 1999; 274(51): 36321-7.
301. Preston RA, Coffey JO, Materson BJ, Ledford M, Alonso AB. Elevated platelet P-selectin expression and platelet activation in high-risk patients with uncontrolled severe hypertension. *Atherosclerosis*. 2007; 192(1): 148-54.
302. Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*. 2002; 196(7): 887-96.
303. Burger PC, Wagner DD. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood*. 2003; 101(7): 2661-6.
304. De Pergola G, Pannacciulli N. Coagulation and fibrinolysis abnormalities in obesity. *J Endocrinol Invest*. 2002; 25(10): 899-904.
305. De Pergola G, Pannacciulli N, Coviello M, Scarangella A, Di Roma P, Caringella M, Venneri MT, Quaranta M, Giorgino R. sP-selectin plasma levels in obesity: association with insulin resistance and related metabolic and prothrombotic factors. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008; 18(3): 227-32.
306. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2007; 115(4): 459-67.

307. Bucciarelli P, Srámek A, Reiber JH, Rosendaal FR. Arterial intima-media thickness and its relationship with cardiovascular disease and atherosclerosis: a possible contribution of medium-sized arteries. *Thromb Haemost.* 2002; 88(6): 961-6.
308. Koyama H, Maeno T, Fukumoto S, Shoji T, Yamane T, Yokoyama H, Emoto M, Shoji T, Tahara H, Inaba M, Hino M, Shioi A, Miki T, Nishizawa Y. Platelet P-selectin expression is associated with atherosclerotic wall thickness in carotid artery in humans. *Circulation.* 2003; 108(5): 524-9.
309. Balla J, Magyar MT, Bereczki D, Valikovics A, Nagy E, Barna E, Pál A, Balla G, Csiba L, Blaskó G. Serum levels of platelet released CD40 ligand are increased in early onset occlusive carotid artery disease. *Dis Markers.* 2006; 22(3): 133-40.
310. Goichot B, Grunebaum L, Desprez D, Vinzio S, Meyer L, Schlienger JL, Lessard M, Simon C. Circulating procoagulant microparticles in obesity. *Diabetes Metab.* 2006; 32(1): 82-5.
311. Lukasik M, Rozalski M, Luzak B, Michalak M, Ambrosius W, Watala C, Kozubski W. Enhanced platelet-derived microparticle formation is associated with carotid atherosclerosis in convalescent stroke patients. *Platelets.* 2013; 24(1): 63-70.
312. Barbaux SC, Blankenberg S, Rupprecht HJ, Francomme C, Bickel C, Hafner G, Nicaud V, Meyer J, Cambien F, Tiret L. Association between P-selectin gene polymorphisms and soluble P-selectin levels and their relation to coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21(10): 1668-73.
313. Volcik KA, Ballantyne CM, Coresh J, Folsom AR, Wu KK, Boerwinkle E. P-selectin Thr715Pro polymorphism predicts P-selectin levels but not risk of incident coronary heart disease or ischemic stroke in a cohort of 14595 participants: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Atherosclerosis.* 2006; 186(1): 74-9.
314. Herrera-Maya G, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez O, Posadas-Sánchez R, Masso F, Juárez-Cedillo T, Escobedo G, Vázquez-Montero A, Fragoso JM. The Ser290Asn and Thr715Pro Polymorphisms of the SELP Gene Are Associated with A Lower Risk of Developing Acute Coronary Syndrome and Low Soluble P-Selectin Levels in A Mexican Population. *Biomolecules.* 2020; 10(2): 270.
315. Wei YS, Lan Y, Huang RY, Liu YG, Tang RG, Xu QQ, Meng LQ. Association of the single-nucleotide polymorphism and haplotype of the P-selectin gene with ischemic stroke. *J Thromb Thrombolysis.* 2009; 27(1): 75-81.

316. Davi G, Romano M, Mezzetti A, Procopio A, Iacobelli S, Antidormi T, Bucciarelli T, Alessandrini P, Cuccurullo F, Bittolo Bon G. Increased levels of soluble P-selectin in hypercholesterolemic patients. *Circulation*. 1998; 97(10): 953-7.
317. Angiolillo DJ, Capranzano P, Desai B, Shoemaker SB, Charlton R, Zenni MM, Guzman LA, Bass TA. Impact of P2Y₁₂ inhibitory effects induced by clopidogrel on platelet procoagulant activity in type 2 diabetes mellitus patients. *Thromb Res*. 2009; 124(3): 318-22.
318. Franchi F, Angiolillo DJ. Novel antiplatelet agents in acute coronary syndrome. *Nat Rev Cardiol*. 2015; 12(1): 30-47.
319. Notarbartolo A, Davi G, Averna M, Barbagallo CM, Ganci A, Giammarresi C, La Placa FP, Patrono C. Inhibition of thromboxane biosynthesis and platelet function by simvastatin in type IIa hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15(2): 247-51.
320. Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. *JAMA*. 1998; 279(20): 1643-50.
321. Osamah H, Mira R, Sorina S, Shlomo K, Michael A. Reduced platelet aggregation after fluvastatin therapy is associated with altered platelet lipid composition and drug binding to the platelets. *Br J Clin Pharmacol*. 1997; 44(1): 77-83.
322. Puccetti L, Pasqui AL, Pastorelli M, Bova G, Cercignani M, Palazzuoli A, Angori P, Auteri A, Bruni F. Time-dependent effect of statins on platelet function in hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest*. 2002; 32(12): 901-8.
323. Anderson HV, McNatt J, Clubb FJ, Herman M, Maffrand JP, DeClerck F, Ahn C, Buja LM, Willerson JT. Platelet inhibition reduces cyclic flow variations and neointimal proliferation in normal and hypercholesterolemic-atherosclerotic canine coronary arteries. *Circulation*. 2001; 104(19): 2331-7.
324. Roselaar SE, Kakkanathu PX, Daugherty A. Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apoE^{-/-} and LDL receptor^{-/-} mice. Decreasing density with disease progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16(8): 1013-8.
325. Cyrus T, Sung S, Zhao L, Funk CD, Tang S, Praticò D. Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2002; 106(10): 1282-7.

326. Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*. 1985; 57(1): 65-73.
327. Zhu L, Stalker TJ, Fong KP, Jiang H, Tran A, Crichton I, Lee EK, Neeves KB, Maloney SF, Kikutani H, Kumanogoh A, Pure E, Diamond SL, Brass LF. Disruption of SEMA4D ameliorates platelet hypersensitivity in dyslipidemia and confers protection against the development of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29(7): 1039-45.
328. Kim S, Foster C, Lecchi A, Quinton TM, Prosser DM, Jin J, Cattaneo M, Kunapuli SP. Protease-activated receptors 1 and 4 do not stimulate G(i) signaling pathways in the absence of secreted ADP and cause human platelet aggregation independently of G(i) signaling. *Blood*. 2002; 99(10): 3629-36.
329. Dangelmaier C, Jin J, Smith JB, Kunapuli SP. Potentiation of thromboxane A₂-induced platelet secretion by G_i signaling through the phosphoinositide-3 kinase pathway. *Thromb Haemost*. 2001; 85(2): 341-8.
330. Kim S, Jin J, Kunapuli SP. Akt activation in platelets depends on G_i signaling pathways. *J Biol Chem*. 2004; 279(6): 4186-95.
331. Shankar H, Garcia A, Prabhakar J, Kim S, Kunapuli SP. P2Y₁₂ receptor-mediated potentiation of thrombin-induced thromboxane A₂ generation in platelets occurs through regulation of Erk1/2 activation. *J Thromb Haemost*. 2006; 4(3): 638-47.
332. Afek A, Kogan E, Maysel-Auslender S, Mor A, Regev E, Rubinstein A, Keren G, George J. Clopidogrel attenuates atheroma formation and induces a stable plaque phenotype in apolipoprotein E knockout mice. *Microvasc Res*. 2009; 77(3):364-9.
333. Dong A, Caicedo J, Han SG, Mueller P, Saha S, Smyth SS, Gairola CG. Enhanced platelet reactivity and thrombosis in Apoe^{-/-} mice exposed to cigarette smoke is attenuated by P2Y₁₂ antagonism. *Thromb Res*. 2010; 126(4): e312-7.
334. Evans DJ, Jackman LE, Chamberlain J, Crosdale DJ, Judge HM, Jetha K, Norman KE, Francis SE, Storey RF. Platelet P2Y(12) receptor influences the vessel wall response to arterial injury and thrombosis. *Circulation*. 2009; 119(1): 116-22.
335. Bodin S, Tronchère H, Payrastré B. Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1610(2): 247-57.

336. Heemskerk JW, Feijge MA, Simonis MA, Hornstra G. Effects of dietary fatty acids on signal transduction and membrane cholesterol content in rat platelets. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1255(1): 87-97.
337. van Geffen JP, Swieringa F, van Kuijk K, Tullemans BME, Solari FA, Peng B, Clemetson KJ, Farndale RW, Dubois LJ, Sickmann A, Zahedi RP, Ahrends R, Biessen EAL, Sluimer JC, Heemskerk JWM, Kuijpers MJE. Mild hyperlipidemia in mice aggravates platelet responsiveness in thrombus formation and exploration of platelet proteome and lipidome. *Sci Rep*. 2020; 10(1): 21407.
338. McFadyen JD, Meikle PJ, Peter K. Platelet lipidomics: a window of opportunity to assess cardiovascular risk? *Eur Heart J*. 2017; 38: 2006-8.
339. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol*. 2017; 39: 517-28.
340. Hack CE, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med*. 2001; 29: S21-S27.
341. Ståhl AL, Svensson M, Mörgelin M, Svanborg C, Tarr PI, Mooney JC, Watkins SL, Johnson R, Karpman D. Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic *Escherichia coli* binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2006; 108(1): 167-76.
342. Zhang G, Han J, Welch EJ, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya TA, Malik AB, Du X, Li Z. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol*. 2009; 182(12): 7997-8004.
343. Ward JR, Bingle L, Judge HM, Brown SB, Storey RF, Whyte MK, Dower SK, Buttle DJ, Sabroe I. Agonists of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 are unable to modulate platelet activation by adenosine diphosphate and platelet activating factor. *Thromb Haemost*. 2005; 94(4): 831-8.
344. Kälisch T, Elmas E, Nguyen XD, Suvajac N, Klüter H, Borggrefe M, Dempfle CE. Endotoxin-induced effects on platelets and monocytes in an in vivo model of inflammation. *Basic Res Cardiol*. 2007; 102(5): 460-6.
345. Huber M, Kalis C, Keck S, Jiang Z, Georgel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, Beutler B, Galanos C, Freudenberg MA. R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells. *Eur J Immunol*. 2006; 36(3): 701-11.

346. Gomes NE, Brunialti MK, Mendes ME, Freudenberg M, Galanos C, Salomão R. Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. *Braz J Med Biol Res.* 2010; 43(9): 853-8.
347. Hashimoto K, Jayachandran M, Owen WG, Miller VM. Aggregation and microparticle production through toll-like receptor 4 activation in platelets from recently menopausal women. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009; 54(1): 57-62.
348. Jiang Z, Georgel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, Huber M, Kalis C, Keck S, Galanos C, Freudenberg M, Beutler B. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol.* 2005; 6(6): 565-70.
349. Freishtat RJ, Natale J, Benton AS, Cohen J, Sharron M, Wiles AA, Ngor WM, Mojgani B, Bradbury M, Degnan A, Sachdeva R, Debiase LM, Ghimbovski S, Chow M, Bunag C, Kristosturyan E, Hoffman EP. Sepsis alters the megakaryocyte-platelet transcriptional axis resulting in granzyme B-mediated lymphotoxicity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 179(6): 467-73.
350. Jayachandran M, Brunn GJ, Karnicki K, Miller RS, Owen WG, Miller VM. *In vivo* effects of lipopolysaccharide and TLR4 on platelet production and activity: implications for thrombotic risk. *J Appl Physiol (1985).* 2007; 102(1): 429-33.
351. Jayachandran M, Miller VM, Brunn GJ, Owen WG. Platelet response as a sentinel marker of toll-like receptor 4 activation in mice. *Thromb Res.* 2010; 126(5): 414-7.
352. Sunderland N, Skroblin P, Barwari T, Huntley RP, Lu R, Joshi A, Lovering RC, Mayr M. MicroRNA biomarkers and platelet reactivity: The clot thickens. *Circ Res.* 2017; 120(2): 418-35.
353. Roderburg C, Luedde M, Vargas Cardenas D, Vucur M, Scholten D, Frey N, Koch A, Trautwein C, Tacke F, Luedde T. Circulating microRNA-150 serum levels predict survival in patients with critical illness and sepsis. *PLoS One.* 2013; 8(1): e54612.
354. Martin JF, Kristensen SD, Mathur A, Grove EL, Choudry FA. The causal role of megakaryocyte-platelet hyperactivity in acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol.* 2012; 9(11): 658-70.
355. Harrison P, Goodall AH. "Message in the platelet"--more than just vestigial mRNA! *Platelets.* 2008; 19(6): 395-404.

356. Lee JH, Park M, Han S, Hwang JJ, Park SH, Park SY. An increase in mean platelet volume during admission can predict the prognoses of patients with pneumonia in the intensive care unit: A retrospective study. *PLoS One*. 2018; 13(12): e0208715.
357. Vardon-Bounes F, Mémier V, Marcaud M, Jacquemin A, Hamzeh-Cognasse H, Garcia C, Series J, Sié P, Minville V, Gratacap MP, Payrastre B. Platelet activation and prothrombotic properties in a mouse model of peritoneal sepsis. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 13536.
358. Kirschenbaum LA, Adler D, Astiz ME, Barua RS, Saha D, Rackow EC. Mechanisms of platelet-neutrophil interactions and effects on cell filtration in septic shock. *Shock*. 2002; 17(6): 508-12.
359. Nührenberg TG, Stöckle J, Marini F, Zurek M, Grüning BA, Benes V, Hein L, Neumann FJ, Stratz C, Cederqvist M, Hochholzer W. Impact of high platelet turnover on the platelet transcriptome: Results from platelet RNA-sequencing in patients with sepsis. *PLoS One*. 2022; 17(1): e0260222.
360. Middleton EA, Rowley JW, Campbell RA, Grissom CK, Brown SM, Beesley SJ, Schwertz H, Kosaka Y, Manne BK, Krauel K, Tolley ND, Eustes AS, Guo L, Paine R 3rd, Harris ES, Zimmerman GA, Weyrich AS, Rondina MT. Sepsis alters the transcriptional and translational landscape of human and murine platelets. *Blood*. 2019; 134(12): 911-23.
361. Mukai N, Nakayama Y, Ishi S, Ogawa S, Maeda S, Anada N, Murakami S, Mizobe T, Sawa T, Nakajima Y. Changes in MicroRNA Expression Level of Circulating Platelets Contribute to Platelet Defect After Cardiopulmonary Bypass. *Crit Care Med*. 2018; 46(8): e761-e767.
362. Alsaleh G, Nehmar R, Blüml S, Schleiss C, Ostermann E, Dillenseger JP, Sayeh A, Choquet P, Dembele D, Francois A, Salmon JH, Paul N, Schabbauer G, Bierry G, Meyer A, Gottenberg JE, Haas G, Pfeffer S, Vallat L, Sibilia J, Bahram S, Georgel P. Reduced DICER1 Expression Bestows Rheumatoid Arthritis Synoviocytes Proinflammatory Properties and Resistance to Apoptotic Stimuli. *Arthritis Rheumatol*. 2016; 68(8): 1839-48.
363. Randriamboavonjy V, Fleming I. All cut up! The consequences of calpain activation on platelet function. *Vascul Pharmacol*. 2012; 56(5-6): 210-5.
364. Burkhardt J, Blume M, Petit-Teixeira E, Hugo Teixeira V, Steiner A, Quente E, Wolfram G, Scholz M, Pierlot C, Migliorini P, Bombardieri S, Balsa A, Westhovens R, Barrera P, Radstake TR, Alves H, Bardin T, Prum B, Emmrich F, Cornelis F, Ahnert P, Kirsten H. Cellular adhesion gene SELP is associated with rheumatoid arthritis and displays differential allelic expression. *PLoS One*. 2014; 9(8): e103872.

365. Li Y, Liu Y, Duo M, Wu R, Jiang T, Li P, Wang Y, Cheng Z. Bioinformatic analysis and preliminary validation of potential therapeutic targets for COVID-19 infection in asthma patients. *Cell Commun Signal.* 2022; 20(1): 201.
366. Wang D, Zhao P, Lv Y, Ming J, Wang Z, Yang E, Li Y, Wang M, Niu J, Zhang Y, Sun Y, Chen Y, Chen K, Chen Z, Liu W, Hu X. Proteomic-Based Platelet Activation-Associated Protein SELP May Be a Novel Biomarker for Coagulation and Prognostic in Essential Thrombocythemia. *J Clin Med.* 2023; 12(3): 1078.
367. Laffont B, Corduan A, Rousseau M, Duchez AC, Lee CH, Boilard E, Provost P. Platelet microparticles reprogram macrophage gene expression and function. *Thromb Haemost.* 2016; 115(2): 311-23.
368. Zhong L, Simard MJ, Huot J. Endothelial microRNAs regulating the NF-kappaB pathway and cell adhesion molecules during inflammation. *FASEB J.* 2018; 32(8): 4070-84.
369. Tóth J, Debreceni IB, Deák Á, Pető K, Berhész M, Hajdú E, Szabó J, Németh N, Fülesdi B, Kappelmayer J. Characteristics of thrombin generation in a fulminant porcine sepsis model. *Thromb Res.* 2017; 158: 25-34.
370. Su M, Fan S, Ling Z, Fan X, Xia L, Liu Y, Li S, Zhang Y, Zeng Z, Tang WH. Restoring the Platelet miR-223 by Calpain Inhibition Alleviates the Neointimal Hyperplasia in Diabetes. *Front Physiol.* 2020; 11: 742.
371. Chu T, Hu S, Qi J, Li X, Zhang X, Tang Y, Yang M, Xu Y, Ruan CG, Han Y, Wu DP. Bifunctional effect of the inflammatory cytokine tumor necrosis factor α on megakaryopoiesis and platelet production. *J Thromb Haemost.* 2022; 20(12): 2998-3010.
372. Wang Q, Miyakawa Y, Fox N, Kaushansky K. Interferon-alpha directly represses megakaryopoiesis by inhibiting thrombopoietin-induced signaling through induction of SOCS-1. *Blood.* 2000; 96(6): 2093-9.
373. Shannon O. The role of platelets in sepsis. *Res Pract Thromb Haemost.* 2020; 5(1): 27-37.
374. Ajanel A, Middleton EA. Alterations in the megakaryocyte transcriptome impacts platelet function in sepsis and COVID-19 infection. *Thromb Res.* 2023 May 19:S0049-3848(23)00148-2. doi: 10.1016/j.thromres.2023.05.015. Online ahead of print.

375. Applegate RJ, Sacrinty MT, Kutcher MA, Baki TT, Gandhi SK, Santos RM, Little WC. Comparison of drug-eluting versus bare metal stents on later frequency of acute myocardial infarction and death. *Am J Cardiol.* 2007; 99: 333-8.
376. Wallace EL, Abdel-Latif A, Charnigo R, Moliterno DJ, Brodie B, Matnani R, Ziada KM. Meta-analysis of long-term outcomes for drug-eluting stents versus bare-metal stents in primary percutaneous coronary interventions for ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2012; 109(7): 932-40.
377. So HS, So MG, Kang SI, Park JI, Lee JH, Kim U, Park JS. Long-Term Safety and Efficacy of Extended Dual Antiplatelet Therapy After Drug-Eluting Stent Implantation in Real-World Practice. *Circ J.* 2020; 84(12): 2175-84.
378. Yang Y, Hyun J, Lee J, Kim JH, Lee JB, Kang DY, Lee PH, Ahn JM, Park DW, Park SJ; IRIS-DES Registry Investigators. Effectiveness and Safety of Contemporary Drug-Eluting Stents in Patients With Diabetes Mellitus. *JACC Asia.* 2021; 1(2): 173-84.
379. Parfrey S, Siu V, Graham JJ, Vijayaraghavan R, Li C, Pang J, Kalra S, Džavík V, Wijeyesundera HC, Bagai A; from the University of Toronto CTO Collaborative. Evaluation and management of drug-eluting stent in-stent restenosis. *Curr Opin Cardiol.* 2023; 38(5): 433-40.
380. Tomulić V, Gobić D, Lulić D, Židan D, Zaputović L. Soluble adhesion molecules in patients with acute coronary syndrome after percutaneous coronary intervention with drug-coated balloon, drug-eluting stent or bare metal stent. *Med Hypotheses.* 2016; 95: 20-3.
381. Wolberg AS, Aleman MM, Leiderman K, Machlus KR. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. *Anesth Analg.* 2012; 114: 275-85.
382. De Luca G, Dirksen MT, Spaulding C, Kelbaek H, Schalijs M, Thuesen L, van der Hoeven B, Vink MA, Kaiser C, Musto C, Chechi T, Spaziani G, Díaz de la Llera LS, Pasceri V, Di Lorenzo E, Violini R, Cortese G, Suryapranata H, Stone GW. Drug-eluting vs bare-metal stents in primary angioplasty: A pooled patient-level meta-analysis of randomized trials. *Arch Intern Med.* 2012; 172: 611-21.
383. Walter T, Rey KS, Wendel HP, Szabo S, Suselbeck T, Dempfle CE, Borggreffe M, Swoboda S, Beyer ME, Hoffmeister HM. Thrombogenicity of sirolimus-eluting stents and bare metal stents: evaluation in the early phase after stent implantation. *In Vivo.* 2010; 24(5): 635-9.
384. Mahemuti A, Meneveau N, Seronde MF, Schiele F, Mercier M, Racadot E, Bassand JP. Early local intracoronary platelet activation after drug-eluting stent placement. *Chin Med J (Engl).* 2007; 120: 1986-91.

385. Vargová K, Toth-Zsámboki E, Béres BJ, Bencze J, Kerecsen G, Gulácsi-Bárdos P, Kiss RG, Préda I. Circulating endothelial cell count, plasma vWF and soluble ICAM-1 levels following primary or elective percutaneous coronary intervention. *Atherosclerosis*. 2008; 198: 366-72.
386. Marx SO, Totary-Jain H, Marks AR. Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis. *Circ Cardiovasc Intervention*. 2011; 4: 104-11.
387. Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T, Mizuno O, Fukazawa H, Kurosaki K, Fujikawa H, Shimada K. Interleukin 6 expression in coronary circulation after coronary angioplasty as a risk factor for restenosis. *Heart*. 2000; 84: 83-7.
388. Palmieri D, Capponi S, Geroldi A, Mura M, Mandich P, Palombo D. TNF α induces the expression of genes associated with endothelial dysfunction through p38MAPK-mediated down-regulation of miR-149. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 443: 246-51.
389. Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, Balla G. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood*. 2002; 100: 879-887.
390. Bao MH, Li JM, Luo HQ, Tang L, Lv QL, Li GY, Zhou HH. NF- κ B-Regulated miR-99a Modulates Endothelial Cell Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2016; 2016: 5308170.
391. Mociornita AG, Adamson MB, Tumiati LC, Ross HJ, Rao V, Delgado DH. Effects of everolimus and HLA-G on cellular proliferation and neutrophil adhesion in an in vitro model of cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant*. 2018; 18(12): 3038-44.
392. Duan Q, Mao X, Xiao Y, Liu Z, Wang Y, Zhou H, Zhou Z, Cai J, Xia K, Zhu Q, Qi J, Huang H, Plutzky J, Yang T. Super enhancers at the miR-146a and miR-155 genes contribute to self-regulation of inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1859: 564-571.
393. Czimmerer Z, Horvath A, Daniel B, Nagy G, Cuaranta-Monroy I, Kiss M, Kolostyak Z, Poliska S, Steiner L, Giannakis N, Varga T, Nagy L. Dynamic transcriptional control of macrophage miRNA signature via inflammation responsive enhancers revealed using a combination of next generation sequencing-based approaches. *Biochim Biophys Acta*. 2018; 1861: 14-28.
394. 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: 75-90.

395. La Sala L, Cattaneo M, De Nigris V, Pujadas G, Testa R, Bonfigli AR, Genovese S, Ceriello A. Oscillating glucose induces microRNA-185 and impairs an efficient antioxidant response in human endothelial cells. *Cardiovasc Diabetol*. 2016; 15: 71.
396. Liu W, Gong Q, Ling J, Zhang W, Liu Z, Quan J. Role of miR-424 on angiogenic potential in human dental pulp cells. *J Endod*. 2014; 40: 76-82.
397. Santulli G, Wronska A, Uryu K, Diacovo TG, Gao M, Marx SO, Kitajewski J, Chilton JM, Akat KM, Tuschl T, Marks AR, Totary-Jain H. A selective microRNA-based strategy inhibits restenosis while preserving endothelial function. *J Clin Invest*. 2014; 124: 4102-14.
398. Chen Q, Yang F, Guo M, Wen G, Zhang C, Luong le A, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. MiRNA-34a reduces neointima formation through inhibiting smooth muscle cell proliferation and migration. *J Mol Cell Cardiol*. 2015; 89: 75-86.
399. Castellani C, Duff AJA, Bell SC, Heijerman HGM, Munck A, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Barben J, Flume PA, Hodková P, Kashirskaya N, Kirszenbaum MN, Madge S, Oxley H, Plant B, Schwarzenberg SJ, Smyth AR, Taccetti G, Wagner TOF, Wolfe SP, Drevinek P. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J Cyst Fibros*. 2018; 17(2): 153-78.
400. Sly PD, Brennan S, Gangell C, de Klerk N, Murray C, Mott L, Stick SM, Robinson PJ, Robertson CF, Ranganathan SC; Australian Respiratory Early Surveillance Team for Cystic Fibrosis (AREST-CF). Lung disease at diagnosis in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 180(2): 146-52.
401. Chmiel JF, Konstan MW, Accurso FJ, Lymp J, Mayer-Hamblett N, Van Devanter DR, Rose LM, Ramsey BW; Assessment of Induced Sputum in Cystic Fibrosis Study Group. Use of ibuprofen to assess inflammatory biomarkers in induced sputum: Implications for clinical trials in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2015; 14(6): 720-6.
402. Pereira LC, Moreira EA, Bennemann GD, Moreno YM, Buss Zda S, Barbosa E, Ludwig-Neto N, Wilhelm Filho D, Fröde TS. Influence of inflammatory response, infection, and pulmonary function in cystic fibrosis. *Life Sci*. 2014; 109(1): 30-6.
403. Wojewodka G, De Sanctis JB, Bernier J, Bérubé J, Ahlgren HG, Gruber J, Landry J, Lands LC, Nguyen D, Rousseau S, Benedetti A, Matouk E, Radzioch D. Candidate markers associated with the probability of future pulmonary exacerbations in cystic fibrosis patients. *PLoS One*. 2014; 9(2): e88567.

404. Girón-Moreno RM, Justicia JL, Yamamoto S, Valenzuela C, Cisneros C, Gómez-Punter RM, Fernandes-Vasconcelos G, Ancochea J. Role of C-reactive protein as a biomarker for prediction of the severity of pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis. *BMC Pulm Med.* 2014; 14: 150.
405. Moore RG, Brown AK, Miller MC, Skates S, Allard WJ, Verch T, Steinhoff M, Messerlian G, DiSilvestro P, Granai CO, Bast RC Jr. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol.* 2008; 108(2): 402-28.
406. Liu W, Yang J, Chi PD, Zheng X, Dai SQ, Chen H, Xu BL, Liu WL. Evaluating the clinical significance of serum HE4 levels in lung cancer and pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013; 17(10): 1346-53.
407. Wang J, Zhao H, Xu F, Zhang P, Zheng Y, Jia N. Human epididymis protein 4 (HE4) protects against cystic pulmonary fibrosis associated-inflammation through inhibition of NF- κ B and MAPK signaling. *Genes Genomics.* 2019; 41(9): 1045-53.
408. Moore RG, Miller MC, Eklund EE, Lu KH, Bast RC Jr, Lambert-Messerlian G. Serum levels of the ovarian cancer biomarker HE4 are decreased in pregnancy and increase with age. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 206(4): 349.e1-7.
409. Mishra A, Greaves R, Smith K, Carlin JB, Wootton A, Stirling R, Massie J. Diagnosis of cystic fibrosis by sweat testing: age-specific reference intervals. *J Pediatr.* 2008; 153(6): 758-63.
410. Clarke LA, Sousa L, Barreto C, Amaral MD. Changes in transcriptome of native nasal epithelium expressing F508del-CFTR and intersecting data from comparable studies. *Respir Res.* 2013; 14(1): 38.
411. Muhlebach MS, Reed W, Noah TL. Quantitative cytokine gene expression in CF airway. *Pediatr Pulmonol.* 2004; 37(5): 393-9.
412. Wright JM, Merlo CA, Reynolds JB, Zeitlin PL, Garcia JG, Guggino WB, Boyle MP. Respiratory epithelial gene expression in patients with mild and severe cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006; 35(3): 327-36.
413. Zabner J, Scheetz TE, Almazrazi HG, Casavant TL, Huang J, Keshavjee S, McCray PB Jr. CFTR DeltaF508 mutation has minimal effect on the gene expression profile of differentiated human airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005; 289(4): L545-53.

414. Hajj R, Lesimple P, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Puchelle E, Coraux C. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *J Pathol.* 2007; 211(3): 340-50.
415. Clarke LA, Botelho HM, Sousa L, Falcao AO, Amaral MD. Transcriptome meta-analysis reveals common differential and global gene expression profiles in cystic fibrosis and other respiratory disorders and identifies CFTR regulators. *Genomics.* 2015; 106(5): 268-77.
416. Bingle L, Tetley TD, Bingle CD. Cytokine-mediated induction of the human elafin gene in pulmonary epithelial cells is regulated by nuclear factor-kappaB. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 25(1): 84-91.
417. Chen FE, Huang DB, Chen YQ, Ghosh G. Crystal Structure of P50/p65 Heterodimer of Transcription Factor NF-Kb Bound to DNA. *Nature* 1998; 391: 410-3.
418. Hisert KB, Heltshe SL, Pope C, Jorth P, Wu X, Edwards RM, Radey M, Accurso FJ, Wolter DJ, Cooke G, Adam RJ, Carter S, Grogan B, Launspach JL, Donnelly SC, Gallagher CG, Bruce JE, Stoltz DA, Welsh MJ, Hoffman LR, McKone EF, Singh PK. Restoring Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function Reduces Airway Bacteria and Inflammation in People with Cystic Fibrosis and Chronic Lung Infections. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017; 195(12): 1617-28.
419. Jarosz-Griffiths HH, Scambler T, Wong CH, Lara-Reyna S, Holbrook J, Martinon F, Savic S, Whitaker P, Etherington C, Spoletini G, Clifton I, Mehta A, McDermott MF, Peckham D. Different CFTR modulator combinations downregulate inflammation differently in cystic fibrosis. *Elife.* 2020; 9: e54556.
420. Barnaby R, Koeppen K, Nymon A, Hampton TH, Berwin B, Ashare A, Stanton BA. Lumacaftor (VX-809) restores the ability of CF macrophages to phagocytose and kill *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2018; 314(3): L432-8.
421. Ruffin M, Roussel L, Maillé É, Rousseau S, Brochiero E. Vx-809/Vx-770 treatment reduces inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* in primary differentiated cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2018; 314(4): L635-41.
422. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevínek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordoñez C, Elborn JS; VX08-770-102 Study Group. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med.* 2011; 365(18): 1663-72.
423. Roda J, Pinto-Silva C, Silva IAI, Maia C, Almeida S, Ferreira R, Oliveira G. New drugs in cystic fibrosis: what has changed in the last decade? *Ther Adv Chronic Dis.* 2022; 13: 20406223221098136.

424. Wang H, Cebotaru L, Lee HW, Yang Q, Pollard BS, Pollard HB, Guggino WB. CFTR Controls the Activity of NF-KappaB by Enhancing the Degradation of TRADD. *Cell Physiol Biochem*. 2016; 40: 1063-78.
425. Pranke IM, Hatton A, Simonin J, Jais JP, Le Pimpec-Barthes F, Carsin A, Bonnette P, Fayon M, Stremmer-Le Bel N, Grenet D, Thumerel M, Mazenq J, Urbach V, Mesbahi M, Girodon-Boulandet E, Hinzpeter A, Edelman A, Sermet-Gaudelus I. Correction of CFTR Function in Nasal Epithelial Cells from Cystic Fibrosis Patients Predicts Improvement of Respiratory Function by CFTR Modulators. *Sci Rep*. 2017; 7: 7375.
426. Kmit A, Marson FAL, Pereira SV, Vinagre AM, Leite GS, Servidoni MF, Ribeiro JD, Ribeiro AF, Bertuzzo CS, Amaral MD. Extent of rescue of F508del-CFTR function by VX-809 and VX-770 in human nasal epithelial cells correlates with SNP rs7512462 in SLC26A9 gene in F508del/F508del Cystic Fibrosis patients. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019; 1865(6): 1323-31.
427. Janeckova L, Pospichalova V, Fafilek B, Vojtechova M, Tureckova J, Dobes J, Dubuissez M, Leprince D, Baloghova N, Horazna M, Hlavata A, Stancikova J, Sloncova E, Galuskova K, Strnad H, Korinek V. HIC1 Tumor Suppressor Loss Potentiates TLR2/NF- κ B Signaling and Promotes Tissue Damage-Associated Tumorigenesis. *Mol Cancer Res*. 2015; 13(7): 1139-48.
428. Sallenave JM, Shulmann J, Crossley J, Jordana M, Gaudie J. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994; 11(6): 733-41.
429. Favia M, Gallo C, Guerra L, De Venuto D, Diana A, Polizzi AM, Montemurro P, Marigiò MA, Leonetti G, Manca A, Casavola V, Conese M. Treatment of Cystic Fibrosis Patients Homozygous for F508del with Lumacaftor-Ivacaftor (Orkambi[®]) Restores Defective CFTR Channel Function in Circulating Mononuclear Cells. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(7): 2398.
430. Adam D, Bilodeau C, Sognigbé L, Maillé É, Ruffin M, Brochiero E. CFTR rescue with VX-809 and VX-770 favors the repair of primary airway epithelial cell cultures from patients with class II mutations in the presence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts. *J Cyst Fibros*. 2018; 17(6): 705-14.
431. Stanton BA, Coutermarsh B, Barnaby R, Hogan D. *Pseudomonas aeruginosa* Reduces VX-809 Stimulated F508del-CFTR Chloride Secretion by Airway Epithelial Cells. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0127742.

432. Laselva O, Stone TA, Bear CE, Deber CM. Anti-Infectives Restore ORKAMBI® Rescue of F508del-CFTR Function in Human Bronchial Epithelial Cells Infected with Clinical Strains of *P. aeruginosa*. *Biomolecules*. 2020; 10(2): 334.
433. Bitam S, Pranke I, Hollenhorst M, Serval N, Moquereau C, Tondelier D, Hatton A, Urbach V, Sermet-Gaudelus I, Hinzpeter A, Edelman A. An unexpected effect of TNF- α on F508del-CFTR maturation and function. *F1000Res*. 2015; 4: 218.
434. Matouk E, Nguyen D, Benedetti A, Bernier J, Gruber J, Landry J, Rousseau S, Ahlgren HG, Lands LC, Wojewodka G, Radzioch D. C-Reactive Protein in Stable Cystic Fibrosis: An Additional Indicator of Clinical Disease Activity and Risk of Future Pulmonary Exacerbations. *J Pulm Respir Med*. 2016; 6(5): 1000375.
435. Schmidt H, Höpfer LM, Wohlgemuth L, Knapp CL, Mohamed AOK, Stukan L, Münnich F, Hüsken D, Koller AS, Stratmann AEP, Müller P, Braun CK, Fabricius D, Bode SFN, Huber-Lang M, Messerer DAC. Multimodal analysis of granulocytes, monocytes, and platelets in patients with cystic fibrosis before and after Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor treatment. *Front Immunol*. 2023; 14: 1180282.
436. Zhan Y, Chen J, Wu J, Gu Y, Huang Q, Deng Z, Chen S, Wu X, Lv Y, Zeng Z, Xie J. Human epididymis protein 4 aggravates airway inflammation and remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2022; 23(1): 120.
437. Hua L, Liu Y, Zhen S, Wan D, Cao J, Gao X. Expression and biochemical characterization of recombinant human epididymis protein 4. *Protein Expr Purif*. 2014; 102: 52-62.
438. Esposito R, Mirra D, Spaziano G, Panico F, Gallelli L, D'Agostino B. The Role of MMPs in the Era of CFTR Modulators: An Additional Target for Cystic Fibrosis Patients? *Biomolecules*. 2023; 13(2): 350.
439. LeBleu VS, Teng Y, O'Connell JT, Charytan D, Müller GA, Müller CA, Sugimoto H, Kalluri R. Identification of human epididymis protein-4 as a fibroblast-derived mediator of fibrosis. *Nat Med*. 2013; 19(2): 227-31.
440. Zhang L, Liu L, Bai M, Liu M, Wei L, Yang Z, Qian Q, Ning X, Sun S. Hypoxia-induced HE4 in tubular epithelial cells promotes extracellular matrix accumulation and renal fibrosis via NF- κ B. *FASEB J*. 2020; 34(2): 2554-67.
441. Nishiyama N, Masuo M, Nukui Y, Tateishi T, Kishino M, Tateishi U, Morota K, Ohbo K, Miyazaki Y. Human epididymis protein 4 is a new biomarker to predict the prognosis of progressive fibrosing interstitial lung disease. *Respir Investig*. 2021; 59(1): 90-8.

10 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, Ruzsnyák 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

11 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 hereditær 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 jelentőséges 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 dústított 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 prosztatarák 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, Gyóry 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, Bacsí 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 AA, 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. Magyar 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, Szücs-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, Szekanecz 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, Szekanecz 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

12 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.

13 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.

14 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 tudománymetriai 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