

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Fejes Zsolt

**MikroRNS expressziók vizsgálata fokozott vérlemezke
és endothelsejt aktivációval járó kórképekben**

**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2018**

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**MikroRNS expressziók vizsgálata fokozott vérlemezke
és endothelsejt aktivációval járó kórképekben**

Fejes Zsolt

Témavezető: Dr. Nagy Béla



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Trombózis, Hemosztázis és Vaszkuláris Biológia Program

Debrecen, 2018

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	9
2. Irodalmi áttekintés	11
2.1 A mikroRNS-ek jelentősége és biogenezisük.....	11
2.1.1 Az RNS interferencia és a miRNS-ek felfedezése.....	11
2.1.2 A miRNS-ek biogenezise.....	12
2.2 Az érett miRNS-t magába foglaló szabályozó komplex működése és funkciója .	15
2.2.1 A RISC szabályozó komplex képződése	15
2.2.2 A vezető szál kiválasztása.....	16
2.2.3 A cél mRNS-ek felismerése.....	16
2.2.4 A szabályozó komplexek hatásmechanizmusai	17
2.3 A miRNS-ek fiziológiás és patológiás funkciói.....	17
2.3.1 A miRNS-ek szerepe a fiziológiás folyamatokban.....	18
2.3.2 A miRNS szintek változásának patológiás következményei	19
2.3.3 Az extracelluláris miRNS-ek szerepe	20
2.4 A vérlemezke aktiválódáshoz köthető miRNS-ek jellemzése	21
2.4.1 A thrombocyta aktiváció jelentősége.....	21
2.4.2 A thrombocyták RNS tartalma.....	22
2.4.3 A thrombocyta aktiválódás és a miRNS szint változásának kapcsolata DM2- ben.....	24
2.5 Az endothelsejt aktiváció transcriptiós és posttranscriptiós szintű szabályozása .	25
2.5.1 A koronária fémsztentek és a gyógyszer-eluáló sztentek alkalmazásának klinikai vonatkozásai	25
2.5.2 Az everolimus sejtaktivációra kifejtett hatása	26
2.5.3 A miRNS-ek szerepe az endothelsejt aktivációban	26
2.5.4 A transcriptiót szabályozó enhancer RNS-ek jellemzői	27
3. Célkitűzések.....	28
3.1 A thrombocyta és MK miRNS-ek vizsgálata DM2-ben.....	28
3.2 A BMS és DES sejtaktiváló hatásának összehasonlítása stabil anginás betegekben	28
3.3 Az everolimus endothelsejt aktivációt csökkentő hatásának vizsgálata	29
4. Anyagok és módszerek	30
4.1 Betegek és kontrollok	30
4.1.1 DM2 betegek, obez és egészséges kontroll személyek.....	30

4.1.2 BMS, illetve DES implantációban részesült stabil anginás betegek.....	30
4.2 Mintavétel és mintafeldolgozás	31
4.2.1 A fehérvérsejt mentesített vérlemezkek szeparálása.....	32
4.2.2 A plazmaminták előkészítése a keringő miRNS-ek vizsgálatára	32
4.3 Sejt kultúrák fenntartása és kezelése.....	33
4.3.1 A megakaryocita sejtek tenyésztése hyperglycaemiás környezetben	33
4.3.2 Az endothelsejtek tenyésztése gyulladásos körülmények között.....	34
4.4 Laboratóriumi vizsgálatok	34
4.4.1 A vérlemezke aktiváció vizsgálata a P-selectin expresszió áramlási citometriai meghatározásán keresztül	34
4.4.2 RNS izolálás.....	35
4.4.3 A fehérvérsejtektől megtisztított vérlemezke minták tisztaságának ellenőrzése	35
4.4.4 A miRNS expressziók meghatározása UPL-próba alapú RT-qPCR módszerrel.....	36
4.4.5 Az mRNS, a prekursor miRNS és az enhancer RNS szintek meghatározása	38
4.4.6 Az enhancer RNS-ek azonosítása	39
4.4.7 Az extracelluláris miRNS expressziók analízise plazma mintákban	39
4.4.8 A miRNS mimic és inhibitor transzfekciója megakaryocita és endothelsejtekbe.....	41
4.4.9 A miRNS expressziók Dicer függőségének vizsgálata calpain inhibitorral MEG-01 sejtekben	42
4.4.10 Szolubilis fehérjék koncentrációjának meghatározása ELISA módszerrel .	42
4.4.11 Az NF- κ B út vonal aktiválódásának vizsgálata endothelsejtekben	43
4.5 Statisztikai értékelés.....	43
5. Eredmények	44
5.1 A thrombocytá-eredetű miRNS-ek vizsgálata DM2-ben.....	44
5.1.1 A vizsgálati csoportok demográfiai és laboratóriumi jellemzői	44
5.1.2 A vérlemezkek miRNS expressziójának változása DM2-ben	46
5.1.3 A keringő miRNS-ek analízise az ex vivo plazma mintákban	48
5.1.4 A hyperglycaemia miRNS szintekre kifejtett hatásának vizsgálata MK sejtekben	49
5.1.5 A hyperglycaemia hatására lecsökkent miRNS expressziók emelkedett cél mRNS szintekkel járt együtt mind a vérlemezkekben, mind az MK sejtekben.....	53
5.1.6 A miR-26b, miR-140 és SELP mRNS közötti kapcsolat igazolása.....	55
5.1.7 A miRNS expressziók Dicer függőségének vizsgálata calpain inhibitorral MEG-01 sejtekben	57
5.2 A BMS és DES sejtaktiváló hatásának összehasonlítása stabil anginában.....	57
5.2.1 A betegek demográfiai és klinikai jellemzői	58

5.2.2 A vérlemezke aktivációs markerek	59
5.2.3 Az endothelsejt aktivációs markerek	61
5.2.4 ISR-ben emelkedett sejtaktivációs markerek	62
5.2.5 A vérlemezke funkció gátló kezelésekre adott válasz hatása a sztent indukálta sejtaktivációra	64
5.3 Az everolimus endothelsejt aktivációt csökkentő hatásának vizsgálata	65
5.3.1 Az everolimus csökkentette a TNF- α kezelés hatására megemelkedett E-selectin és VCAM-1 szinteket in vitro endothelsejt kultúrákban	66
5.3.2 Az everolimus gyulladáscsökkentő hatása az endothelsejtekben	68
5.3.3 Az everolimus hatása az NF- κ B útvonal aktiválódására	69
5.3.4 Az SELE és a VCAM1 gén transcriptiós szintű szabályozása és az everolimus hatása az enhancer RNS-ek kifejeződésére	71
5.3.5 Az endothelsejt aktiváció posttranscriptiós szabályozása	73
5.3.6 A miR-181b posttranscriptiós szinten szabályozza a SELE és VCAM1 mRNS-ek expresszióját	76
5.3.7 Az extracelluláris miRNS szintek alakulása az endothelsejt aktivációban és az ISR kialakulásakor	76
6. Megbeszélés	79
7. Összefoglalás	91
7. Summary	92
8. Az értekezés új tudományos eredményei, a jelölt saját megállapításai	93
9. Irodalomjegyzék és publikációs lista	94
9.1 Irodalomjegyzék	94
9.2 Publikációs lista	114
10. Tárgyszavak– keywords	116
11. Köszönetnyilvánítás	117
12. Függelék	118

Rövidítések jegyzéke

ADAM9: A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 9

Ago2: Argonaute 2

AMI: Acute Myocardial Infarction

ATP: Adenosine TriPhosphate

BMI: Body Mass Index

BMS: Bare Metal Stent (fémsztent)

CCL4: Chemokine (C-C motif) ligand 4

CD40L: CD40 ligand

cDNS: komplementer DNS

Chip-seq: Chromatin immunoprecipitation-sequencing

CLOCK: Circadian Locomotor Output Cycles Kaput

CSF1: Colony Stimulating Factor 1

CRP: C-Reaktív Protein

cTnT: cardialis Troponin T

DES: Drug Eluting Stent (gyógyszert eluáló sztent)

DGCR8: DiGeorge syndrome Critical/Chromosomal Region 8

DM2: 2-es típusú Diabetes Mellitus

DMSO: DiMethyl SulfOxide

DNS: DezoxiriboNukleinSav

dNTP: deoxyNucleoside TriPhosphate

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EFNA1: Ephrin A1

eRNS: enhancer RNS

FBS: Fetal Bovine Serum

FBXW7: F-box/WD repeat-containing protein 7

FITC: Flourescein IsoThioCyanate

FM: Fibrin Monomer

FS: Forward Scatter

H3K27Ac: acetylation lysine 27 on the histon H3 protein subunit

H3K4Me3: trimethylation of lysine 4 on the histone H3 protein subunit

HbA1c: Haemoglobin A1c

HBSS: Hanks' Balanced Salt solution

HCAEC: Human Coronary Artery Endothelial Cell

HDL: High Density Lipoprotein

Hsc-70: Heat shock cognate protein 70

Hsp-90: Heat shock protein 90

HUVEC: Human Umbilical Vein Edothelial Cell

HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance

ICAM-1: InterCellular Adhesion Molecule 1

IL-1 β : interleukin-1 β

IL-6: interleukin-6

IL-8: interleukin-8

ISR: In-Stent Restenosis

ITGA2B: Integrin alpha-IIb, (CD41)

K562-MK: K562 megakaryocya

KLHL5: Kelch Like family member 5

KO: knock out

LDL: Low Density Lipoprotein

LPS: LipoPolySaccharide

MAFB: fibrinogén receptor promoter régióját aktiváló transzkripció faktor

MFI: Mean Fluorescence Intensity

miRNS: mikroRNS

MK: megakaryocita

mRNS: messenger RNS

mTOR: mammalian Target Of Rapamycin

mTORC2: mammalian Target Of Rapamycin Complex 2

NF- κ B: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NSTEMI: Non ST Elevation Myocardial Infarction

P2RY12: P2Y12 receptor gén

PAI: plazma atherogén index

PAZ: Piwi/Argonaute/Zwill

PBS: Phosphate Buffered Salnie

PDGF-BB: Platelet-Derived Growth Factor-BB

PE: PhycoErythrin

PMA: Phorbol-12-Myristate-13-Acetate

PPP: thrombocyta szegény plazma

pre-miRNS: prekurzor mikroRNS

pri-miRNS: elsődleges mikroRNS

PRKAR2B: cAMP-dependent Protein Kinase type II-beta Regulatory subunit

PRP: thrombocyta dús plazma

PTPRC: Protein Tyrosine Phosphatase Receptor type C, (CD45)

RAN-GTP: RAs-related Nuclear protein-Guanosine TriPhosphate

RISC: RNA-Induced Silencing Complex

RNáz: ribonukleáz

RNS: ribonukleinsav

RPLP0 (36B4): Ribosomal Protein P0

RT-qPCR: valós idejű-kvantitatív polimeráz lánreakció

SELE: E-selectin gén

SELP: P-selectin gén

siRNS: kis interferáló RNS

SS: Side Scatter

STEMI: ST Elevation Myocardial Infarction

TF: transzkripció faktor

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

TRBP: Transactivation-Responsive RNA Binding Protein

UPL: Universal ProbeLibrary

UTR: untranslated region (nem kódoló régió)

VAMP8: Vesicle-Associated Membrane Protein 8

VASP: Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule 1

VSMC: Vascular Smooth Muscle Cell

vWF-Ag: von Willebrand Factor Antigén

1. Bevezetés

A mikroRNS-ek (miRNS) a nem kódoló RNS család tagjai, amelyek az posttranscriptiós szabályozás résztvevőiként, kulcsfontosságú szerepet játszanak a sejtek működéséhez szükséges gének expressziójának finomszabályozásában. A miRNS-ek az egész növény- és állatvilágban jelen vannak és a részleges vagy teljes komplementaritás alapján, ribonukleoprotein komplexben kötődhetnek a messenger RNS (mRNS) meghatározott régiójához. A miRNS-ek gátolják a cél gének kifejeződését a transláció akadályozásán keresztül, vagy akár az mRNS degradációja révén. Egy miRNS akár több tíz gén működését befolyásolhatja. Amennyiben a miRNS-ek expressziója jelentősen megváltozik, a cél mRNS-ek szintje és az általa kódolt fehérjék mennyisége ennek megfelelően lecsökkenhet vagy megemelkedhet. Ezáltal képesek számos fehérje expresszió befolyásolásán keresztül különböző celluláris folyamatokat kontrollálni. Élettani körülmények között részt vesznek számos anyagcsere-folyamat, a sejt-differenciáció, proliferáció és apoptózis szabályozásában, ugyanakkor az utóbbi években kórosan megváltozott expressziójukat összefüggésbe hozták gyulladással, tumoros, metabolikus és kardiovaszkuláris betegségek kialakulásával. Méretükből kifolyólag rendkívül stabil molekulák, amik nemcsak maggal rendelkező sejtekben, hanem pl. a vérlemezkékben is jelen vannak, és ellenállnak a ribonukleázok degradáló hatásának, ezáltal kimutathatók a plazmában, a vizeletben és más testfolyadékokban is.

A vérlemezkék és az endothelsejtek fontos funkciót töltenek be a hemosztázis folyamatok kialakításában, mivel a vaszkuláris integritás fenntartását a normális működésük biztosítja. Érfal sérülése esetén a trombocyták aktiválódnak, receptoraikon keresztül kitapadnak a szintén aktiválódott endothelsejtekhez, és a véralvadást elősegítő mediátorok szabadulnak fel belőlük. Súlyos metabolikus vagy gyulladással környezetben ugyanakkor a trombocyták és az endothelsejtek kóros aktiválódása figyelhető meg, ami trombotikus és egyéb vaszkuláris szövődmények kialakulásához vezethet.

A dolgozatban két olyan kórkép modellezésével foglalkoztunk, melyek napjainkban is egyre több beteget érint. Mind a 2-es típusú diabetes mellitus (DM2), mind az ischémias szívbetegséggel együtt járó trombotikus és vaszkuláris szövődményeknek igen nagy a népegészségügyi jelentősége, mivel továbbra is a vezető halálokok között szerepelnek.

DM2-ben a vérlemezkék alap aktivációs állapota emelkedett, melynek egyik magyarázata az lehet, hogy a hyperglycaemia a megakaryocita (MK) sejtek működésére is hatással lehet a csontvelőben, és emiatt olyan thrombocyták termelődnek, melyek a keringésben már kisebb stimulus hatására könnyebben, akár nagyobb mértékben aktiválódhatnak.

Jelenleg kevés információ áll rendelkezésünkre arról, hogyan és milyen mértékben képesek szabályozni a megváltozott expressziót mutató MK-eredetű miRNS-ek a vérlemezkék funkcióját. Feltételeztük, hogy DM2-ben a MK sejtekben bekövetkező változások eltérő thrombocyta miRNS expressziókhöz vezethetnek, aminek fontos szerepe lehet a cél mRNS szintek módosulásában, bizonyos thrombocyta fehérjék fokozott kifejeződésében, és ezáltal a megváltozott vérlemezke funkcióban. Arra kerestük a választ, hogy mely vérlemezke miRNS-ek bírhatnak jelentős szereppel a DM2-hoz társult abnormális thrombocyta aktivációs folyamatokra.

A koronária betegségek (pl. stabil angina) kezelésében használt hagyományos fémsztentek (BMS) és a gyógyszert eluáló koronária sztentek (DES) sejtaktiváló hatásának összehasonlítását végeztük perifériás vérmintákban mért szolubilis fehérjék koncentrációján keresztül. Számos klinikai adat vált ismertté a DES jobb klinikai alkalmazhatóságáról, mivel a gyógyszer kedvező hatásának köszönhetően csökken a korai komplikációk, pl. az in-stent restenosis (ISR) kialakulásának kockázata. Az ISR bekövetkezésének hátterében felmerült az aktiválódott endothelsejtekben megváltozott RNS expressziók szerepe. Tekintettel arra, hogy everolimussal bevont DES beültetésben részesült betegek mintáit vizsgáltuk, az everolimus endothelsejt aktivációt és RNS expressziót befolyásoló hatását *in vitro* körülmények között is tanulmányoztuk humán endothelsejt kultúrákban. A betegek plazma mintáiban meghatároztuk a keringő miRNS profilt a komplikáció jelenlétében és hiányában, és a szolubilis fehérjék mennyiségét befolyásoló miRNS-ek és cél mRNS-ek közötti kapcsolatot endothelsejt tenyészeteken analizáltuk.

A disszertáció témája a vérlemezke és endothelsejt miRNS-ek jellemzése és hatásmechanizmusának jobb megismerése volt fokozott sejtaktivációval járó metabolikus és kardiovaszkuláris betegségekben. A miRNS-ek kutatása az utóbbi években jelentős tudományos figyelmet kapott, így fokozatosan új típusú laboratóriumi és prognosztikai biomarkerekké és egyben terápiás célpontokká is válhatnak.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A mikroRNS-ek jelentősége és biogenezisük

A mikroRNS-ek (miRNS, miR) rövid, általában 18-25 nukleotid hosszúságú, nem kódoló RNS molekulák, melyek kulcsfontosságú szerepet játszanak a sejtek fiziológiás működéséhez szükséges gének expressziójának finomszabályozásában, posttranscriptiós szinten. Érett formájukhoz képest jóval hosszabb transzkriptekből származnak, melyek több lépésből álló érési folyamaton mennek keresztül, mielőtt beépülnének a RISC komplexbe (RNA-induced silencing complex) [1]. A miRNS-ek, az érésüket befolyásoló, illetve az általuk szabályozott fehérjék számos fajban azonosak, mégis számuk és elnevezésük helyenként különböző lehet, ezért biogenezisüket a humán folyamatokon keresztül szeretném bemutatni.

2.1.1 Az RNS interferencia és a miRNS-ek felfedezése

Az RNS interferencia az a mechanizmus, amely során egy gén kifejeződése posttranscriptiós gátlás alá kerül egy szekvencia specifikus egyszálú vagy kétszálú RNS molekula által. A jelenséget először a fonalféregben (*Caenorhabditis elegans*) írták le 1998-ban [2], amikor a féregbe hosszú, kettős szálú RNS-t juttattak be és erős géncsendesítő hatást tapasztaltak. Az ecetmuslicával (*Drosophila melanogaster*) végzett *in vitro* kísérletek [3] jelentősen hozzájárultak az RNS interferencia folyamatának részletesebb megismeréséhez; a hosszú, dupla szálú RNS-ek előzetesen 21-22 nukleotid nagyságúra hasítódnak egy III-as típusú ribonukleáz (RNáz) által, hogy szabályozni tudják az mRNS-ek működését. Ezen megfigyelésekből kiindulva 2001-ben kimutatták, hogy rövid RNS duplexeket alkalmazva is nagyon hatékony volt az RNS interferencia mechanizmusa az emlős sejtekben [4]. Ezen duplexeket kis interferáló RNS-nek (siRNS) nevezték el, melyek 3' végét ugyanolyan 2 nukleotidos „overhang” (túlnyúlás) jellemzi, mint amit az előző ecetmuslicás kísérletekben figyeltek meg [3]. A miRNS-ek működésének részletes megismerése idején debreceni kutatók is alkalmaztak „antisense” RNS-eket a transcriptiós események csendesítésére [5]. A későbbiekben az siRNS-ek által kifejtett interferencia mechanizmusának megismerése újabb területeket nyitott a fehérjekutatásban, illetve a miRNS-ek terápiás használhatóságának vizsgálatában.

Valójában az első kis szabályozó RNS-t valamivel korábban azonosította Victor Ambros és kutatócsoportja [6], mint ahogy az RNS interferencia mechanizmusának felfedezése történt. A fonálféreg lárvaállapotának első két fejlődési stádiumának átmeneti szakaszában a 22 nukleotid hosszú lin-4 (később azonosított miRNS) gátolni tudta a lin-14 gén expresszióját a kis RNS és az mRNS 3' nem kódoló régiója (3' UTR) közötti részleges komplementaritás által [6]. Hét évvel később egy másik kis szabályozó RNS, a let-7 jelenlétét és funkcióját is leírták a fonálféreg felnőtt érési stádiumba való átmenetében [7]. Azt is kimutatták, hogy ez a kis RNS több mRNS 3' UTR régiójához is hozzá tudott kötődni és képes volt negatívan szabályozni a lin-41 gén kifejeződését [7]. Andrew Fire és Craig Mello amerikai kutatók 2006-ban, mindössze 8 évvel az RNS interferencia feltalálását követően megkapták az orvosi Nobel-díjat. Ezek a munkák nyitották meg az utat a nem kódoló RNS-ek kutatásához, ami számos miRNS azonosításához vezetett a fonálféregtől a muslicán át az emlősökig azt bizonyítva, hogy az RNS-család széles és fontos részét alkotják. A kis RNS-ekre adaptált új generációs szekvenálási technikák alkalmazása rendkívül felgyorsította a miRNS-ek azonosítását. A miRBase adatbázis (www.mirbase.org) 22-es verziója (2018. március) alapján 2693 érett miRNS szekvenciát azonosítottak eddig az emberben, 2013-t az egérben (*Mus musculus*), 471-t az ecetmuslicában, és 439-t a fonálféregben, az alcsaládokkal együtt ezek száma még ennél több is lehet. A sokat vizsgált let-7 nagyon erős konzerváltsága az evolúcióban lehetővé tette, hogy kialakítsák a nem kódoló kis RNS-ek új családját, a miRNS-ek csoportját [8, 9].

2.1.2 A miRNS-ek biogenezeise

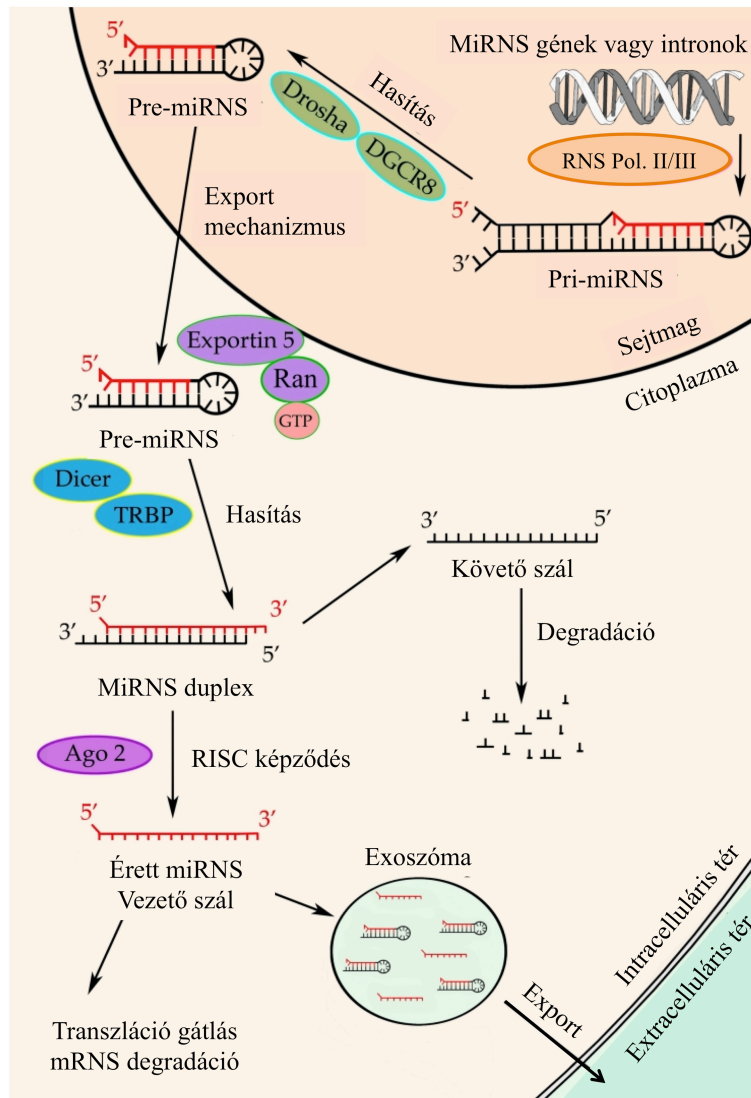
Az egyes miRNS-ek érési folyamata több útvonalon mehet végbe. A legtöbb miRNS biogenezeise két fontos RNáz működésétől függően történik több lépésen keresztül (klasszikus útvonal), azonban léteznek ettől eltérő módon lezajló folyamatok is (alternatív utak).

Az elsődleges miRNS-ek (pri-miRNS) olyan hosszú, kétszálú RNS-ek, melyek akár több ezer nukleotidból is állhatnak [1]. MiRNS génekről és fehérjét kódoló gének intron vagy exon szakaszairól kerülnek transcriptióra. Ezek a miRNS-ek tehát együtt íródnak át a „gazdaszervezet” többi génjével [10]. Bizonyos introni eredetű miRNS-eknek saját promóter régiójuk is van, lehetővé téve a többi géntől való független átíródást [11]. A miRNS gének transcriptióját ugyanazok a tényezők szabályozzák, mint

amelyek az mRNS-eket kódoló gének átírását is regulálják. Az esetek nagy többségében az RNS polimeráz II végzi a transcriptiót (néhány miRNS-nél az RNS polimeráz III), így a pri-miRNS-ek rendelkeznek egy 7-metil-guanozinnal az 5' végen, és egy poli-A farokkal a 3' végen [12].

A miRNS-ek eredetüktől függetlenül hasonló érési folyamaton mennek keresztül. Ahogy az 1. ábra is bemutatja, a miRNS előalakok két egymást követő érési szakaszon mennek át (az első a sejtmagban, a második a citoplazmában történik), mielőtt az érett miRNS-ek beépülhetnek a szabályozó RISC komplexbe [13]. A pri-miRNS-ek ún. „hairpin” (hajtű) szerkezetűek, melyek középső részében található az érett miRNS-ek szekvenciái. Ehhez a hajtű szerkezethez tud kötődni a Mikroprocesszor nevű fehérje komplex, amely végrehajtja a miRNS-ek első érési folyamatát. Ezt a komplexet egy III-as típusú RNáz enzim, a Drosha és kofaktora, a DGCR8 (DiGeorge syndrome critical/chromosomal region 8) alkotja. A DGCR8 két, a dupla szálú RNS-re specifikus kapcsolódási domént tartalmaz, ami lehetővé teszi a pri-miRNS-el való kötődést. A DGCR8 asszociációja pozicionálja a Drosha-t, hogy az enzim a meghatározott helyen lehasíthasson egy szakaszt a pri-miRNS-ről. Az érési folyamat első szakasza prekursor miRNS (pre-miRNS) keletkezéséhez vezet, ami körülbelül 60-70 nukleotid hosszú és még mindig rendelkezik a hajtű struktúrával. A pre-miRNS 3' végén lévő 2 nukleotidos túlnyúlást ismeri fel az Exportin-5 RAN-GTP komplex (RAS-related nuclear protein-guanosine triphosphate), amely segítségével a pre-miRNS ki tud jutni a citoplazmába, ahol a második érési folyamat fog lezajlani [1, 13-15] (1. ábra).

A sejtmagból való kijutás következtében a pre-miRNS egy újabb érési komplexbe épül be, ami a Dicer enzimből és a TRBP (transactivation-responsive RNA-binding protein) kofaktorból áll. Az enzim PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) doménje köti meg a pre-miRNS 3' végén lévő 2 nukleotidos túlnyúlást, a helikáz doménje a hajtű szerkezethez képes kötődni, míg a TRBP növeli a Dicer affinitását a szubsztrátjához és meg tudja könnyíteni a miRNS kiszabadulását [16]. A Dicer-TRBP komplex a pre-miRNS hajtű szerkezetét lehasítja, és két érett miRNS-ből álló duplex keletkezik, melyek általában 18-25 nukleotid hosszúságúak. Ezek közül az egyik szál (a vezető szál) az Ago2 (Argonaute 2) fehérjével kialakítja a RISC komplexet, míg a másik szál lebomlik (1. ábra).



1. ábra. A miRNS-ek érési folyamata. A miRNS-ek a sejtmagban miRNS génekről, intronokról vagy exonokról íródnak át RNS polimeráz II/III által és pri-miRNS-ek keletkeznek. Ezek körülbelül 2000 nukleotid hosszúak és „hajtú” konformációban vannak jelen. A Drosha RNáz aktivitásának hatására pre-miRNS-ek keletkeznek, amelyek az Exportin 5 fehérje segítségével kijutnak a sejtmagból. A citoplazmában egy másik RNáz, a Dicer lehasítja a hajtú szerkezetet és miRNS duplex keletkezik. Ennek egyik szála (vezető szál) az Ago2 proteinnel alakítja ki a RISC komplexet, amíg a másik szál lebomlik. Az érett miRNS-ek 18-25 nukleotid hosszúak, az mRNS 3' UTR régiójához kötődnek és azok degradációját, a transláció gátlását vagy időbeli késleltetését eredményezhetik. Ezen kívül a miRNS-ek aktív vagy passzív szekréció révén kijuthatnak a sejtekből a keringésbe és részt vehetnek az intercelluláris kommunikációban vagy laboratóriumi biomarkerként is alkalmazhatók. Rövidítések: Ago2: Argonaute 2, DGCR8: DiGeorge syndrome critical/chromosomal region 8), miRNS: mikroRNS, mRNS: messenger RNS, pre-miRNS: prekursor miRNS, pri-miRNS: elsődleges miRNS, Ran-GTP: RAS-related nuclear protein-guanosine triphosphate, RISC: RNA-induced silencing complex, RNS Pol. II/III: RNS polimeráz II/III, TRBP: transactivation-responsive RNA-binding protein. (Az ábra Møller HG és munkatársainak 2013-as közleménye [13] alapján, annak szerkesztésével készült).

A miRNS-ek klasszikus biogeneziséen kívül léteznek alternatív érési utak is, melyek függetlenek lehetnek vagy a Mikroprocesszortól (Drosha-DGCR8), vagy az érési komplextől (Dicer-TRBP). Az első csoport között találjuk a Mirtronokat [17], amelyek nagyon rövid intron szakaszokról íródnak át és a méretük megfelel egy pre-

miRNS nagyságának. A transcriptiót követően az RNS szakasz közvetlenül tud kötődni a Dicer-TRBP komplexhez. Néhány nem kódoló RNS struktúra (transzfer RNS, riboszómális RNS, kis nukleáris RNS, stb.) is hasadhat úgy a Mikroprocesszortól függetlenül, hogy funkcióképes miRNS-ek keletkezzenek [18].

Eddig egy olyan miRNS-t ismerünk (miR-451), melynek az érése Dicer független módon megy végbe. A dupla szálú pre-miR-451 mindössze 17 bázispár hosszúságú (a hajtú szerkezet nélkül), ami túl rövid ahhoz, hogy a Dicer tökéletesen tudja kötni és hasítani. Következésképpen, a miRNS közvetlenül kapcsolódik az Ago2 proteinhez, amely hasítani fogja az endonukleáz doménjével és funkcionális érett miRNS keletkezik [19, 20].

2.2 Az érett miRNS-t magába foglaló szabályozó komplex működése és funkciója

A Dicer függő és független módon keletkezett miRNS duplexek egy szabályozó komplexbe épülnek be és posttranscriptiós génexpressziós folyamatok regulációját végzik. A miRNS általi szabályozó komplex egy ribonukleoprotein komplex, ami legalább egy Ago fehérjéből áll, és egy érett miRNS kapcsolódik hozzá. Az Ago család fehérjéinek a száma fajonként változik. Az embernél 4 ilyen fehérje van, amiket Ago1-4-ig neveztek el. Közülük az Ago2 kiemelkedő fontosságú, mert endonukleáz aktivitással rendelkező doménje van szemben a többi Ago fehérjével. Ennek a funkciónak köszönhetően az Ago2 proteinből és a miRNS duplex vezető szálából összetevődő komplexek (RISC) teljes komplementaritás esetén képesek hasítani az mRNS-t [21].

2.2.1 A RISC szabályozó komplex képződése

Amikor a pre-miRNS elhasad, a miRNS duplex úgy orientálódik, hogy be tudjon épülni az Ago2 fehérjébe [22, 23]. Ez a folyamat egy konformációs változást igényel, amihez a szükséges energia az ATP (adenosine triphosphate) hidrolíziséből származik, és chaperon fehérjék (Hsc70 és Hsp90) jelenlétében történik [24]. A komplex belsejében a miRNS duplex egyik szála (a vezető szál) erősen beépül az Ago2 fehérje magjába, míg a követő szál eliminálódik. Ez az elimináció végbe mehet i) az Ago2 endonukleáz hasítása révén, ha a két szál egymás komplementerei, vagy ii) a két szál szétbontásával, ami az Ago2 fehérje N-terminális doménjén keresztül történik [25]. A miRBase adatbázis alapján a két szálat az eredetük alapján különböztetjük meg -5p vagy

-3p jelöléssel (pl. miR-223-3p) attól függően, hogy a pre-miRNS 5' vagy 3' végéről származnak. A követő szálat egy csillag jelzéssel (miRNS*) különböztetik meg a vezető száltól. A miRNS és az Ago2 közötti interakció független a szekvenciától, mert a miRNS egész hosszára jellemző hidroxilált ribóz váz lép kapcsolatba a fehérjével, nem pedig a nitrogénbázisok [22, 23].

2.2.2 A vezető szál kiválasztása

A két miRNS szál közül a vezető szál egy szelekciós irányt jelezve választódik ki, ami a duplex végeinek a termodinamikai stabilitásához kötődik és általában az uracil nukleotiddal kezdődő szál marad meg. A Dicer az egyik kofaktora segítségével méri a duplex termodinamikai stabilitását, ami befolyásolja ennek elhelyezkedését a komplexen belül és irányítja beépülését az Ago2-be. Az Ago2 fehérje esetén a MID (middle) domén affinitása a miRNS-hez függ az 5' végen lévő nukleotidtól [26, 27] és ez meg is magyarázza, hogy miért van a legtöbb miRNS 5' végén uracil vagy adenzin bázis. Egyes miRNS-ek esetében a két szál nagyon hasonló szinten található meg, míg más esetekben az érett szál kiválasztása függ a sejtípustól és bizonyos fiziológias vagy patológias körülmények függvényében változhat [27].

2.2.3 A cél mRNS-ek felismerése

A RISC komplexben a miRNS-ek teszik lehetővé, hogy a szabályozó egység felismerje a cél mRNS-ek kapcsolódási helyeit és azokhoz kötődni tudjon. Az siRNS-ek esetében teljes komplementaritás áll fenn a kötőhellyel, és ez lehetővé teszi, hogy az Ago2 a 10-11. nukleotid között hasítsa az mRNS-t [21], ami annak degradációjához vezet. Ezt a szabályozó mechanizmust főleg növényeknél lehet megfigyelni, ahol a miRNS és az mRNS szekvenciái a legtöbb esetben teljesen megegyeznek. Az emlősöknél eddig még csak kevés, ennyire tökéletes komplementaritású kötőhelyet azonosítottak, inkább az jellemző, hogy a miRNS szekvenciája csak részben egyezik meg az mRNS-ével.

A szabályozó komplexek és a cél mRNS-ek közötti interakció kritériumait az első miRNS-mRNS párokról készült tanulmányokban határozták meg, amit immunprecipitációs módszerrel, valamint az Ago2 kötőhelyeinek szekvenálásával is megerősítettek [28-30]. A miRNS 5' végén lévő első nukleotid teszi lehetővé a miRNS beilleszkedését a szabályozó komplexbe, így ez nem vesz részt a cél mRNS

felismerésében. Az esetek többségében a 2-8. nukleotidok képezik a miRNS kulcs régióját (seed), amely megegyezik a cél mRNS kötőhelyének szekvenciájával. A 9-11. nukleotidok általában nem komplementerek, amik viszont megakadályozzák az Ago2 általi hasítást. A 3' végen egy kiegészítő egyezést figyelhetünk meg, ami megerősíti a RISC komplex interakcióját az mRNS-el, amikor a „seed” régió nem kötődött teljesen. A miRNS-ek kapcsolódási helye többségében az mRNS 3' UTR régiójában helyezkedik el, legalább 15 nukleotid távolságra a kódoló régiótól, de a kódoló szekvenciák végén, vagy a poli-A farok közelében is lehetnek [30].

2.2.4 A szabályozó komplexek hatásmechanizmusai

A miRNS-ek többsége posttranscriptiós módon gátolja a cél gének kifejeződését. A miRNS-ek 2 fő mechanizmuson keresztül fejtik ki hatásukat. Az egyik a transzláció gátlása (az iniciáció akadályozása, a polipeptid lánc elongációjának megzavarása, vagy a keletkező peptidek lebontása) [31, 32], a másik az mRNS-ek destabilizálása deadenilációs és „decapping” mechanizmusok által [33, 34], ami pedig degradációhoz vezethet. A transcriptomikai és a proteomikai vizsgálatok eredményei közötti korrelációs vizsgálatok [35, 36] azt sugallják, hogy az mRNS-ek destabilizációja lehet a miRNS-ek fő szabályozó mechanizmusa, vagy legalábbis a leghatékonyabb, ami csökkentheti a fehérje expressziót. Ezen felül az mRNS-ek kódoló régiójában lévő kötőhelyek kevésbé befolyásolják a fehérje expressziót, mint azok, amelyek a 3' UTR-ben találhatóak. A közelmúltban megjelent munkák azt is kimutatták a muslicában [37] és a zebra-dánióban (*Danio rerio*) [38], hogy a két szabályozó mechanizmus akár követheti is egymást, de a transzláció gátlása megelőzi az mRNS destabilizációját. A ribonukleoprotein komplexek ugyanakkor stimulálhatják az mRNS-ek transzlációját bizonyos körülmények között (a miR-369 fokozta a TNF- α (tumor necrosis factor- α) gén transzlációját, amikor a miRNS a TNF- α mRNS „AU”-gazdag régiójához kötődött) [39]. Más miRNS (miR-10a) a riboszómális fehérjék transzlációját fokozhatja, ha az mRNS 5' UTR régiójához kötődik [40].

2.3 A miRNS-ek fiziológiás és patológias funkciói

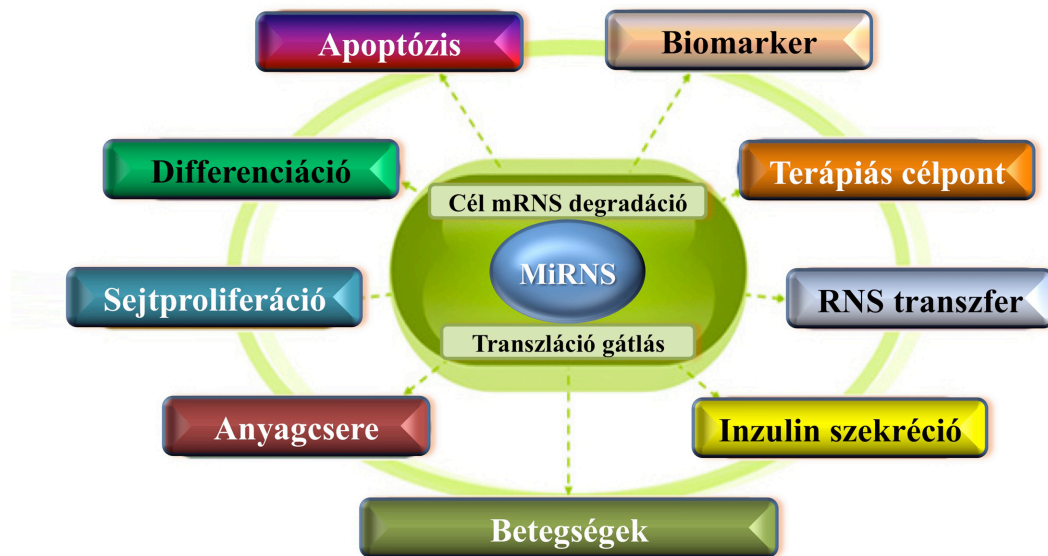
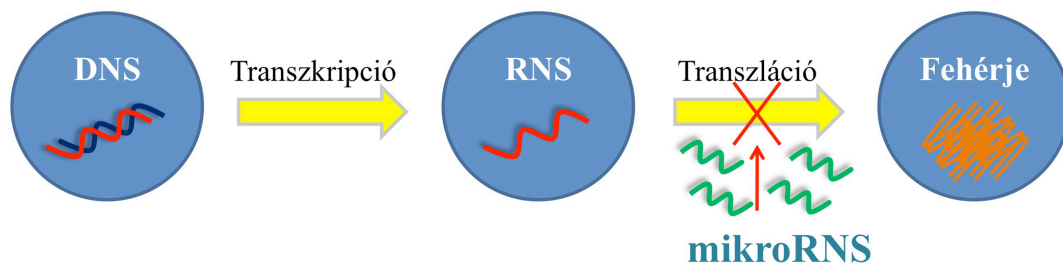
A miRNS-ek a működésük révén a transzláció bekövetkeztét hiúsítják meg (2. ábra). A miRNS általi szabályozás tehát nem szünteti meg egy gén működését, csak csökkenti annak kifejeződését. Minden miRNS akár több száz gént tud szabályozni, és

egy gént egyszerre akár több miRNS is regulálhat. Úgy vélik, hogy a kódoló gének kb. 60%-a áll a miRNS-ek szabályozása alatt [1, 41]. A fiziológias és patológias celluláris folyamatok döntő többségében kimutatták a miRNS-ek kóros szerepét (2. ábra), amelyeket a következő fejezetekben fogunk bemutatni.

2.3.1 A miRNS-ek szerepe a fiziológias folyamatokban

A miRNS-ek funkciójáról szóló első tanulmányok [2, 6] a gének időszakos szabályozásában betöltött szerepüket mutatták ki a fonalféreg fejlődésében. A miRNS-ek érésében részt vevő enzimek hiányában végzett kísérletek bebizonyították, hogy a miRNS-ek fontos szerepet játszanak az embriogenezisben [42]. Egyes miRNS-ek, mint például a let-7 család miRNS-ei, elősegítik sejtek differenciálódását és gátolják a szomatikus sejtek dedifferenciálódását pluripotens sejtekké. Míg a let-7 miRNS-ek a globális sejt differenciálódásban vesznek részt, addig más miRNS-ek a sejtek specifikus elköteleződését fogják megkönnyíteni. Ezt részletesen tanulmányozták a hematopoetikus őssejtek differenciálódása esetében [43]. Minden egyes vérsejtnek van saját miRNS készlete és az egyes miRNS-ek működése fogja beindítani a progenitor sejt differenciálódását. A miR-223 expressziója például myeloid irányba indítja el a progenitor sejt differenciálódását [44]. Ezzel ellentétben, a miR-181 a lymphoid típusú sejtek differenciálódásában játszik fontos szerepet [45].

A miRNS-ek tehát a legfontosabb sejt folyamatokban vesznek részt (2. ábra). A miR-26 családban tartozó miRNS-ek például a nyugvó sejtekben fejeződnek ki, melyek szintje a sejt ciklus folyamán változik és a G1/S fázisba foglalt géneket gátolják [46]. A miR-34 család miRNS-ei a p53 tumorszupresszor gén kifejeződését eredményezik [47], ami jelentős szerepet játszik a sejtek öregedésében és apoptózisában.



2. ábra. A miRNS-ek szerepe. A miRNS-ek a gének expressziójának posttranscriptiós szabályozását végzik az mRNS destabilizálásán és a transzláció gátlásán keresztül (felső ábrarész). Fiziológiai körülmények között fontos szerepük van a sejt differenciációban, az anyagcsereben, a hemosztázisban és a jelátviteli folyamatokban, ugyanakkor megváltozott expressziójuk számos betegség kialakulásához vezethet, mint például tumorok, diabetes mellitus vagy autoimmun kórképek (alsó ábrarész). Ezen felül új típusú laboratóriumi biomarkerek vagy terápiás célpontok is lehetnek. Rövidítések: miRNS: mikroRNS, mRNS: messenger RNS. (Az ábra Weimer EA és munkatársainak 2007-es közleménye [48] alapján, az eredeti ábra szerkesztésével és kiegészítésével készült).

2.3.2 A miRNS szintek változásának patológias következményei

Az alapvető fiziológiai folyamatokban betöltött szerepük megismerését követően a miRNS-ek abnormális működését különböző betegségekben és daganatokban is hamar bizonyították [48, 49]. A miRNS-ek szintjét egy debreceni kutatócsoport kis sejttes tüdőrákban vizsgálta, mely tanulmányban 24 miRNS (pl. miR-301, miR-223 és miR-374) megváltozott expresszióját találták a primer tumorban a normál tüdőszövethez képest, így ezek akár új diagnosztikai markerként is szolgálhatnak [49]. A miRNS-ek fontos szereppel bírnak az agy megfelelő működésében, de a miRNS-ek expressziójának változása vagy a kapcsolódási helyek mutációi hozzájárulhatnak betegségek, pl. a neurodegeneratív kórképek kialakulásához [50, 51]. Bizonyos miRNS-ek részt vesznek az anyagcsere folyamatok szabályozásában, ugyanakkor megváltozott expressziójukat mutatták ki olyan betegségek kialakulásakor mint a DM2, illetve a

dyslipidemia [52]. A miR-21 fokozottan kifejeződik egyes daganatokban, és számos tumorszuppresszor gén befolyásolása révén jelentős onkogén tulajdonsággal bír [53]. A miR-21 által gátolt gének miatt fokozódik a kóros sejtek proliferációja, valamint csökken az apoptózis képességük, amelyek hozzájárulnak a daganatos sejtek inváziójához [53].

2.3.3 Az extracelluláris miRNS-ek szerepe

AmiRNS-eket különböző biológiai folyadékokban is tudjuk detektálni, mint a plazmában, a vizeletben, a könnyben, a nyálban és az anyatejben [54]. Az RNS transzferen keresztül a miRNS-ek nemcsak a saját, hanem más sejtek működését is képesek befolyásolni, ezáltal az intercelluláris kommunikáció egyik fontos megnyilvánulását jelentik [55].

2.3.3.1 A keringő miRNS-ek jellemzői

Az extracelluláris térben megtalálható miRNS-ek aktív vagy passzív szekrécióval [55] kerülnek ki a sejtekből (1. ábra). Egy jelentős részük (kb. 70%-uk) a thrombocytákból szabadul ki. A plazmában és a szérumban megtalálható RNázok aktivitásának ellenére a keringő miRNS-ek meglehetősen stabilak, ami azt feltételezi, hogy lipid és/vagy fehérje összetevők által védettek. Exoszómákba és apoptotikus testekbe csomagoltan, Ago2 fehérjéhez vagy HDL-hez (high density lipoprotein) kapcsolatosan, a keringésben döntően vérlemezke eredetű mikropartikulákban vannak jelen [52, 55]. A vezikulák vagy a ribonukleoprotein komplexek bekötődhetnek a fogadó sejt felszínén lévő receptorokhoz (pl. foszfatidil-szerin) és ezeken át, vagy a sejtmembránnal fuzionálva juthat be az RNS tartalom.

2.3.3.2 A miRNS-ekhez kapcsolt sejt-sejt közötti kommunikáció

Az exoszómák általi RNS transzfert először az emberi és egér mastocytá sejtekből szeparált exoszómákban mutatták ki. Ezek miRNS-eket és mRNS-eket is tartalmaztak és átkerülhettek más mastocytá sejtekbe is [56]. Recipiens sejt génexpressziójának az extracelluláris miRNS-ek általi szabályozását a myeloid leukémiás K562 sejtek által termelt exoszómákban mutatták ki. Az exoszómákban nagy mennyiségben volt jelen a miR-92a, ami a HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) sejtekbe bejutva olyan cél mRNS-ek szabályozását végezte, amelyek elősegítik a tubuláris rendszer

kialakulását és a sejtek migrációját [57]. A gyulladással és trombotikus folyamatok során a vérlemezke aktiváció által képződő mikropartikulák endothelsejtekkel és macrophagokkal is kapcsolatba léphet [58]. A miR-320b az endothelsejtek ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) fehérje expresszióját befolyásolta [59], míg a miR-223 másik két mRNS (FBXW7: F-box/WD repeat-containing protein 7, EFNA1: ephrin A1) szintjét és a sejtek apoptózisát is képes volt modulálni [58, 60]. Néhány évvel később a miR-126 miRNS-t tartalmazó mikropartikulák bejutását tudták igazolni makrophágokba [58], amely jelentősen csökkentette a CCL4 (Chemokine (C-C motif) ligand 4), a CSF1 (colony stimulating factor 1) és a TNF mRNS és fehérje szinteket, és fokozta a sejtek phagocytosis funkcióját. A monocyták eredetű miR-150-et tartalmazó exoszómák az endothelsejtek migrációját fokozták *in vitro* [61].

2.3.3.3 A keringő miRNS-ek mint potenciális biomarkerek

Az extracelluláris miRNS-ek, de főleg a plazmában keringő miRNS-ek expressziós szintje számos kóros folyamatban megváltozik, ezáltal segíthetik az egyes betegségek diagnózisát. A szolid tumorok esetében számos olyan miRNS-t azonosítottak, amelyek szintje jelentősen megváltozott [48, 49, 62]. Hasonló módon kardiovaszkuláris kórképekben is jellegzetes változásokat figyeltek meg a miRNS szintekben [63-67], amik hozzájárulhatnak a diagnosztikai és prognosztikai vizsgálatok fejlődéséhez.

2.4 A vérlemezke aktiválódáshoz köthető miRNS-ek jellemzése

2.4.1 A thrombocyták aktiváció jelentősége

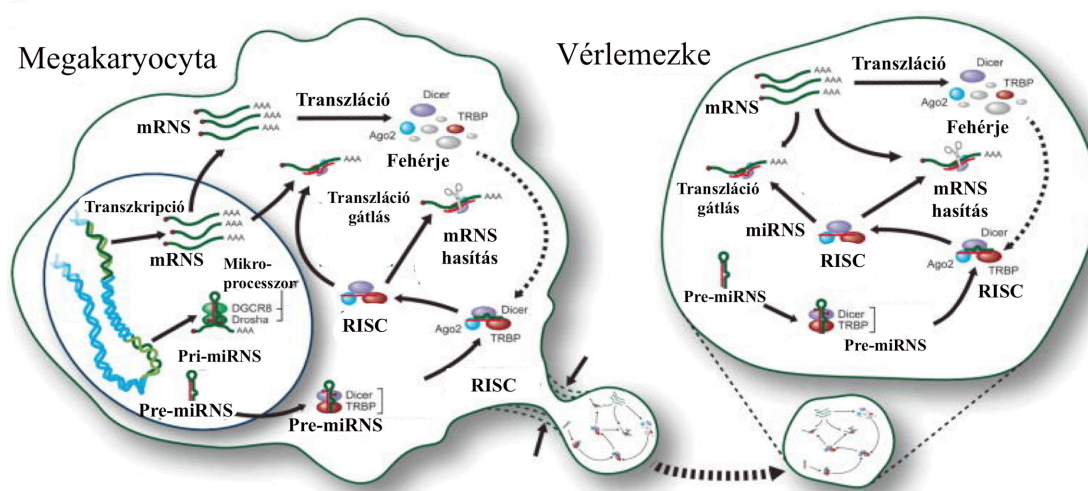
A vérlemezkek a csontvelőben [68] és egy újabb állatkísérletes tanulmány szerint a tüdőszövetben [69] elhelyezkedő MK-ről lefűződve jutnak be a keringésbe. Sejtmagjuk nincs, élettartamuk egészséges ember keringésében mintegy 9-11 nap. Méretük megközelítőleg 2-5 μm és átlagosan 150-400 ezer van belőlük 1 mm^3 vérben. Fiziológiai körülmények között az érfal sérülés esetén felszabaduló molekulák (pl. kollagén, von Willebrand faktor, stb.) különböző receptorokon keresztül aktiválják a thrombocytákat, melyek egymással és más sejtekkel aggregálódva, valamint a sérült érfalhoz kitapadva beindítják a primer hemosztázist [70]. Emellett újabb kutatási adatok alapján [71, 72] fontos szerepük lehet a kórokozókkal szembeni védekezésben is. Különböző mediátorok és citokinek termelésével és az immunsejtekkel interakcióba

lépve összehangolják a gyulladásos folyamatok lezajlását, valamint képesek lehetnek bizonyos kórokozókat megkötni és eliminálni. Ugyanakkor súlyos fertőzésben vagy gyulladásos, metabolikus betegségben a vérlemezkék nagyobb mértékű aktivációját figyelhetjük meg, amely akár trombotikus komplikációk kialakulását okozhatja. Ilyen stimulus lehet DM2-ben a hyperglycaemia [73, 74], szepszisben a Gram-pozitív vagy Gram-negatív baktériumokból származó sejtalkomponensek (pl. peptidoglycan, LPS: lipopolysaccharide) [75, 76], a lipidanyagcsere betegségekben a magas koleszterinszint [77], illetve maga az obezitás [78]. A különböző kórképekben emelkedett vérlemezke aktivációs állapot magas sejtfelszíni P-selectin (CD62) expresszióval és nagyobb szolubilis plazmakoncentrációval mutatható ki, ami jelezheti a vaszkuláris szövődmények kialakulását [70, 73, 76].

2.4.2 A thrombocyták RNS tartalma

A vérlemezkék nem rendelkeznek sejtmaggal, de tartalmaznak MK-eredetű mRNS-t, miRNS-t, számos sejtalkotót (pl. riboszóma, endoplazmatikus retikulum, stb.) és enzimeket (pl. Dicer) (3. ábra). Mindezek birtokában bizonyos stimulusok hatására akár *de novo* fehérjeszintézis is lejátszódhat bennük (pl. IL-1 β) [79-81]. Mivel a vérlemezkékben nincs transcriptió úgy tűnik, hogy a pre-mRNS „splicing” mechanizmusának [82] és a miRNS-ek működésének jóval nagyobb szerepe lehet, mint más maggal rendelkező sejtekben [80]. A thrombocytákban relatíve nagyobb is a miRNS:összRNS arány, mint a fehérvérsejtekben [83]. Jelenleg több, mint 500 miRNS-t azonosítottak [83, 84], amelyek nemcsak a vérlemezke aktivációt elősegítő, de az azt megakadályozó fehérjék expresszióját is befolyásolhatják, így kontrollálva a sejtaktivációs folyamatokat és a trombus képződést. 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-26, let-7, miR-103, miR-185, miR-21, miR-140, miR-23a, miR-22 és a miR-24, melyek a vérlemezkében lévő miRNS-ek közel 80%-át alkotják, így feltehetően ezeknek jelentősebb szerepe lehet a thrombocyta funkció szabályozásában [80, 82, 83, 85, 86]. A nyugvó vérlemezkékben a miRNS-t tartalmazó RISC komplex megakadályozza az aktiváció-függő fehérjék szintézisét az mRNS kifejeződésének gátlásán keresztül, a Dicer működése pedig az érett miRNS expresszió fenntartását biztosítja [87, 88]. Vérlemezke aktiváció (pl. thrombin által) hatására

viszont a mRNS-ek leválhatnak az őket szabályozó RISC-ről és így végbe mehet a fehérjeszintézis (pl. Plasminogen activator inhibitor-1) [87]. DM2-ben a thrombocyta aktivációval együtt járó emelkedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció hatására a Ca^{2+} -függő calpain 1 és 2 aktiválódik, melyek hasítva a Dicer-t, lecsökkentik az enzim aktivitását, ezáltal számos érett miRNS szintje alacsonyabb lesz [88]. A Dicer jelentőségét az enzimre deficiens (KO: knock-out) egérek kísérletben is igazolták, amikor a vad típusú állatokhoz képest a fibrinogén receptor szintje emelkedett és a thrombocyták *in vivo* funkciója is fokozottabb volt [89].



3. ábra. A vérlemezke miRNS-ek származása. Közel 10 éve tudjuk, hogy a vérlemezkek is tartalmaznak mRNS-t, miRNS-t és olyan sejtalkotókat (riboszóma, endoplazmatikus retikulum), fehérjéket (Ago2) és enzimeket (Dicer), amik lehetővé teszik a fehérjeszintézist és annak szabályozását. Ezek a molekulák a megakaryocytákból való lefűződésük során, a sejtek citoplazmájából kerülnek a thrombocytákba. A Dicer enzim jelenlétében a pre-miRNS-ek érése is végbemehet és az érett miRNS-ek az Ago2 fehérjéhez kapcsolódva a RISC komplexen belül, szabályozhatják a transzlációt. Rövidítések: Ago2: Argonaute 2, DGCR8: DiGeorge syndrome critical/chromosome region 8, miRNS: mikroRNS, mRNS: messenger RNS, pre-miRNS: prekursor miRNS, pri-miRNS: elsődleges miRNS, RISC: RNA-induced silencing complex, TRBP: transactivation-responsive RNA-binding protein. (Az ábra Landry P és munkatársainak 2009-es közleménye [80] alapján, annak szerkesztésével készült).

A vérlemezkekben megváltozott RNS profil [74, 81] abból is adódhat, hogy már az MK sejtek szintjén módosulnak a miRNS, a pre-miRNS, az mRNS szintek vagy maga a Dicer funkciója, az RNS-ek eltérő „sorting” mechanizmussal [90] is bekerülhetnek a lefűződő thrombocytákba. A thrombopoiesis és a megakaryopoiesis összetett folyamatában is közreműködnek a miRNS-ek. Az MK sejtek differenciációja és proliferációja során a miR-223 és miR-150 szintje megemelkedik, míg a miR-155 expressziója lecsökken [91-93].

2.4.2.1 A thrombocyta aktiváció szabályozásában részt vevő miRNS-ek és cél mRNS-ek

Néhány miRNS és cél mRNS-e közötti direkt kapcsolatot már igazolták a vérlemezkékben. Elsőként Landry és munkatársai mutatták ki, hogy a miR-223 képes szabályozni a P2Y₁₂ ADP-receptor expresszióját [80], ami a vérlemezke funkció szabályozásában vesz részt [70]. A miR-223 emellett a thrombocyta β 1-integrin, kidlin-3 és FXIII véralvadási faktor A alegységének expressziójának regulációjáért is felelős [88]. A miR-223 depletált egerekben fokozott vérlemezke aktivációt tapasztaltak [88], ami alátámasztja ezen miRNS központi szerepét. Reaktív thrombocytákban a lecsökkent miR-96 emelkedett VAMP8 (Vesicle-associated membrane protein 8) mRNS és fehérje szinthez vezetett [94], ami hozzájárult a vérlemezkék fokozott szekréciójához. A miR-126 szintén szabályozhatja a P2Y₁₂ receptort, de az ADAM9 (a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9) fehérje expresszióját is képes gátolni [95], ami a vérlemezkék I. típusú kollagénhez való adhézióját akadályozza. A fibrinogén receptor promotor régióját aktiváló transzkripciós faktor (MAFB) mRNS szintjét öt különböző miRNS (miR-326, miR-128, miR-331, miR-500 és miR-130a) is regulálhatja [89, 96]. Végül, a thrombocyták alacsony aktivációs állapotáért a miR-200b lehet felelős [84], mely az epinephrine-indukálta vérlemezke aktivációt serkentő PRKAR2B (cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit) gén kifejeződését represszálja. A vérlemezke aktiváció korai szakaszában bekövetkező alakváltozáshoz (shape-change) a KLHL5 (kelch like family member 5) fehérje és a miR-495 interakciója járulhat hozzá [84].

2.4.3 A thrombocyta aktiválódás és a miRNS szint változásának kapcsolata DM2-ben

DM2-ben a hasnyálmirigy Langerhans-szigetek β -sejtjeinek fokozatos kimerülése és az inzulin rezisztencia miatt kialakuló hyperglycaemia fokozatosan emeli a vérlemezkék aktivációs állapotát [97]. Az endothelsejt diszfunkció mellett ezek a reaktív thrombocyták is felelősek lehetnek a cukorbetegségben gyakran megjelenő kardiovaszkuláris szövődmények kialakulásáért [98]. Felfedezésük óta, egyre több érdeklődés irányul a vérlemezkékben azonosítható miRNS-ek szerepére az egyes betegségekben, így DM2-ben is [64, 99, 100]. A kutatások többsége arra irányult, hogy a nem kódoló kis RNS-ek és cél mRNS-ek expressziója hogyan változott és ennek milyen funkcionális szerepe lehet. Csökkent vérlemezke miR-223 és miR-146 expressziókat találtak [99, 100], ami a stroke kialakulásának kockázatát növelte DM2-

ben [100]. Emellett plazma mintákban is jelentősen csökkent a keringő miR-223, miR-126, miR-24, miR-197, miR-191 és miR-21 szintje mind DM2-ben, mind súlyos atherosclerosisban [99, 101]. A megváltozott miRNS szintek befolyásolhatják a vérlemezke funkciót gátló kezelés hatékonyságát (pl. a miR-223 a P2Y12-receptoron keresztül ható clopidogrel hatását) és potenciális biomarkerként szolgálhatnak a DM2 és szövődményeinek korai előrejelzésében (pl. miR-103b) [102-104].

DM2-ben a thrombocytá aktivációs markerek (pl. P-selectin) mennyisége a sejtfelszínen és a plazmában szolubilis formában is megnő [73, 74], ugyanakkor még nem tudjuk, hogy mely miRNS-ek vesznek részt a P-selectin expresszió szabályozásában. Különböző adatbázisok és predikciós programok alapján (pl. www.microna.org, www.targetscan.org) a komplementaritás elve szerint a miR-26b és a miR-140 részt vehet a P-selectint kódoló gén (SELP) mRNS funkció szabályozásában.

2.5 Az endothelsejt aktiváció transcriptió és posttranscriptió szintű szabályozása

2.5.1 A koronária fémsztentek és a gyógyszer-eluáló sztentek alkalmazásának klinikai vonatkozásai

A koronária betegségek kezelésében - az intervenciós kardiológia nagy léptékű fejlődése által - egyre szélesebb körben alkalmazzák a különböző koronária sztenteket [105, 106]. A klasszikus fémsztentek (BMS) helyett egyre gyakrabban a gyógyszer kibocsátó sztentet (DES) alkalmazzák olyan ischémias szívbetegségekben, amikor a BMS beavatkozást követően újabb sztentelés szükséges esetleges elzáródás miatt. Továbbá a trombotikus komplikációkra hajlamosító betegségekben is ezt a sztent típust választják első vonalban, pl. DM2-ben [105, 106]. Klinikai adatok alapján az everolimussal bevont DES megbízhatóbb acut myocardialis infarctust (AMI) követően [107], pitvar fibrillációban [108] és stabil anginában [109], mivel csökkenti a korai események kialakulásának kockázatát. A fémsztentek használata mellett a gyorsabb endothelizáció miatt a sztentthrombosis vagy az sztent-restenosis kockázata nagyobb lehet [110]. Az invazív katéteres beavatkozás és különösen a komplikációk kialakulása emelkedett E-selectin [111], VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) és TNF- α (tumor necrosis factor- α) koncentrációkat [112] okozott. A DES és BMS különböző típusainak hatékonyságát tehát számos klinikai tanulmányban vizsgálták, azonban a direkt sejtaktiváló tulajdonságainak összehasonlításakor ellentmondásos eredményeket

kaptak [111, 112], így kevés információ áll rendelkezésre a kétféle sztent ilyen típusú hatásairól.

2.5.2 Az everolimus sejtaktivációra kifejtett hatása

Az everolimus egy mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitor, amit leggyakrabban immunszuppresszív gyógyszerként alkalmaznak szervátültetésben részesült betegeknél, hogy megelőzzék a beültetett szerv kilökődését. Simaizomsejtekben, a sejtciklus G1 fázisának gátlásán keresztül antiproliferatív [113], valamint a fehérvérsejtekre kifejtett gyulladáscsökkentő hatását is igazolták. Neutrophil granulocytákban csökkentette az IL-8 (interleukin-8) termelését és a sejtek TNF- α indukálta adhézióját is mérsékelte az endothelsejtekhez [114]. Az everolimus analógja a sirolimus (rapamycin) csökkenteni tudta a TNF- α kezeléssel kiváltott HUVEC sejtek VCAM-1 szintjét az mTORC2 (mTOR complex 2) aktivitásának gátlásán keresztül [115]. Az everolimus endothelsejt aktivációt csökkentő hatásának lehetséges transcriptiós és posttranscriptiós szabályozó mechanizmusait ugyanakkor még nem vizsgálták.

2.5.3 A miRNS-ek szerepe az endothelsejt aktivációban

A génexpresszió finomszabályozásáért felelős miRNS-ek patofiziológiai szerepét vaszkuláris betegségekből [63-67] is kimutatták. A teljes vérben mért miR-1291 és miR-663b expressziók mutatták a legnagyobb specificitást myocardiális infarktusból a kontroll személyekkel szemben, míg a keringő miR-25, miR-221 és miR-374b a STEMI (ST-Elevation Myocardial Infarction) és a NSTEMI (Non ST Elevation Myocardial Infarction) elkülönítésében nyújtott segítséget [64]. A miR-133a, miR-155 és a miR-126 az érfalat érintő különböző celluláris és gyulladással kapcsolatos folyamatokkal került összefüggésbe, melynek köszönhetően potenciális biomarkerek lehetnek a kardiovaszkuláris kórképekben [66, 67]. A koronária sztent műtétet követő neointima képződésben, az ISR kialakulásában felmerült a megváltozott expressziót mutató keringő miRNS-ek szerepe. ISR-ben a keringő miR-21 szintje jelentősen emelkedett, míg a miR-100, miR-143 és miR-145 mennyisége kisebb volt, melyek az érfal simaizomsejtjeinek (VSMC) proliferációját és migrációját befolyásolták [116]. Egyes miRNS-ek szerepét állatmodellben is bizonyították: a miR-21 KO egerekben [117] kisebb volt a restenosis mértéke, a patkányokba adott anti-miR-21 [118] vagy a miR-

126 túlzott kifejeződése [119] pedig megelőzte az ISR kialakulását. Arról viszont kevés információ áll rendelkezésre, hogy a miRNS-ek hogyan regulálhatják az implantáció indukálta endothelsejt aktiváció kialakulását. Az endothelsejt aktivációs markerek (VCAM-1 és E-selectin) kifejeződésének szabályozásában a miR-181b szerepét részben kutatták már [120], amit mi tovább vizsgáltunk.

2.5.4 A transcriptiót szabályozó enhancer RNS-ek jellemzői

Az enhancer RNS-ek (eRNS) a nem-kódoló RNS-ek családjába tartozik és 2010-ben azonosították [121] genom szintű RNS és Chip-seq (chromatin immunoprecipitation-sequencing) szekvenálással. Az RNS szekvenálás és a bioinformatikai elemzés az eRNS-ek direkt azonosítását teszi tehetővé, míg a Chip szekvenálással az aktív eRNS-eket jelölő markerek (H3K27Ac) és az RNS polimeráz II működése azonosítható. A DNS enhancer régióiról kerülnek átírásra, a gének transcriptióját szabályozzák. Az aktív eRNS-ek az RNS polimeráz II-vel kapcsolódnak, transcriptiós és inicializációs faktorokat toboroznak a promoter régióhoz, ezáltal fokozhatják a gének transcriptióját. Az enhancer szekvenciák akár több tízezer nukleotid távolságra is lehetnek a kódoló szekvenciáktól az 5' végen [121, 122]. A szekvenálási adatok az NCBI GEO adatbázisában elérhetőek és meghatározott génekre fókuszálva újraanalizálhatók [123], ahogy ezt mi is megtettük a vizsgálataink során.

3. Célkitűzések

A kísérletes munkánk célja a vérlemezke és endothelsejt miRNS-ek jellemzése és hatásmechanizmusának jobb megismerése volt thrombocyta és endothelsejt aktivációval járó két kórképben.

3.1 A thrombocyta és MK miRNS-ek vizsgálata DM2-ben

Azt feltételeztük, hogy a hyperglycaemia hatására megváltozott MK és thrombocyta miRNS expressziók hozzájárulhatnak a fokozott vérlemezke aktivációhoz DM2-ben.

- Célunk volt olyan miRNS-ek szerepét megvizsgálni, amelyek nagy mennyiségben találhatóak meg a vérlemezkékből és szerepet játszhatnak a thrombocyta aktivációban. A miR-223, miR-26b és miR-140, valamint azok cél mRNS-ei (P2RY12 és SELP) expresszió változását szeparált thrombocyta és plazma mintákban mértük DM2-ben, obez és egészséges kontroll személyekhez hasonlítva.
- A diabeteses csontvelői körülményeket kétféle MK sejtvonalon (MEG-01 és K562-MK) modelleztük, így tanulmányozva a hyperglycaemia közvetlen hatását a sejtek miRNS és mRNS tartalmára.
- Igazolni kívántuk a miR-26b, a miR-140 és a SELP mRNS közötti direkt kapcsolatot miRNS mimic és inhibitor használatával a MK sejtekben.
- Vizsgáltuk a DM2-ben megváltozott Dicer enzim funkcióját calpain inhibitor (calpeptin) használatával MEG-01 MK sejtekben.

3.2 A BMS és DES sejtaktiváló hatásának összehasonlítása stabil anginás betegekben

Hipotézisünk szerint a koronária BMS nagyobb mértékű thrombocyta és endothelsejt aktivációt okoz, mint a DES, ezáltal gyakrabban alakulhatnak ki klinikai komplikációk (pl. ISR).

- Össze kívántuk hasonlítani a kétféle sztent használata mellett megmért szolubilis markerek koncentrációját a kezelés előtti és az azt követő két (24 óra és 1 hónap) időpontban.
- A betegeket 6 hónapon keresztül követtük és a sztent típus, valamint az ISR kialakulása alapján a biomarker eredményeket több alcsoportban tovább értékeltük.

3.3 Az everolimus endothelsejt aktivációt csökkentő hatásának vizsgálata

Feltételeztük, hogy a DES-ről eluálódó everolimus, mint mTOR inhibitor, képes az endothelsejt aktivációban részt vevő fehérjék expresszióját jelentősen csökkenteni.

- Célunk volt a vaszkuláris gyulladáscsökkentő folyamatokat artériás típusú koronária (HCAEC) és vénás (HUVEC) endothelsejtekben modellezni és transcriptiós szinten vizsgálni a SELE és a VCAM1 génexpressziókat *in vitro*.
- Ezen gének posttranscriptiós szabályozásáért felelős miR-181b érett és prekursor formáit analizáltuk TNF- α -val kezelt endothelsejtekben everolimus jelenlétében és hiányában.
- Az everolimus gyulladáscsökkentő hatását az NF- κ B útvonal aktiválódásán és az enhancer RNS-ek expresszió változásán keresztül is követtük.
- A BMS és DES kezelésben részesült stabil anginás betegek plazma mintájában a keringő miRNS-ek expresszióját is megvizsgáltuk a beavatkozást követően kialakult ISR jelenlétében és hiányában.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Betegek és kontrollok

4.1.1 DM2 betegek, obez és egészséges kontroll személyek

A laboratóriumi kísérletes munka során felhasznált vérmintákat a Debreceni Egyetem klinikai egységeiben gyűjtöttük össze. A DM2-ben, valamint obezításban szenvedő betegek kiválasztásában és a minták eljuttatásában Dr. Káplár Miklós egyetemi docens (Belgyógyászati Intézet) nyújtott segítséget, az egészséges kontroll mintákat a Laboratóriumi Medicina Intézet önkéntesei biztosították (a vizsgálat etikai engedély száma: 4102/2014). A tanulmányban 28 DM2 és 23 korban és nemben azonos egészséges kontroll, valamint 19 nem diabéteses, de obez személy mintáiban vizsgáltuk a vérlemezke aktiváció mértékét és az ezt befolyásoló miRNS szinteket. Kizárási kritériumok közé tartozott a súlyos gyulladásos, daganatos, autoimmun és akut kardiovaszkuláris megbetegedések jelenléte, valamint a terhesség és heveny trombotikus szövődmények.

4.1.2 BMS, illetve DES implantációban részesült stabil anginás betegek

A BMS vagy DES beültetését Dr. Szük Tibor adjunktus végezte a Kardiológia Intézetben (Debreceni Egyetem), és a különböző időpontban vett vérmintákat eljuttatta a laboratóriumba további vizsgálatok érdekében (etikai engedély száma: 3510/2011). A 18 hónapos időszak alatt 49 stabil anginás beteget tudtunk bevonni, akik közül 28 fő BMS, 21 beteg pedig DES kezelésben részesült. Kizárási kritérium volt az AMI, krónikus hematológiai és malignus betegségek, korábbi koronária sztent beültetés, valamint krónikus gyulladásos vagy autoimmun betegségek.

A két betegcsoport eredményeinek összehasonlíthatósága érdekében egy adott típusú BMS (Integrity®, Medtronic, Minneapolis, MA, USA) vagy DES (Xience®, Abbott Vascular, Santa Clara, CA, USA) sztentet kapott betegeket válogattunk be. A DES minden esetben everolimus gyógyszerrel volt bevonva. A sztent típusától függetlenül minden beteg 100 mg aszpirin, 600 mg clopidogrel és 100 IU/testtömeg kg-ra számított nem-frakcionált heparin kezelésben részesült az operáció alatt. A sztent kezelés után a betegek 75 mg/nap clopidogrelt kaptak a BMS beültetés esetén 1 hónapon keresztül, míg DES esetén 1 évig, így az 1. hónapos időszakban a gyógyszer

kezelés azonos volt. A két csoport között nem volt jelentős különbség a felhasznált sztentek számában, hosszában és átmérőjében (1. táblázat). A szűkület súlyosságában és a vaszkuláris lézió típusában (A/B1/B2/C) tapasztalt különbségek alapján került eldöntésre, hogy a betegek DES-t vagy BMS-t kaptak.

Beavatkozás körülményei	BMS (n=28)	DES (n=21)	P érték
Lézió típusa (A/B1/B2/C) (%)	36/43/14/7	19/48/19/14	0,06
Stenosis súlyossága (%)	82,3 ± 6,5	88,8 ± 7,6	0,02
Sztentek száma (n)	1,31 ± 0,5	1,36 ± 0,6	0,73
Teljes sztent hosszúság (mm)	24,8 ± 13,2	28,5 ± 15,8	0,38
Átlagos sztent átmérő (mm)	2,95 ± 0,3	2,89 ± 0,4	0,52
Beültetés alatt alkalmazott nyomás (atm)	15,6 ± 2,2	17,2 ± 3,7	0,07
Sztent predilatáció (%)	42,3	81,8	0,07
Sztent posztdilatáció (%)	8,3	18,8	0,05
Végső MLD (minimális lumen átmérő) (mm)	2,98 ± 0,4	2,96 ± 0,3	0,08

1. táblázat. A BMS és DES implantáció körülményei és technikai jellemzői.

4.2 Mintavétel és mintafeldolgozás

A DM2, obez és egészséges kontrollok teljes vénás vérmintái az RNS expressziók vizsgálatára 0,105 M nátrium-citrátot (Na₃-Citrate) tartalmazó Vacutainer csövekbe (Kat.szám: 367714, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) kerültek levételre, személyenként 2 db cső (10 mL). A fehérvérsejt és a vérlemezke számokat Advia 2120 hematológiai analizátorral (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NJ, USA) határoztuk meg. A rutin laboratóriumi diagnosztikai vizsgálatok során lemérésre kerültek i) a szérumban a glükóz, totál koleszterin, HDL, LDL (low density lipoprotein), triglicerid, C-reaktív protein (CRP), valamint a vizelet albumin és kreatinin koncentrációk (Cobas 6000 analizátor, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), ii) a szérumban az inzulin szintek (Liaison XL készülék, DiaSorin, Saluggia, Italy) és iii) a HbA1c értékek (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

A sztentelt betegektől 3 időpontban gyűjtöttünk 0,105 M nátrium-citráttal alvadásgátolt vérmintákat: i) a beavatkozás előtt, ii) a sztentelés után 24 óra múlva, és iii) 1 hónappal a sztentelést követően. Követtük a szérum CRP és cTnT (cardialis troponin T) koncentrációk (Cobas e411 készülék, Roche), a D-dimer, a fibrin monomerek (FM), továbbá a fibrinogén szint (BCS XP, Siemens) alakulását a vizsgálati periódusban. Az aspirin/clopidogrel kezelés hatékonysága az aktuális ajánlásoknak [124] megfelelően vérlemezke aggregáció és a VASP (vasodilatator-stimulated phosphoprotein) fehérje foszforiláció áramlási citometriai vizsgálata alapján került megállapításra. Az endothelsejt aktiváció mértékét részben a von Willebrand faktor antigén (vWF-Ag) szintekkel (BCS XP, Siemens, Munich, Germany) monitoroztuk. Ezen laborparaméterek meghatározását a Laboratóriumi Medicina Intézet Hemosztázis és Integrált kémia részlegein rutinszerűen végezték el.

4.2.1 A fehérvérsejt mentesített vérlemezkek szeparálása

A vérlemezke miRNS és mRNS expressziókat fehérvérsejt depletált thrombocytá mintákban analizáltuk. A felszíni P-selectin expresszió méréséhez (lásd alább) szükséges vérmennyiség elkülönítését (40 μ L) követően a teljes vérmintákat lecentrifugáltuk (170 g, 15 perc, szobahő) és thrombocytá dús plazmát (PRP) nyertünk. A fehérvérsejt kontamináció elkerülésére ügyelve a felső mintaréteget óvatosan átpipettáztuk egy centrifugacsőbe. A fehérvérsejtek eltávolításához Dynabeads CD45-ellenes antitesttel bevont mágneses gyöngyöket (Kat.szám: 11153D, Invitrogen, Oslo, Norway) használtunk. A PRP mintákat (2 mL) és az antitestet 30 percen keresztül inkubáltuk szobahőn, majd 2x2 perc mágneses szeparálást végeztünk. Az így nyert vérlemezke szuszpenziót lecentrifugáltuk (1500 g, 15 perc, szobahő) és a thrombocytá pelletet 1 mL trizol reagenssel (TRI Reagent, kat.szám: TR118, Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) lizáltuk és RNS izolálásig -20 °C-on tároltuk.

4.2.2 A plazmaminták előkészítése a keringő miRNS-ek vizsgálatára

A DM2 betegek vizsgálatakor a PRP mintákat tovább centrifugáltuk (1500 g, 15 perc, szobahő), így thrombocytá szegény plazmát (PPP) kaptunk. A sztentelt betegek plazma mintáit felolvasztás után egyszer centrifugáltuk (10 000 g, 1 perc, szobahő). Az extracelluláris miRNS-ek analíziséhez minden esetben 250 μ L PPP-hez 750 μ L TRI reagenst adtunk és az RNS izolálásig -20 °C-on tároltuk.

4.3 Sejtkultúrák fenntartása és kezelése

4.3.1 A megakaryocita sejtek tenyésztése hyperglycaemiás környezetben

A diabeteses csontvelői körülményeket kétféle humán MK sejtvonalon modelleztük, mert a DM2 betegektől nem álltak rendelkezésünkre csontvelő minták. A humán megakaryoblastos leukémiás MEG-01 sejteket (Kat.szám: 94012401, ECACC, Porton Down, UK) 10% FBS-t (fetal bovine serum, kat.szám: F9665, Sigma, St-Louis, MO, USA), 100 U/mL Penicillin + 100 µg/mL Streptomycin antibiotikumot (Kat.szám: P4458, Sigma) és 2 mM L-glutamint tartalmazó RPMI-1640 médiumban (Kat.szám: R8758, Sigma) tenyésztettük 37°C-on, 5% CO₂ és 95% relatív páratartalom mellett. Az optimális sejtszám az úszó sejtek esetében $0,3 \times 10^6$ db sejt/mL volt. A hyperglycaemiás körülmények [125] kialakítására a kész médiumot kiegészítettük D-glükóz oldattal (33 mM, kat.szám: G8644, Sigma) és a sejteket 8 órától-4 héten keresztül kezeltük. Negatív (ozmotikus) kontroll mintákban a sejteket D-mannitollal (33 mM, Sigma) kezeltük.

A humán krónikus myeloid leukémiás K562 sejteket (Dr. Varga Tamás felajánlásából, Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) a fent leírt médiumban tenyésztettük. Az optimális sejtszám $0,5 \times 10^6$ db sejt/mL volt. Ezeket a sejteket első lépésben 7 nap alatt érett megakaryocytákká differenciáltattuk PMA-val (phorbol-12-myristate-13-acetate) (20 ng/mL, kat.szám: P1585, Sigma). A differenciálódási folyamatot áramlási citometriával (FC-500, Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA), a felszíni CD41 és CD61 expressziók mérésével követtük [126], amihez a sejteket PE-konjugált (phycoerythrin) anti-CD41 (Kat.szám: R7058, Dako, Glostrup, Denmark) és anti-CD61 antitestekkel (Kat.szám: 555754, Becton Dickinson) jelöltük (15 perc, szobahő), kétszer mostuk PBS-el és 1%-os PFA/PBS oldattal fixáltuk. A CD41 és CD61 pozitív sejtek százalékos arányát és az MFI értékeket 100 000 sejt begyűjtésével határoztuk meg. Ezt követően, az érett K562-MK (K562 megakaryocyta) sejteket, a MEG-01 sejtekhez hasonlóan, magas glükóz vagy mannitol (kontroll) koncentrációjú médiumban tenyésztettük. A differenciáltatás után a K562 sejteket az egyre magasabb arányban előforduló apoptotizálódó sejtek miatt legfeljebb 5 napig tudtuk kezelni. A kezelési időt követően a MEG-01 és K562-MK sejteket steril PBS oldattal mostuk, majd 750 µl TRI reagenssel lizáltuk és az RNS izolálásig -20°C-on tároltuk.

4.3.2 Az endothelsejtek tenyésztése gyulladásoz körülmények között

A humán koronária artériás endothelsejteket (HCAEC, kat.szám: 300-05A, Cell Applications) használatra kész MesoEndo Cell Growth médiumban (Kat.szám: 212-500, Cell Applications) tenyésztettük 37°C-on, 5% CO₂ és 95% relatív páratartalom mellett. Ezzel párhuzamosan HUVEC sejteket is fenntartottunk 15% FBS-t (Gibco, kat.szám: 10270106, Grand Island, Ny, USA), 5 U/mL heparint (Teva Gyógyszergyár, 25000 Unit-os kizserelés), 7,5 µg/mL endothelsejt növekedést segítő kiegészítőt (endothelial growth supplement, kat.szám: E2759, Sigma), 1% antibiotikumot és antimikotikumot (Kat.szám: A5955, Sigma) tartalmazó M-199 médiumban (Kat.szám: 11150059, Gibco). A HUVEC sejteket és a médiumot Dr. Jeney Viktóriától és Dr. Balogh Enikőtől (Debreceni, Egyetem, Belgyógyászati Intézet) kaptuk.

A sztent indukálta vaszkuláris gyulladásoz környezet modellezésére az endothelsejteket (3 x 10⁵ sejt/well) 6-lyukú plate-ben (Sigma) rekombináns TNF- α -val (100 ng/mL, kat.szám: PHC3011, Gibco) kezeltük 1-24 órán keresztül. Az everolimust kibocsátó DES endothelsejt aktivációt mérséklő hatásának vizsgálatához az endothelsejtekhez everolimust (0,5 µM, kat.szám: 07741, Sigma) is adtunk. Kontroll mintaként a gyógyszer oldószerét (DMSO: dimethyl sulfoxide, kat.szám: D8418, Sigma) használtuk az előzőekhez hasonló kondíciókban.

A kezelés után a sejtek felülúszóját eltettük ELISA mérésekhez (lásd később), míg a sejteket egyszer mostuk steril HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) oldattal (Kat.szám: H6648, Sigma), 750 µl TRI reagenssel lizáltuk, majd totál RNS-t izoláltunk.

4.4 Laboratóriumi vizsgálatok

4.4.1 A vérlemezke aktiváció vizsgálata a P-selectin expresszió áramlási citometriai meghatározásán keresztül

A thrombocytá aktiváció vizsgálatát mindkét betegcsoportban a felszíni P-selectin (CD62P) expresszió keresztül áramlási citometriai módszerrel végeztük. Ehhez 40 µl teljes vért 1 mL 1%-os PFA/PBS (paraformaldehyde/phosphate buffered saline) oldattal fixáltunk (60 perc, szobahő), majd a vérlemezkék azonosítására FITC-el (fluorescein isothiocyanate) konjugált anti-CD42a antitestet (Kat.szám: 348083, Becton Dickinson) használtunk, míg a P-selectin detektálására PE-el (phycoerythrin) konjugált anti-CD62 antitesttel (Kat.szám: 348107, Becton Dickinson) jelöltük (20 perc, szobahő) a sejteket.

Izotípus kontrollként PE-el konjugált IgG₁ antitesttel (Kat.szám: 340013, Becton Dickinson) jelölt mintát használtunk. A vérlemezke aktiváció mértékét a dupla pozitív sejtek kiértékelésével, 10 000 esemény kiértékelésével határoztuk meg FC-500 áramlási citométerrel (Beckman Coulter).

4.4.2 RNS izolálás

Az RNS tisztításhoz előkészített vérlemezke, sejt kultúra és plazma mintákból a TRI reagens gyártói ajánlásainak megfelelően totál RNS-t izoláltunk. Az RNS minták koncentrációját és tisztaságát NanoDrop spektrofotométerrel (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) határoztuk meg, majd a mintákat -70 °C-on tároltuk.

4.4.3 A fehérvérsejtektől megtisztított vérlemezke minták tisztaságának ellenőrzése

A minták (n=10) tisztaságának ellenőrzése áramlási citometriai (FACS CantoII, Becton Dickinson) és RT-qPCR (valós-idejű kvantitatív polimeráz láncreakció) mérésekkel történt. A fehérvérsejt depletált vérlemezke mintákat FITC-el konjugált anti-CD42a, anti-CD45 (Kat.szám: 345808, Becton Dickinson) és IgG₂ (izotípus kontroll, kat.szám: 349051, Becton Dickinson) antitestekkel jelöltük (20 perc, szobahő), majd kétszer mostuk PBS-el és 1%-os PFA/PBS oldattal fixáltuk (60 perc, szobahő). A fehérvérsejt/vérlemezke arányt áramlási citométerrel határoztuk meg és a mintákban kevesebb, mint 1 fehérvérsejtet detektáltunk 1 millió thrombocytára vonatkoztatva.

Az RNS izolálást követően, első lépésként reverz transzkripcióval cDNS-t (komplementer DNS) készítettünk (High Capacity cDNA RT kit, kat.szám: 4368814, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a kit leírása alapján, majd RT-qPCR módszerrel mértük meg a PTPRC (CD45) és ITGA2B (CD41) mRNS-ek expresszióját. A második reakcióban master mix-et (FastStart Essential DNA Probes Master, kat.szám: 06402682001, Roche), fluoreszcensen jelölt UPL-próbákat (Universal ProbeLibrary probe #75 és #78, 10 µM, Roche) és mRNS specifikus primereket (100 µM, Roche) használtunk. A qPCR reakcióban használt primerek szekvenciái és a UPL-próbák a 2. táblázatban láthatóak. A méréseket triplikátumban végeztük LC-480 qPCR készülékkel (Roche). A fehérvérsejt depletált vérlemezkekben a CD45 mRNS nem volt detektálható (a cycle threshold értékek 35 felettiéek voltak). Az áramlási citometriai és RT-qPCR mérések eredményei alapján a mágneses szeparálással fehérvérsejt mentes

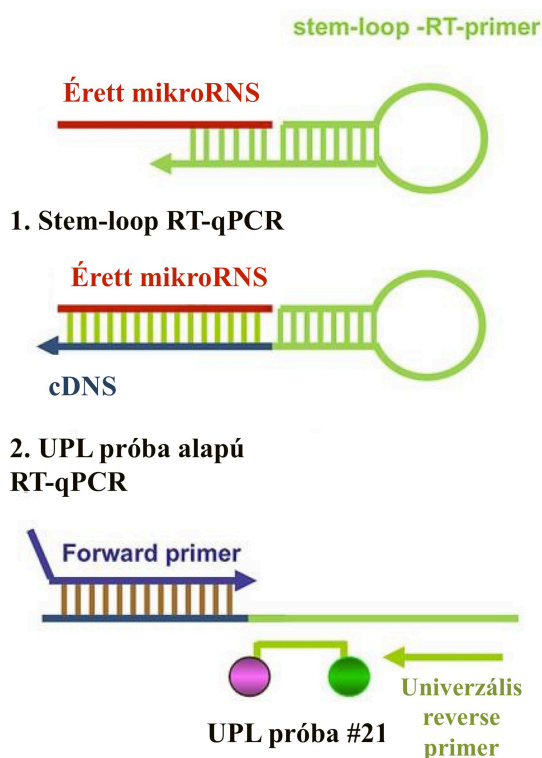
vérlemezkéket sikerült kinyernünk, amelyek így alkalmasak voltak a miRNS és mRNS expressziók meghatározásához.

mRNS	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	UPL-próba
PTPRC (CD45)	GGCTGAATTCCAGAGACTTCC	TTCTTGATTTCCAATGTGCTGT	#78
ITGA2B (CD41)	AGCCTCAATGTGTCCCTACC	AGTCCAGGACGATTCGTGTC	#75

2. táblázat. A fehérvérsejt depletált vérlemezkék tisztaságának ellenőrzéséhez használt primerek szekvenciái és UPL-próbák típusai.

4.4.4 A miRNS expressziók meghatározása UPL-próba alapú RT-qPCR módszerrel

A miRNS expressziók meghatározását Czimmerer és munkatársai által kifejlesztett RT-qPCR módszerrel [127] végeztük. A reverz transzkripció során az egyes miRNS-eket specifikusan írtuk át (4. ábra). A cDNS készítéshez TaqMan MicroRNA reverz transzkripció kitet (Kat.szám: 4366597, Applied Biosystems), miRNS specifikus „stem-loop” primert (500 nM, Sigma) és 10 ng totál RNS-t használtunk.



4. ábra. A miRNS expressziók meghatározásához használt kétlépéses UPL próba alapú RT-qPCR reakció. A komplementer DNS szintézise miRNS specifikus „stem-loop” primerral történik, ami egyrészt meghosszabbítja az érett miRNS-t, másrészt egy azonos szekvenciájú szakasszal lehetővé teszi a kvantitatív PCR reakcióban egy univerzális reverse primer és a 21-es UPL próba kötődését. A második reakcióban miRNS specifikus forward primert használva határozható meg az egyes miRNS-ek expressziója. Rövidítések: cDNS: komplementer DNS, RT-primer: reverse transcription primer, RT-qPCR: real-time quantitative PCR, UPL-próba: Universal ProbeLibrary próba. (Az ábra Czimmerer Z és munkatársainak 2013-as közleménye [127] alapján, annak szerkesztésével készült).

A kvantitatív PCR reakcióban miRNS specifikus forward primert (100 µM, Sigma), univerzális reverse primert (100 µM, Sigma), UPL próbát (10 µM, Roche), Taq polimerázt (5 U/µL, kat.szám: EP0402, Thermo Scientific) és dNTP-eket (2,5 mM, kat.szám: R0181, 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 (Applied Biosystems) készülékkel triplikátumban végeztük és az eredmények normalizálására az RNU-43 referencia gént használtuk. A miRNA Primer Designed Tool (<http://genomics.dote.hu:8080/mirnadesigntool>) szoftverrel terveztük a reakcióban használt primereket [127], melyek szekvenciái a 3. táblázatban láthatók.

miRNS	A reverz transzkripcióban használt stem loop primer (5' – 3')	Forward primer (5' – 3')	Univerzális reverse primer (5' – 3')
miR-223-3p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC TGGGGT	GTTGGGTGTCAGTTTGTC AAAT	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-126-3p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC CGCATT	GGGTCGTACCGTGAGTAAT	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-26b-5p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC ACCTAT	GTTGGGTCAAGTAATT CAGG	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-140-5p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC CTACCA	GGGCAGTGTTTTACCCTA	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-107	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC TGATAG	GTAGCAGCATTGTACAGGG	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-424-5p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC TTCAAA	GGGCAGCAGCAATTCATGT	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-24-3p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC CTGTTC	GTTGGCTCAGTTCAGCAG	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-146a-5p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC AACCCA	GTTGGTGAGAACTGAAT TCCA	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-155-5p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC ACCCCT	GTGGGTTAATGCTAATCG TGAT	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-181b-5p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC ACCCAC	GTTGAACATTCATTGCT GTCG	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-34a-5p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC ACAACC	GTGTGGCAGTGTCTTAGCT	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-185-5p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC TCAGGA	GTGTGGAGAGAAAGGCAGT	GTGCAGGGTCCGAGGT
RNU-43	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC AATCAG	GTGAACTTATTGACGGGCG	GTGCAGGGTCCGAGGT

3. táblázat. A miRNS mérésekhez használt primerek szekvenciái. A reverz transzkripcióban használt „stem-loop” primerek szekvenciáiban piros színnel emeltük ki a miRNS-re specifikus szakaszt.

4.4.5 Az mRNA, a prekursor miRNA és az enhancer RNA szintek meghatározása

A cDNS szintézishez High Capacity cDNA RT kitet (Applied Biosystems) használtuk a gyártói utasításoknak megfelelően. A vérlemezkék és az endothelsejtek esetén 500 ng, a megakaryocytáknál 1000 ng totál RNS-ből indultunk ki. Az RNS-ek mennyiségét SYBR Green I Master mix (Kat.szám: 04887352001, Roche) és az RNS-ekre specifikus primer párok (10 μ M, Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium) felhasználásával határoztuk meg LC-480 qPCR készülékkel (Roche). Normalizáláshoz az RPLP0 (36B4) referencia gént használtuk. A primer szekvenciák a 4. táblázatban kerültek összefoglalásra.

mRNS, pre- és pri-miRNS, eRNS	Forward primer (5' – 3')	Reverse primer (5' – 3')
SELP	CCATTGTCTAGAGGGCCAGT	GGGCTTCCTGGATAGTCAATG
P2RY12	TTTGCCTAACATGATTCTGACC	GGAAAGAGCATTCTTCACATTCT
SELE	ACCAGCCCAGGTTGAATG	GGTTGGACAAGGCTGTGC
VCAM1	TGGACATAAGAACTGGAAAAGG	GATTTCTGGATCTCTAGGGAATGA
VWF	GAAATGTGTCAGGAGCGATG	ATCCAGGAGCTGTCCCTCA
IL1B	AGCCAGGACAGTCAGCTCTC	AGAGGCCTGGCTCAACAA
IL6	GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA	CTGCAGCCACTGGTTCTGT
pre-miR-223-3p	CGCTCCGTGTATTTGACAAG	CGCACTTGGGGTATTTGACA
pre-miR-26b-5p	CGGGACCCAGTTCAAGTAAT	CCGAGCCAAGTAATGGAGAA
pre-miR-155-5p	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT	ATATGTAGGAGTCAGTTGGAGGC
pre-miR-181b-5p	ACATTCATTGCTGTCGGTGG	GGGCCACAGTTGCATTCATT
pri-miR-155-5p	CACTCCAGCTTTATAACCGCA	ACAGATTTCCCCTTCTGGT
pri-miR-181b-5p	TCCCCTTTGACCAGAACATC	AAAGTAGGACCTCAGCACCC
SELE_ -11Kb	ATCTCGGCTCACTGCAATCT	GGTGTAATGGCACACACCTG
VCAM1_ -10Kb	CTGCTCTTCTCCAAAGCTCA	CAGGCAATTTGCAGTGGTAA
RPLP0 (36B4)	ATGCAGCAGATCCGCATGT	TCATGGTGTCTTGCCCATCA

4. táblázat. A mRNA, prekursor miRNA, és eRNA expressziók méréséhez használt primerek szekvenciái.

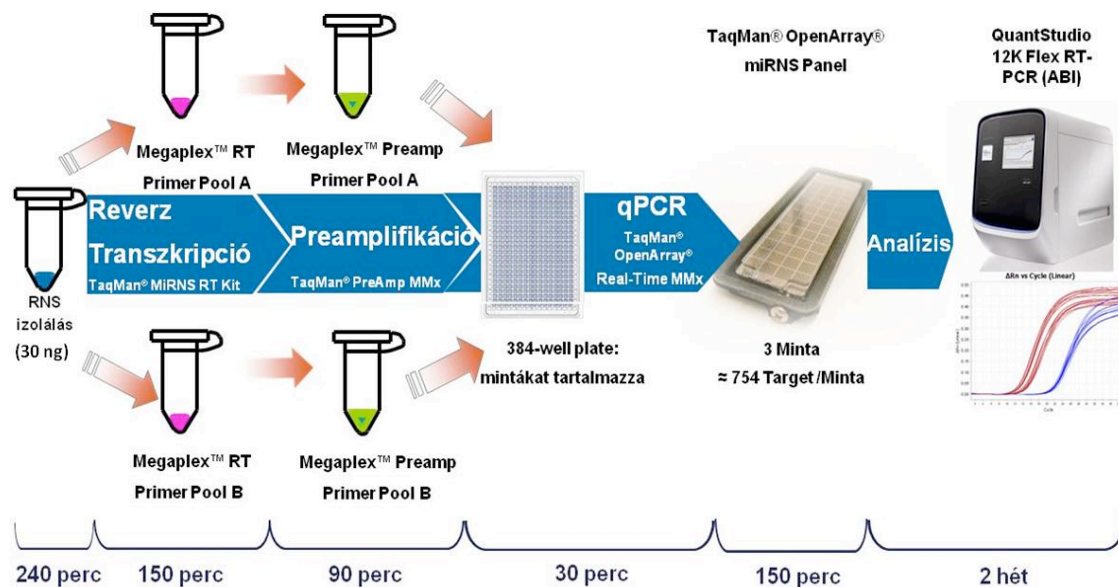
4.4.6 Az enhancer RNS-ek azonosítása

A HUVEC és a HCAEC sejtek aktivációja során megváltozott mRNA expressziók értékelésekor felmerült, hogy az E-selectin (SELE) és a VCAM-1 (VCAM1) gének szabályozása transcriptiós szinten is történhet, és az everolimus az eRNS-ek expresszióján keresztül is mérsékelheti a TNF- α indukálta gyulladási folyamatokat. Az eRNS-ek aktivitását a SELE és VCAM1 gének közelében az NCBI GEO adatbázisban elérhető (GEO csatlakozási szám: GSE53998) Chip-seq adatok újraelemzésével azonosítottuk és ezekből készítettünk reprezentatív „snapshot” képeket Integrative Genomics Viewer (IGV2.3, Broad Institute) program segítségével [123]. A HUVEC sejtek kezelési körülményei és a Chip-szekvenálás menete Brown és munkatársai közleményében [122] olvasható részletesen. Itt a TNF- α citokinnel (100 ng/mL) 1 órán át stimulált és nem kezelt sejtek Chip-seq adatait analizáltuk a SELE és a VCAM1 génekre fókuszálva. Az RNS polimeráz II, p65 transzkripciós faktor, H3K27Ac és H3K4m3 markereket vizsgáltuk, melyek segítségével mindkét gén közelében sikerült eRNS aktivitást azonosítani. A Chip-seq adatok bioinformatikai analízisét és az eRNS-ekre specifikus primerek tervezését Dr. Czimmerer Zsolt és Horváth Attila (Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biokémiai Intézet) végezték. A HCAEC sejteket 1 órán keresztül stimuláltuk TNF- α -val (100 ng/mL) everolimus (0,5 μ M) jelenlétében és hiányában. RT-qPCR módszerrel egy-egy kiválasztott eRNS expresszióját határoztuk meg, mely a SELE esetén a gén előtt 11 Kb (SELE_-11Kb), amíg a VCAM1 esetén 10 Kb (VCAM1_-10Kb) távolságra helyezkedtek el (4. táblázat).

4.4.7 Az extracelluláris miRNS expressziók analízise plazma mintákban

A BMS és DES sztent implantációt követő 1. hónapos plazma mintákból totál RNS-t izoláltunk, és vizsgáltuk a keringő miRNS-ek mennyiségét figyelembe véve a BMS kezelést kapott betegek 20%-ban kialakult korai ISR kialakulását. A betegeket 4 csoportra osztottuk: i) a teljes DES csoport, akik esetében nem alakult ki szövődmény (DES), ii) a teljes BMS csoport (BMS), iii) a komplikáció mentes BMS személyek (BMS ISR nélkül), és iv) azok a BMS betegek, akiknél kialakult a komplikáció (ISR).

Az extracelluláris miRNS profil meghatározásához random módon 3-3 RNS mintát választottunk ki csoportonként és TaqMan Open Array (Kat.szám: 4470187, Applied Biosystems) módszerrel 754-féle miRNS-t analizáltunk (5. ábra).



5. ábra. A TaqMan Open Array módszer. A 754-féle miRNS analíziséhez TaqMan Open Array módszert használtunk, amely többlépéses reakciókból áll. Az RNS izolálást követően cDNS-t kell szintetizálni speciális primer pool-okat használva. Ezt követően egy 10-14 ciklusból álló preamplifikációs lépésben a templátokat felsokszorozzuk. A mintákat 384-well plate-be pipettázzuk és hozzámérjük a használatra kész master mix-et. A miRNS-ekre specifikus assay-ket tartalmazó Open Array lemezre egy robotkar segítségével kerülnek fel a minták, majd elindítjuk a kvantitatív PCR reakciót. Az eredmények analízisét különböző programok segítségével végezhetjük (pl. Thermo Fisher Cloud System).

A többlépéses analízis során az RNS mintákból reverz transzkripcióval (TaqMan microRNA RT kit, Applied Biosystems) cDNS-t készítettünk Megaplex primer pool A és B (Set v3.0, kat.szám: 4444750, Applied Biosystems) felhasználásával. Ezt egy preamplifikációs reakció követett, amiben TaqMan PreAmp master mixet (Kat.szám: 4384267, Applied Biosystems) és Megaplex PreAmp primereket (Set v3.0, Applied Biosystems) használtunk. A mintákat egy speciális 384-lyukú plate-be pipettáztuk, amit a qPCR reakcióhoz szükséges TaqMan Open Array Real-Time PCR Master mixel (Kat.szám: 4462153, Applied Biosystems) egészítettünk ki. A QuantStudio 12 K Flex qPCR készülék Array mérésekre adaptált modulja vitte fel a mintákat a 754 különböző miRNS-re specifikus primereket és fluoreszcens próbákat tartalmazó TaqMan Open Array panelra (Applied Biosystems) és a reakciót a gyári beállításoknak megfelelően futtattuk le. Az eredmények analízisét a Thermo Fisher Cloud System és az Expression Suite Software v1.0.3 programokkal végeztük. Végül a legnagyobb változást mutató miRNS-ek expresszióját UPL próba alapú RT-qPCR módszerrel validáltuk az *ex vivo* mintákban. Az Open Array esetén globál normalizációt végeztünk, az egyes miRNS-ek validálásakor az egyik legstabilabb expressziót mutató miR-24-et választottuk ki az eredmények normalizálásához. Az Open Array méréseket Dr. Póliska Szilárd (Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) vezetésével végeztük.

Irodalmi adatok alapján a miR-181b szabályozhatja a SELE és VCAM1 mRNS-ek expresszióját [120], ezért vizsgálatainkban ennek a miRNS-nek az analízisét is elvégeztük, mert az Open Array lemezen található assay-k között ez a miRNS nem szerepelt. Az érett miRNS-ek szekvenciái az 3. táblázatban láthatók.

4.4.8 A miRNS mimic és inhibitor transzfekciója megakaryocita és endothelsejtekbe

A miR-26b, miR-140 és a SELP mRNS közötti direkt kapcsolatot miRNS mimic-ek és inhibitor-ok használatával igazoltuk MEG-01 sejtekben. A mimic-ek transzfekciójával mesterségesen fokozható a miRNS szintek, amely a cél mRNS szintek csökkenését eredményezheti. Ezzel ellentétben, a miRNS-ek funkciójának specifikus inhibitorral történő gátlásával a cél mRNS-ek expressziója megemelkedhet.

A MK sejteket magas glükóz tartalmú médiumban 24 órán keresztül előkezeltük, majd a transzfekcióhoz szükséges optimális körülmények megteremtéséhez a sejteket reszuszpendáltuk 3% FBS-t (Sigma), 100 U/mL Penicillin és 100 μ g/mL Streptomycin antibiotikumot (Sigma) tartalmazó OPTI-MEM médiumban (Kat.szám: 31985062, Gibco). A miRVana miR-26b és miR-140 mimic-eket (20 pmol, Ambion, Austin, TX, USA) Lipofectamine RNAiMAX transzfekciós reagens (Kat.szám: 13778, Invitrogen) segítségével juttattuk be a sejtekbe és alkalmaztuk 24 óráig. Ezzel párhuzamosan negatív kontrollként a sejteket NEG-01 mimic-el (20 pmol, Ambion) transzfektáltuk azonos körülmények között. Az anti-miR-26b és az anti-miR-140 inhibitorokat (40 pmol, Ambion) glükózzal nem kezelt sejtekbe transzfektáltuk (24 óra) Lipofectamine reagenssel. Az eredményeket ebben az esetben is negatív kontrollal (NEG-01, 40 pmol, Ambion) kezelt sejtekhez hasonlítottuk. A kezelési idők lejárta után RNS-t izoláltunk és a fentebb ismertetett módon mértük a miRNS és mRNS szinteket.

A HCAEC sejtekben a miR-181b és SELE, valamint a VCAM1 mRNS-ek közötti szoros kapcsolatot miRNS mimic használatával erősítettük meg. A HCAEC sejteket 1 órán át TNF- α -val (100 ng/mL) kezeltük, majd 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, Ambion) transzfekcióját Lipofectamine reagenssel 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-el (NEG-01, 25 pmol, Ambion) transzfektált mintákhoz hasonlítottuk.

4.4.9 A miRNS expressziók Dicer függőségének vizsgálata calpain inhibitorral MEG-01 sejtekben

Megvizsgáltuk a megváltozott miRNS expressziók hátterében a calpainok által szabályozott, DM2-ben megváltozott aktivitású Dicer enzimet, mely eltérést korábbi vizsgálatok felvetettek [88]. A Dicer funkciót indirekt módon, calpain inhibitorral használva vizsgáltuk hyperglycaemiás és glükózzal nem kezelt kontroll MK sejtekben. A MEG-01 sejtekhez calpeptint (10 $\mu\text{mol/L}$, kat.szám: C8999, Sigma) adtunk: i) a glükóz kezelés előtt, ii) egyszerre a glükózzal és iii) a glükóz kezelés után 24 órán keresztül, majd RT-qPCR módszerrel vizsgáltuk a miR-223 és miR-26b expresszióját RT-qPCR-rel.

4.4.10 Szolubilis fehérjék koncentrációjának meghatározása ELISA módszerrel

Minden meghatározáshoz ELISA kitet (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) használtunk a gyártói ajánlásoknak megfelelően. Mérés előtt a mintákat lecentrifugáltuk (10 000 g, 1 perc, szobahő), hogy sejtmentes plazmát vagy felülúszót kapjunk.

A P-selectin fehérje mennyiségét DM2 betegek és egészséges kontrollok vérlemezke lizátumaiban és plazma mintáiban is meghatároztuk. Az intracelluláris P-selectin analíziséhez a vérlemezkéket (1,25 x 10⁸ db sejt/minta) 1%-os TritonX-100 (Reanal Laborvegyszer Kft, Budapest, Magyarország) és proteáz gátló (Kat.szám: 11697498001, Roche) tartalmú lízis pufferrel lizáltuk és a plazma mintákkal egy időben a fehérje koncentrációkat lemértük.

A sztentelt betegek plazma mintáiban a thrombocytá aktivációt szolubilis P-selectin (Kat.szám: BBE6), CD40L (Kat.szám: DCDL40) és PDGF-BB (platelet-derived growth factor-BB, kat.szám: DBB00) koncentrációk mérésével, az endothelsejtek aktiválódását szolubilis VCAM-1 (Kat.szám: DVC00), ICAM-1 (Kat.szám: DCD540), és E-selectin (Kat.szám: DSLE00) plazma koncentrációjának analízisével értékeltük. Az ISR kialakulása alatt bekövetkező vaszkuláris gyulladási folyamatok súlyosságát az 1. hónapos *ex vivo* plazma minták TNF- α (Kat.szám: DTA00C) koncentráció mérésével is nyomon követtük.

A HCAEC sejtek TNF- α -val és everolimusszal történt kezelését követően a sejt kultúrák felülúszójában két endothelsejt aktivációs markert, az E-selectin és a VCAM-1 koncentrációját határoztuk meg.

4.4.11 Az NF- κ B útvonal aktiválódásának vizsgálata endothelsejtekben

A TNF- α kezelés hatására kialakuló gyulladásos reakció az NF- κ B útvonal aktivációjához vezetett, amit a p65 alegység magtranszlokációján keresztül monitoroztunk fluoreszcens mikroszkóppal [128]. A letapadó HCAEC sejteket 12-lyukú plate-ben (Sigma) elhelyezett steril mikroszkóp lemezeken 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, szobahő). Az NF- κ B p65 alegység elsődleges jelöléséhez nyúlban termeltetett anti-humán p65 antitestet (100 μ g/mL, Santa Cruz Biotechnology, AB_632037) használtunk, míg a másodlagos antitest Alexa Fluor 488-al konjugált kecske anti-nyúl IgG (Invitrogen) volt, a sejtmagokat Hoechst 33342 (Invitrogen) festékkel jelöltük. A mintákat Zeiss Axio Scope. A1 fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Germany) vizsgáltuk, a képek analízisét és az NF- κ B p65 sejtmag/cytoplazma festődés intenzitásának arányának meghatározását ZEN 2012 szoftverrel (v.1.1.0.0, Carl Zeiss Microscopy) végeztük. A NF- κ B p65 jelölés kivitelezésében és az eredmények kiértékelésében Dr. Váradi Judit és Dr. Fenyvesi Ferenc (Debreceni Egyetem, Gyógyszertechnológiai Tanszék) nyújtottak segítséget.

4.5 Statisztikai értékelés

Az adatok normál eloszlásának vizsgálatához Kolmogorov-Smirnov tesztet használtunk. Normál eloszlás esetén két csoport eredményeit t-próbával, míg nem normál eloszlás esetén Mann-Whitney U-teszttel hasonlítottuk össze. Több csoport statisztikai analízisét ANOVA vagy Kruskal-Wallis alapú „*post-hoc*” tesztekkel végeztük. A beteg és kontroll csoportok közötti egyes paraméterek összehasonlítására Chi-négyzet próbát alkalmaztunk. A keringő miRNS-ek és a szolubilis markerek közötti összefüggést Pearson korrelációval vizsgáltuk. Statisztikailag szignifikánsnak vettük azt az eltérést, ha a P érték kisebb volt, mint 0,05 ($P < 0,05$). A statisztikai számításokhoz GraphPad Prism (version 4.0 és 6.01, San Diego, CA, USA) és SPSS (version 19.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA) szoftvereket használtunk.

5. Eredmények

5.1 A thrombocyta-eredetű miRNS-ek vizsgálata DM2-ben

5.1.1 A vizsgálati csoportok demográfiai és laboratóriumi jellemzői

A DM2 betegek és a két kontroll csoport (obezek és egészséges személyek) a demográfiai paraméterek alapján összehasonlíthatók voltak, a nemek arányában és az átlagéletkorban nem voltak eltérések (5. táblázat). A DM2 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 kontroll csoportba súlyosan elhízott (BMI: $35,8 [31,6-37,3] \text{ kg/m}^2$), de nem diabeteses személyeket vontunk be, amit alátámasztott, hogy a szérum glükóz ($5,3 \pm 0,7 \text{ mmol/L}$) és a HgbA1c ($5,5 [5,3-5,7] \%$) koncentrációk a referens tartományon belül voltak. A DM2 betegeket a plazma atherogén ($\text{PAI} = \log(\text{triglicerid}/\text{HDL-koleszterin})$) és az inzulin rezisztenciára utaló (HOMA-IR: $\text{glükóz (mmol/L)} \times \text{inzulin } (\mu\text{IU/mL})/22,5$) indexekkel is jellemeztük, mely paraméterek nagymértékű emelkedést ($P < 0,05$) mutattak DM2-ben mindkét kontroll csoporthoz képest (5. táblázat).

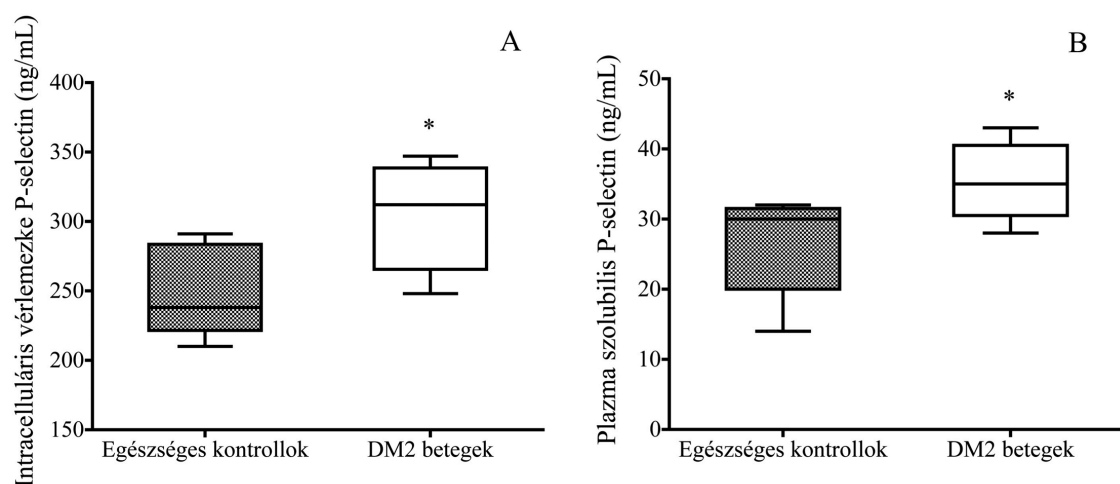
A felszíni P-selectin pozitivitás alapján fokozott vérlemezke aktivációt figyeltünk meg DM2-ben ($7,2 \pm 5,1 \%$, $P < 0,001$), ami már obezitasban is megmutatkozott ($3,5 \pm 1,5 \%$, $P = 0,003$) az egészséges kontrollokhoz ($1,8 \pm 0,9 \%$) képest, mely megerősíti kutatócsoportunk korábbi eredményeit [73, 78]. A statin kezelés mellett a betegek enyhe trigliceridszint emelkedést, és normál egyéb lipid paramétereket mutattak (5. táblázat), így a thrombocyta aktivációt és a miRNS szinteket befolyásoló hyperkoleszterinaemia hatását kizárhattuk [77].

Az intracelluláris P-selectin mellett szolubilis formában, plazma mintákban is meghatároztuk a fehérje koncentrációját, mert elsősorban a vérlemezke aktiváció során a sejtfelületre kikerült P-selectin ún. „shedding” mechanizmussal lehasítható. Ezáltal a felszíni mellett a szolubilis P-selectin is a vérlemezke aktiváció egyik fontos markere [73]. Az egészséges kontrollokhoz hasonlóan, a DM2 betegek vérlemezke mintáiban szignifikánsan magasabb volt a fehérje koncentrációja (250 ± 33 vs. $304 \pm 39 \text{ ng/mL}$, $P = 0,045$) egészséges thrombocytaszám mellett (6. ábra A). A plazma mintákban is

jelentősen emelkedett szolubilis P-selectin szinteket tapasztaltunk ($26,6 \pm 7,4$ vs. $35,4 \pm 5,6$ ng/mL, $P=0,050$) (6. ábra B).

Paraméterek	DM2 betegek (n=28)	Obez egyének (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)	nem mértük
Éhomi inzulin (μIU/mL)	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)	nem mértük	nem mértük
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

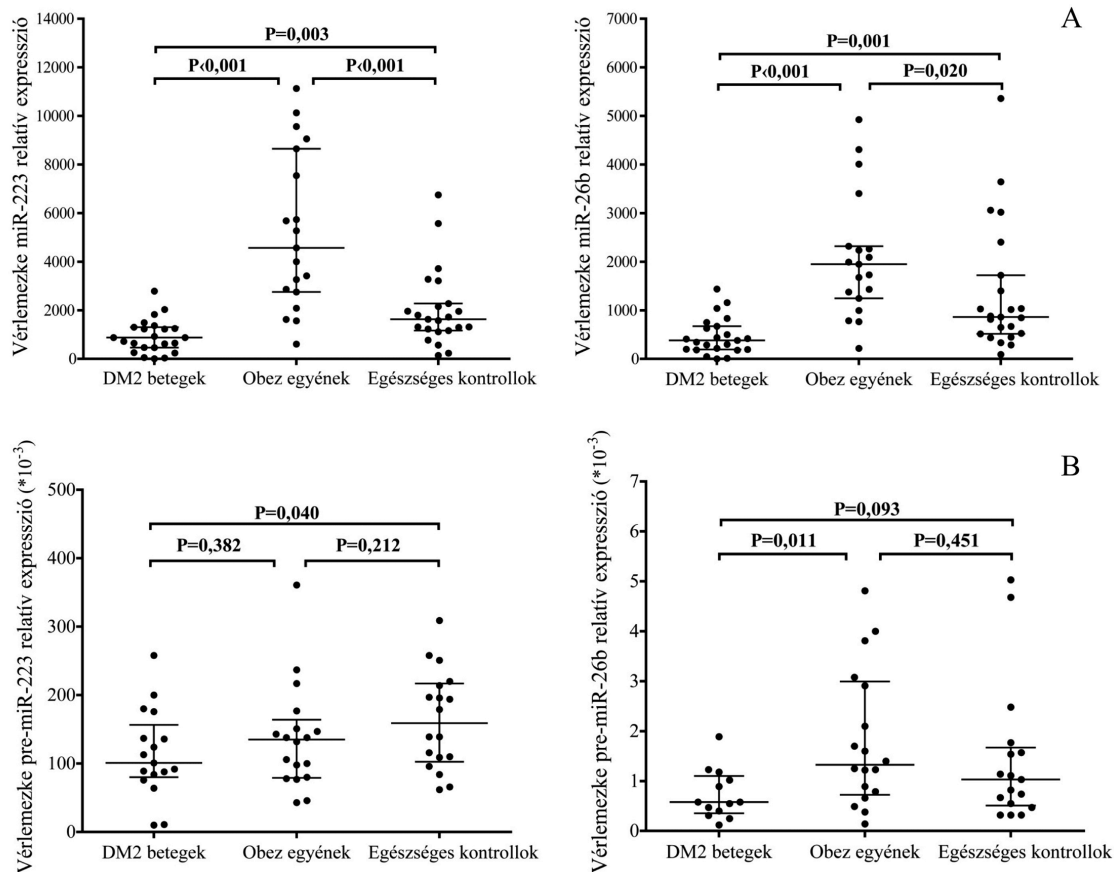
5. táblázat. A vizsgálati csoportok demográfiai és laboratóriumi paramétereit. Az eredményeket átlag±SD vagy medián (interquartilis range) formájában tüntettük fel. Rövidítések: DM: diabetes mellitus, BMI: body mass index, HgbA1c: haemoglobin A1c HDL: high-density lipoprotein, LDL: low-density lipoprotein, CRP: C-reaktív protein, PAI: plazma atherogén index, HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance. $P<0,05$: ^a DM2 betegek vs. egészséges kontrollok, ^b: DM2 betegek vs. obez egyének, ^c: obez egyének vs. egészséges kontrollok.



6. ábra. A P-selectin fehérje intracelluláris (A) és plazma szolubilis (B) koncentrációja. A vérlemezkék P-selectin fehérje tartalma szignifikánsan magasabb volt 2-es típusú diabetes mellitusban (DM2) az egészséges kontrollokhoz képest (szürke színnel jelölve) (A), valamint a szolubilis P-selectin plazma szintje is jelentősen emelkedett a betegek mintáiban (B). Az ábrán a medián mellett a minimum és maximum értékeket jelöltük, n=5/csoport. *P<0,05.

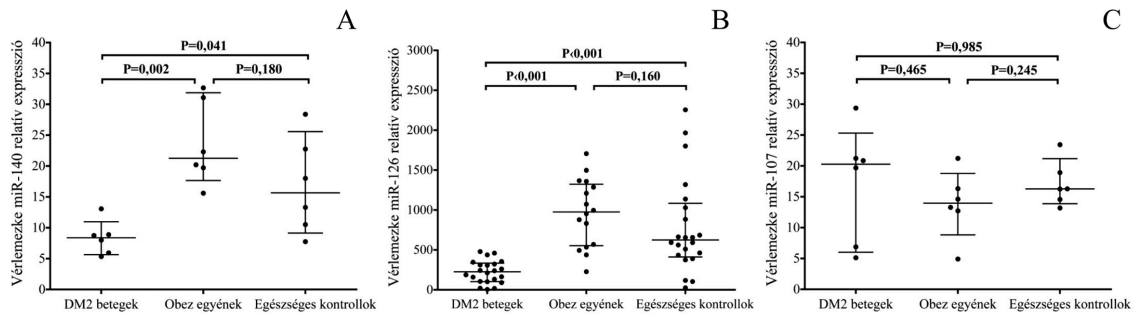
5.1.2 A vérlemezkék miRNS expressziójának változása DM2-ben

Egyik fő célunk az volt, hogy megvizsgáljuk DM2 betegekben a fokozott vérlemezke aktivációhoz köthető miRNS-ek expresszióját. Különböző adatbázisok és korábbi közlemények alapján a legnagyobb mennyiségben megtalálható miRNS-ek [83, 85] közül a miR-223 a P2Y12 ADP-receptor [80], a miR-26b és miR-140 a P-selectin (SELP) expresszióját befolyásolhatja, valamint a miR-126 is hatással lehet a vérlemezke aktivációra [95]. DM2-ben azt találtuk, hogy az érett 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 az egészséges kontroll csoporthoz képest (7. ábra A és 8. ábra A, B). Ez az eltérés nagyobb mértékű volt (P<0,001) a vizsgált miRNS-ek esetében a BMI-azonos, nem diabeteses obesez egyénekhez viszonyítva. Kíváncsiak voltunk, hogy vajon minden miRNS szintjére hatással van-e a hyperglycaemia, ezért kiválasztottunk egy olyan indifferens miRNS-t, a miR-107-et, aminek a funkciója az ún. CLOCK fehérje szabályozása, ami a sejtek cirkadián ritmusában játszik szerepet [84]. Nem találtunk szignifikáns különbséget a miR-107 expresszióban (8. ábra C), ami arra utalhat, hogy nem minden miRNS működésére van egyforma hatással a magas glükóz koncentráció.



7. ábra. A vérlemezkek csökkent miRNS és pre-miRNS expressziója 2-es típusú diabetes melliusban (DM2). Mind az érett miR-223 és miR-26b (A), mind ezek előalakjának (B) csökkent szintjét találtuk DM2-ben szemben az obez és a normál kontrollokkal. A pontok egy-egy beteget/kontroll személyt reprezentálnak. Az eredmények medián érték és kvartilisek formájában kerültek feltüntetésre.

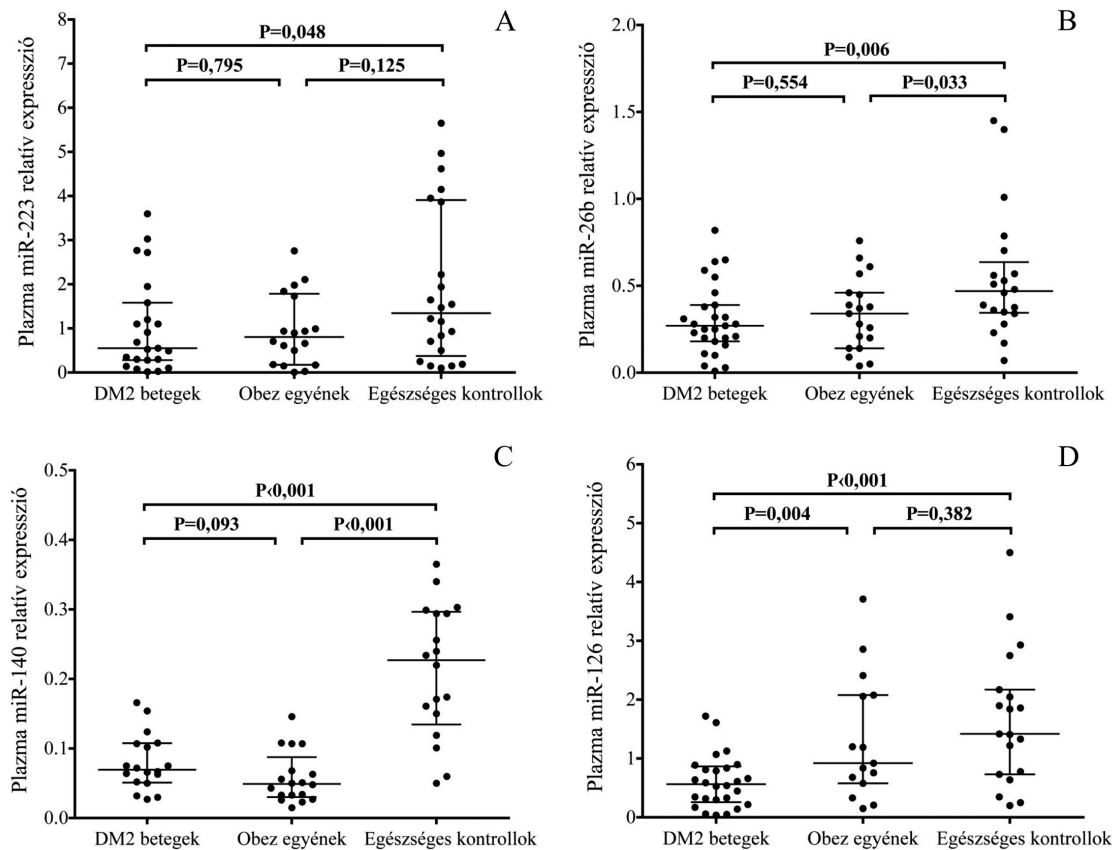
Ezután megvizsgáltuk, hogy milyen abnormalis folyamatok állhatnak a csökkent thrombocytá miRNS szintek háttérében diabetesben. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy az érett miRNS előalakjából, a pre-miRNS-ből is kevesebb expresszálódik a thrombocytákban. Ezért RT-qPCR módszerrel vizsgáltuk a vérlemezkek pre-miRNS tartalmát, és azt találtuk, hogy a pre-miR-223 ($P=0,040$) és a pre-miR-26b ($P=0,093$) mennyisége is kevesebb volt DM2-ben a kontroll mintákhoz képest (7. ábra B). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy nem kizárólag a megváltozott Dicer működése miatt csökkenhet az érett miRNS-ek mennyisége [88], hanem már a pre-miRNS-ek mennyisége is kevesebb a diabeteses thrombocytákban.



8. ábra. Diabetes mellitusban (DM2) a vérlemezke miR-140 és miR-126 expressziója csökkent, míg a miR-107 szintje nem változott. Összehasonlítottuk diabetesben 3 thrombocyta miRNS expresszióját obez és normál kontroll személyek mintáival szemben, és a miR-140 (A) és miR-126 (B) szintje jelentősen alacsonyabb volt, ugyanakkor a miR-107 jelentős változást nem mutatott a kontroll kohorszokhoz képest a random módon kiválasztott betegeken (C). A pontok egy-egy beteget/kontroll személyt reprezentálnak. Az eredmények medián érték és kvartilisek formában kerültek feltüntetésre.

5.1.3 A keringő miRNS-ek analízise az ex vivo plazma mintákban

Mivel az extracelluláris miRNS-ek többsége a vérlemezkékből származik [129], ezért megvizsgáltuk, hogy hogyan változik ezen miRNS-ek szintje a plazma mintákban. 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 (9. ábra A-D) az egészséges kontrollokhoz képest, míg a miR-107 nem mutatott változást (nem készült ábra).



9. ábra. A keringő miRNS-ek expressziójának változása 2-es típusú diabetes mellitusban (DM2). 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. A pontok egy-egy beteget/kontroll személyt reprezentálnak. Az eredmények medián érték és kvartilisek formájában kerültek feltüntetésre.

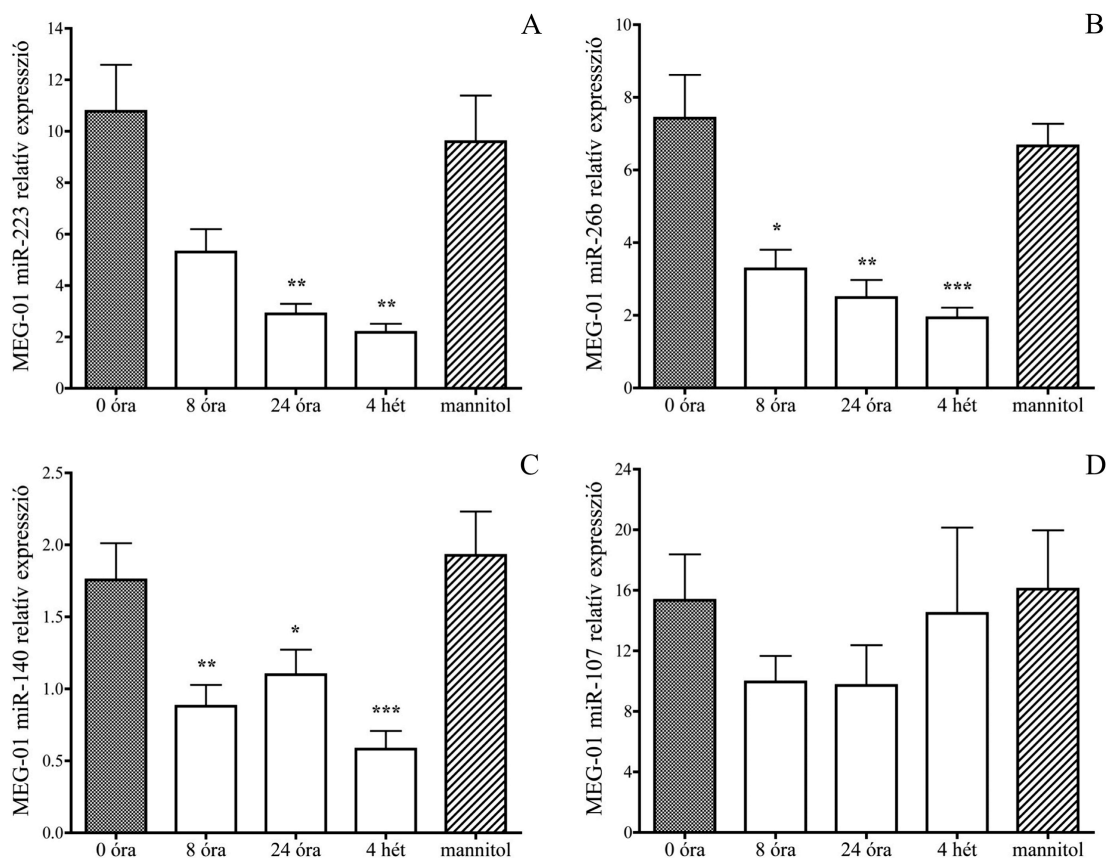
5.1.4 A hyperglycaemia miRNS szintekre kifejtett hatásának vizsgálata MK sejtekben

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy DM2-ben az érett miRNS-ek mellett a thrombocyták pre-miRNS tartalma is csökkent (7. ábra), ami arra utalhat, hogy már a MK sejtekből kevesebb kerülhet a csontvelőben lefűződő vérlemezkékbe. Ennek érdekében *in vitro* diabeteses körülmények között (vagyis magas glükóz koncentráció fenntartása mellett) kétféle MK sejt vonal (MEG-01, K562-MK) érett miRNS expresszióját vizsgáltuk rövid (8-24 óra) és hosszútávú (1-4 hét) kezelést követően.

5.1.4.1 A MEG-01 sejtekkel végzett in vitro kísérletek eredményei

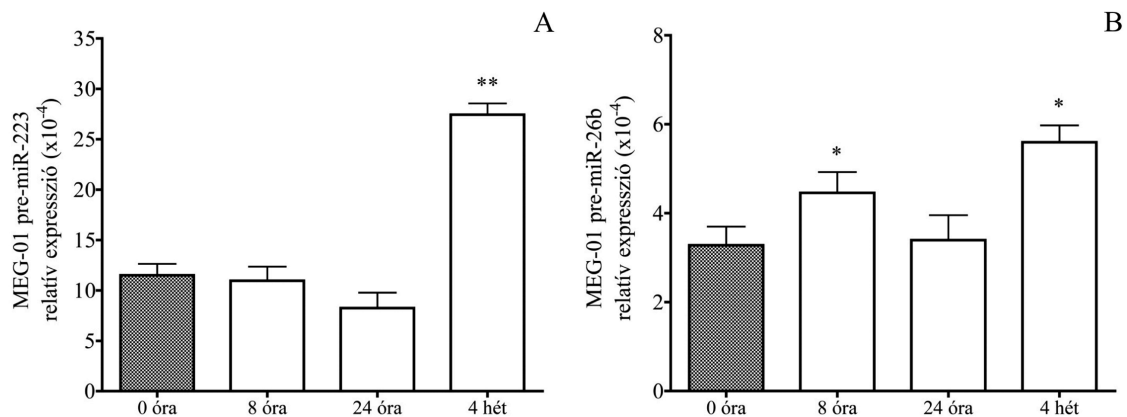
A hyperglycaemia hatására egy csökkenő tendenciát láttunk a miRNS expressziókban (10. ábra A-C), ami 24 óra elteltével már szignifikáns volt (miR-223 és miR-26b esetén $P < 0,010$; miR-140 esetén $P < 0,05$), és a 4 hetes kezelés végére ez a csökkenés még markánsabbá ($P < 0,001$) vált. A mannitol kezelés nem befolyásolta a

miRNS expressziókat, és a miR-107 mennyisége sem változott jelentősen a kezelés hatására (10. ábra D).



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

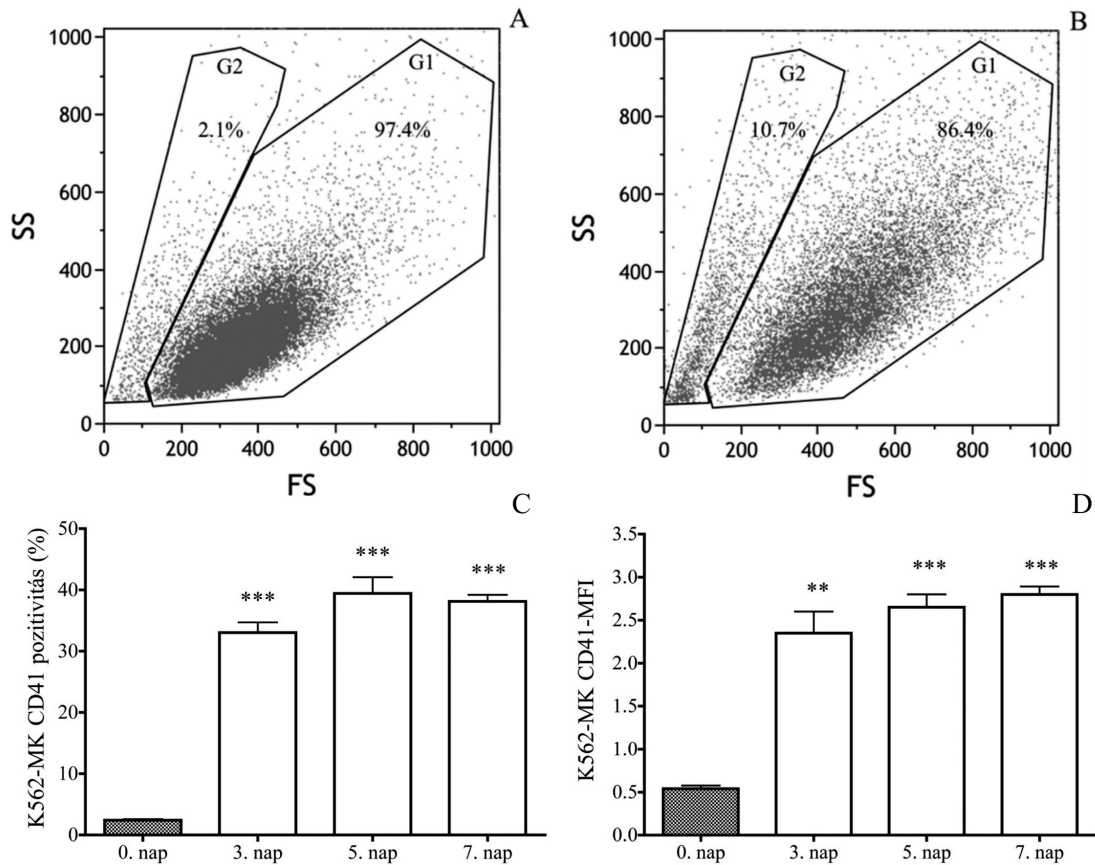
Az érett miRNS expressziók mellett az MK sejtek pre-miRNS tartalmát is vizsgáltuk RT-qPCR módszerrel. Az érett miRNS szintekkel ellentétben, a pre-miR-223 és pre-miR-26b expressziója nem csökkent a hyperglycaemia hatására 24 óra elteltével sem, sőt a 4 hetes kezelés végére jelentős emelkedést (P<0,05) mutattak (11. ábra A, B). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az érett miRNS szintek csökkenéséért a MEG-01 MK sejtekben döntően a megváltozott Dicer aktivitás lehet a felelős.



11. ábra. A prekurzor-miRNS (pre-miRNS) szintek hyperglycaemiás MEG-01 sejtekben. A különböző ideig tartó *in vitro* glükóz kezelés hatására a thrombocytákban tapasztalttól eltérő pre-miRNS szinteket mértünk, a miR-223 (A) és a miR-26b (B) szintje különösen 4 hét után jelentősen megnőtt a kiindulási (nem kezelt) mintához képest (szürke oszlop). Átlag és SEM értékeket ábrázoltunk, n=6-8/kísérlet. *P<0,05, **P<0,01.

5.1.4.2 A K562 sejtek differenciáltatása MK sejtekké és a miRNS expressziók vizsgálata glükóz kezelést követően

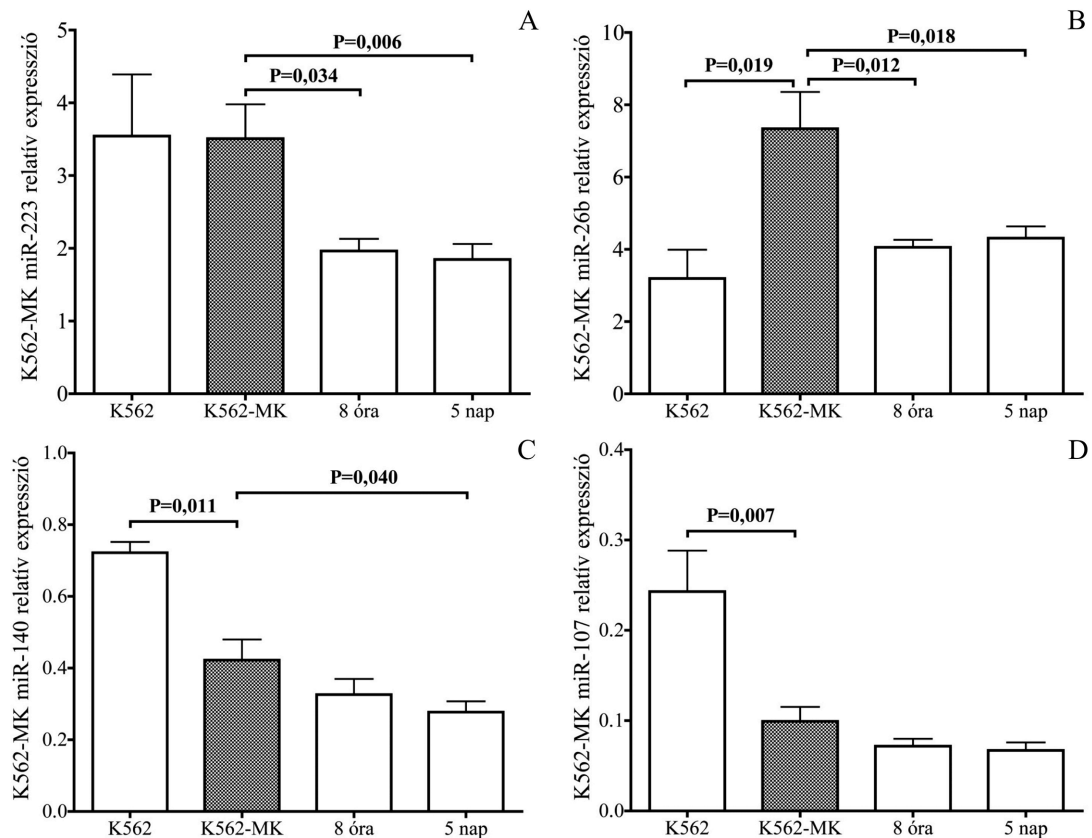
A diabeteses csontvelői körülményeket K562 sejtekből differenciáltatott MK sejtekben is modelleztük. Ehhez először a K562 sejteket 1 hét alatt érett megakaryocytákká differenciáltattuk PMA-val. Az érési folyamatot áramlási citometriai mérésekkel követtük. Ahogy a 12. ábrán is látható, az élő sejtek aránya ($85,9 \pm 1,7$ %) magas volt a megakaryopoiesis 7. napján (12. ábra A, B), és a sejtek mérete, valamint granuláltsága is megváltozott az előre (FS) és az oldalra szórt (SS) fénytulajdonságok alapján. A CD41 és CD61 pozitivitás a PMA kezelés hatására fokozatosan emelkedett a sejtek felszínén (12. ábra C, D), ami jól mutatta a MK irányú differenciálódást. A CD41 expressziója a kezdeti 1-2 %-ról közel 40%-ra emelkedett (MFI értékek: $0,54 \pm 0,02$ vs. $2,80 \pm 0,09$) (C, D), míg a CD61 a sejtek 80-90%-án jelent meg a kezelés végére (MFI értékek: $0,53 \pm 0,03$ vs. $5,60 \pm 0,30$) (nem készült róla ábra).



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

Ezután az érett MK sejteket magas glükóz tartalmú médiumban tenyésztettük különböző időtartamon keresztül (8 órától – 5 napig). Az apoptotizáló sejtek megjelenése miatt nem tudtuk a differenciálódott sejteket egy hétnél tovább kezelni, mint az immortalizált MEG-01 sejtek esetében. Az érett miRNS expressziókat UPL-próba alapú RT-qPCR módszerrel határoztuk meg, és az eredmények normalizálására ebben az esetben is az RNU43 referencia gént használtuk.

A MEG-01 sejteknél tapasztaltakhoz hasonlóan, a hyperglycaemia hatására a miRNS-ek expressziója a K562-MK sejtekben is szignifikánsan ($P<0,05$) csökkentek (13. ábra A-C). A mannitol kezelés nem befolyásolta a miRNS expressziókat, és a miR-107 mennyisége (13. ábra D) 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.

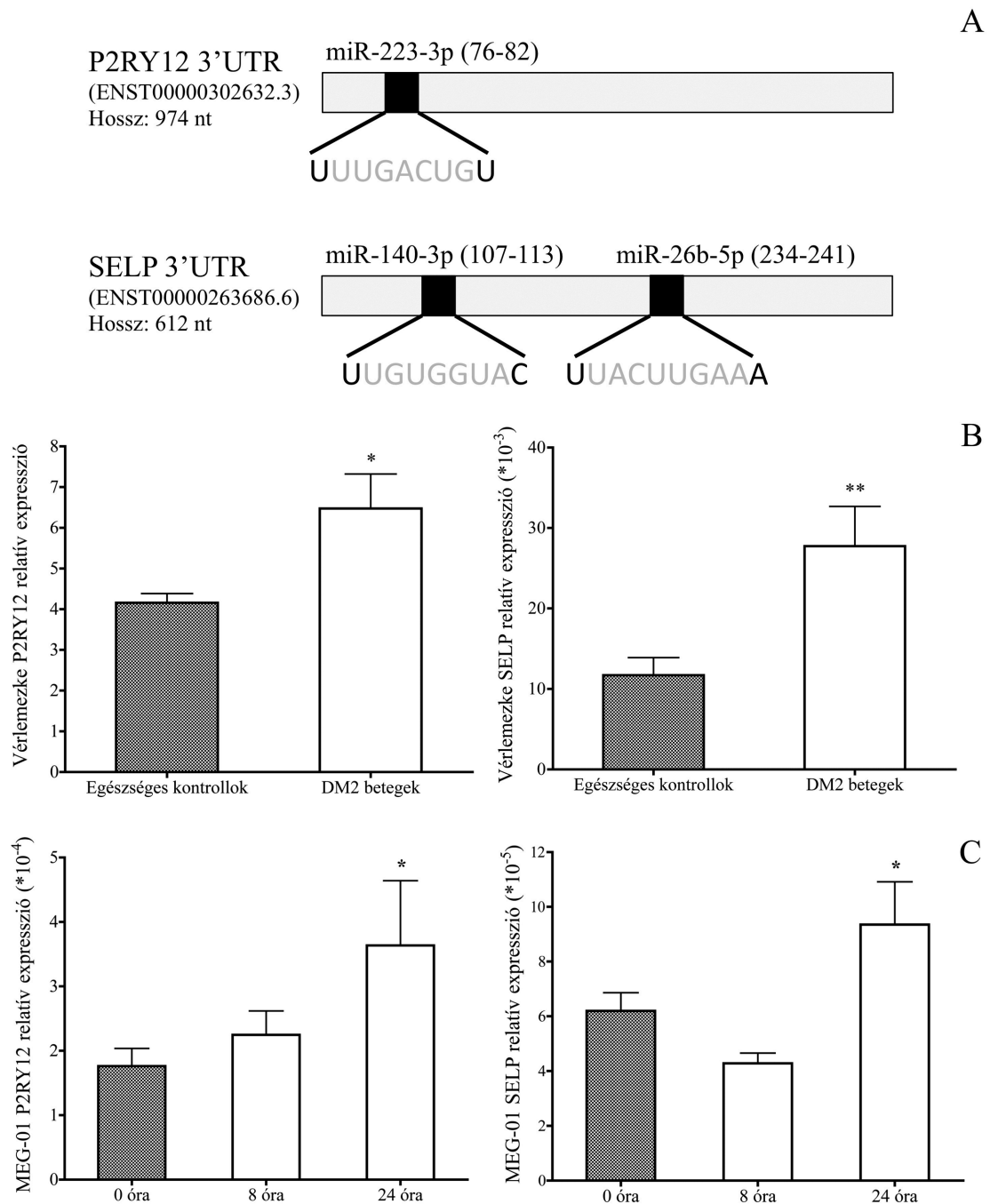


13. ábra. A miRNS szintek változása glükózzal kezelt érett K562-MK sejtekben. A K562 sejteket először érett megakaryocytákká (K562-MK) differenciáltattuk PMA-val (szürke oszlop), majd ezt követően kezeltük glükózzal 8 órától 5 napig. A miR-223 (A), a miR-26b (B), és a miR-140 (C) szintje jelentősen csökkent az érett MK sejtmintákhoz képest, míg a miR-107 (D) szintje érdemben nem változott. Átlag és SEM értékeket ábrázoltunk, n=4-8/ kísérlet.

5.1.5 A hyperglycaemia hatására lecsökkent miRNS expressziók emelkedett cél mRNS szintekkel járt együtt mind a vérlemezkékben, mind az MK sejtekben

A vérlemezkékben nagy mennyiségben megtalálható miRNS-ek közül a miR-223 a P2RY12 [80], míg a miR-26b és a miR-140 a P-selectin (SELP) génjének mRNS-ét szabályozhatják a TargetScan humán predikációs program (Release 7.0, 2015. augusztus, www.targetscan.org) alapján (14. ábra A). 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 MK sejtekben. A P2RY12 mRNS szintjében szignifikáns emelkedést ($P=0,036$) tapasztaltunk DM2-ben az egészséges kontrollokhoz képest. A csökkent miR-26b és miR-140 szintek mellett a SELP mRNS expressziója szintén jelentősen magasabb ($P=0,005$) volt DM2-ben (14. ábra B). Ezzel párhuzamosan a glükóz kezelt MEG-01 MK sejtekben is hasonló mértékű emelkedést ($P<0,05$) detektáltunk mindkét mRNS esetében 24 óra elteltével (14. ábra C). A megváltozott

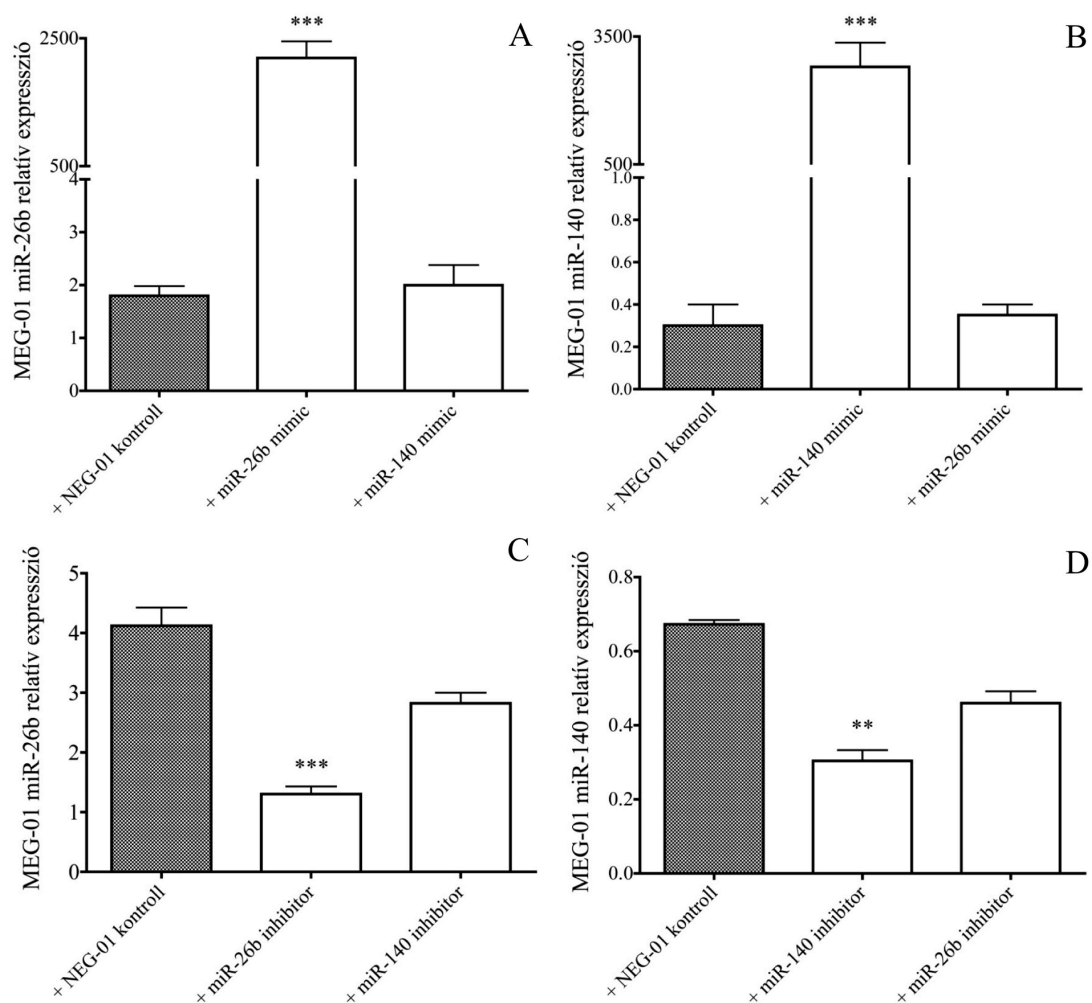
mRNS szintek megalapozhatják a P2Y12 receptor és a P-selectin fokozott sejtfelszíni kifejeződését, ami hozzájárulhat az abnormális vérlemezke aktiváció kialakulásához DM2-ben.



14. ábra. A miR-223 a P2RY12, míg a miR-26b és miR-140 a SELP mRNS expresszióját szabályozzák. 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). DM2-ben a betegek vérlemezkéiben mindkét mRNS szintje jelentősen emelkedett az egészséges kontrollokhoz (szürke oszlop) viszonyítva, n=14-18/csoport (B), továbbá a glükózzal kezelt MK sejtekben a kiindulási mintákhoz (szürke oszlop) képest szintén nőtt a két mRNS expressziója 24 óra elteltével, n=6/csoport (C). Átlag és SEM értékeket ábrázoltunk. *P<0,05, **P<0,01.

5.1.6 A miR-26b, miR-140 és SELP mRNS közötti kapcsolat igazolása

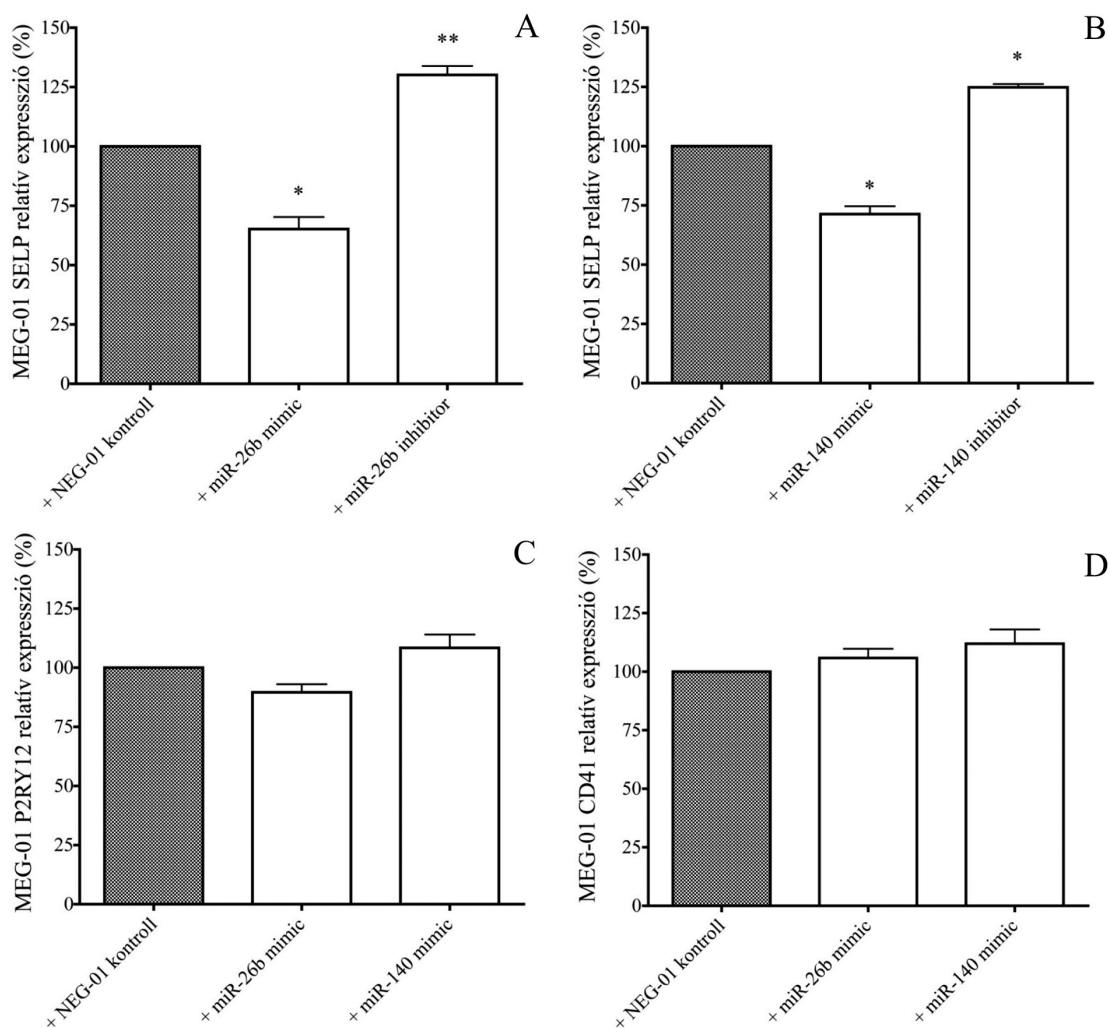
A miR-26b, a miR-140 és a SELP mRNS közötti direkt kapcsolatot miRNS mimic-ek és inhibitor-ok használatával vizsgáltuk. A MEG-01 MK sejtekbe Lipofectamine reagenssel transzfektáltuk a miRNS expresszió modulátorokat 24 órán keresztül, majd első lépésben ellenőriztük a transzfekció hatékonyságát. A mimic-ek hatására a miR-26b és a miR-140 fokozottan expresszáldott (15. ábra A, B), míg a specifikus miRNS inhibitor-ok jelentősen gátolták ezen miRNS-ek szintjét (15. ábra C, D) az MK sejtekben, ugyanakkor egymás hatását nem befolyásolták.



15. ábra. A miRNS mimic és inhibitor transzfekciójának hatékonyság ellenőrzése a MEG-01 sejtekben. A kontroll mimic/inhibitor (NEG-01) kezelést kapott sejtmintákhoz viszonyítva (szürke oszlop) a mimic képes volt fokozott miRNS expressziót okozni a MK sejtekben (A, B), míg az inhibitorok jelentősen csökkentették a saját miRNS szintet (C, D). Átlag és SEM értékek kerültek feltüntetésre, 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 kontroll mimic-kel (NEG-01) transzfektált sejtek SELP mRNS tartalmát 100%-nak vettük, ehhez hasonlítottuk transzfektálás után az MK 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 (16. ábra A, B). Ezekkel a kísérletekkel megerősítettük ezen miRNS-ek (miR-26b és miR-140) és cél mRNS-ük (SELP) közötti direkt kapcsolatot.

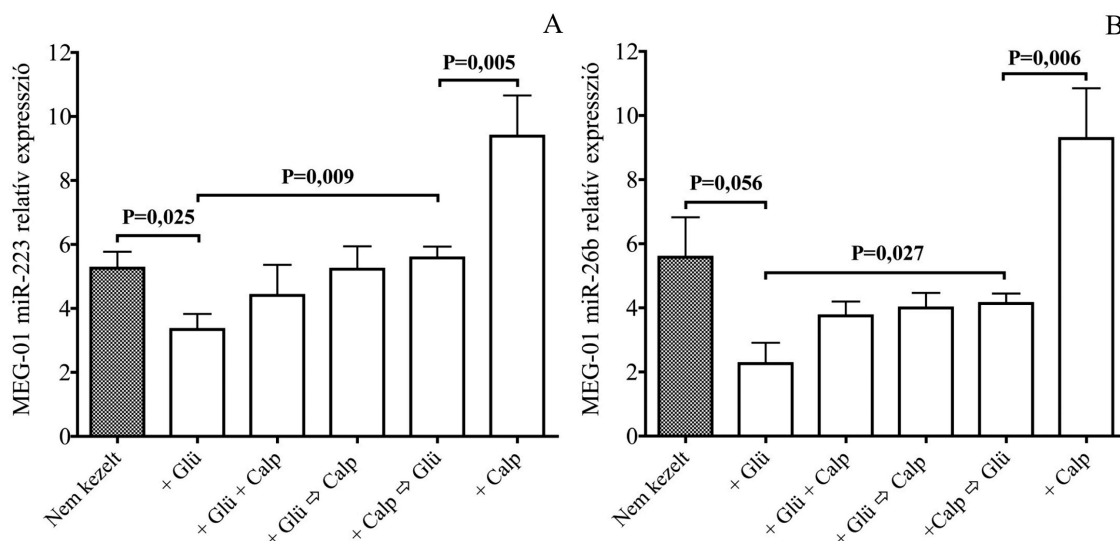


16. ábra. A SELP mRNS expressziójának változása miRNS mimic-ek és inhibitorok hatására. A miR-26b mimic hatására jelentősen csökkent, ugyanezen inhibitor jelenlétében jelentősen nőtt a SELP mRNS szintje a negatív kontrollal (NEG-01) transzfektált mintákhoz (szürke oszlop) képest (A). Hasonló változásokat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

Végül 2 másik fontos thrombocyta mRNS expresszióját is vizsgáltuk (P2RY12, CD41), melyekre nem voltak hatással a miR-26b és miR-140 miRNS mimic-ek, ezzel alátámasztottuk a kísérlet specifikusságát (16. ábra C, D).

5.1.7 A miRNS expressziók Dicer függőségének vizsgálata calpain inhibitorral MEG-01 sejtekben

A DM2-ben tapasztalt csökkent miRNS expressziók hátterében a kisebb pre-miRNS szintek mellett az alacsonyabb Dicer aktivitás is állhat. A Dicer - mint III-as típusú RNáz - fontos szerepet tölt be a pre-miRNS és érett miRNS átalakulásban, ezért vizsgáltuk ezt a szabályozó lépést is. Amennyiben calpeptinnel (calpain 1 és 2 inhibitor) gátoljuk a Dicer működését jelentősen befolyásoló calpainokat, akkor megvédjük az enzim funkcióját. A hyperglycaemiás MK sejtekhez adott calpeptin visszaállította a Dicer aktivitását, ami normalizálta a miR-223 (P=0,009) és miR-26b (P=0,027) expresszióját (17. ábra A, B).



17. ábra. A Dicer enzim vizsgálata az érett miRNS-ek expressziójának szabályozásában hyperglycaemiás 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, az megakadályozta a miRNS expressziók csökkenését a Dicer protektív hatásán keresztül. Az ábrán az átlag és SEM értékeket ábrázoltuk, n=4-6/csoport.

5.2 A BMS és DES sejtaktiváló hatásának összehasonlítása stabil anginában

Egy klinikai vizsgálatban a BMS és a DES sejtaktiváló hatásának összehasonlítását végeztük, mivel a PhD dolgozatom egyik fő célja a vérlemezke és az endothelsejt aktiváció vizsgálata volt trombotikus komplikációkkal nagy eséllyel együttjáró betegségekben.

5.2.1 A betegek demográfiai és klinikai jellemzői

Jelen tanulmányban 28 BMS és 21 DES kezelésben részesült stabil anginás beteg vérmintáiban vizsgáltuk a vérlemezke és az endothelsejt aktivációs markerek szintjét. A betegcsoportok korban és nemben azonosak voltak és nem volt különbség a társbetegségek (DM2, magas vérnyomás vagy hyperkoleszterinaemia) jelenlétében és a dohányzási szokásokban sem (6. táblázat). A beavatkozást követően a betegeket 6 hónapon keresztül követtük, amely során a klinikus nem tapasztalt sztenttrombózist, azonban 6 BMS betegben ISR alakult ki.

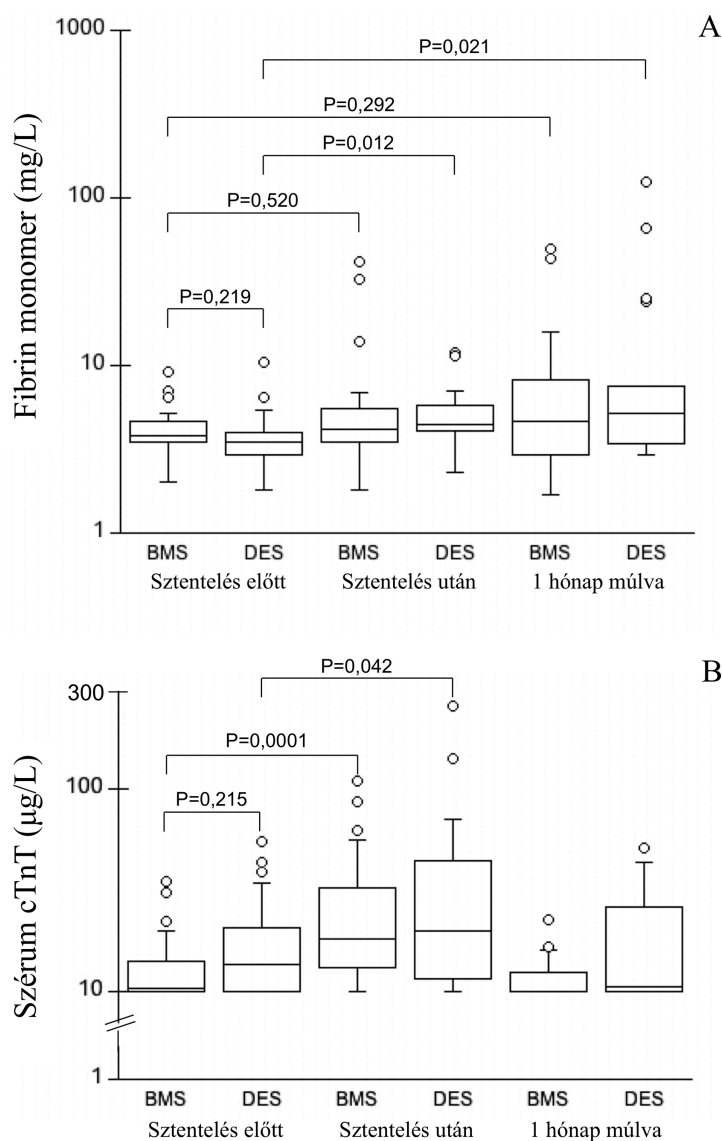
Kezelés előtti paraméterek	BMS (n=28)	DES (n=21)	P érték
Életkor (év)	68,4 ± 9,9	64,3 ± 11,3	0,19
Nem (férfi, %)	50	77	0,13
Diabetes mellitus (%)	46	54	0,77
Magasvérnyomás (%)	92	91	0,78
Dohányzás (%)	53	38	0,14
Hyperkoleszterinaemia (%)	38	37	0,88
BMI (kg/m ²)	30,2 ± 5,4	27,9 ± 5,2	0,59
Előző MI (%)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

6. táblázat. A vizsgálatban résztvevő betegek kezelés előtti demográfiai jellemzői. Rövidítések: BMS: bare metal stent, DES: drug eluting stent, BMI: body mass index, MI: myocardialis infarctus.

A sztent beültetést követő hemosztázis eltérések monitorozására a D-dimer és a FM koncentrációkat használtuk. Amíg a D-dimer és fibrinogén szintekben nem volt különbség, addig az FM koncentrációk jelentősen emelkedtek voltak már 24 órával a beavatkozást követően (P=0,012), és ez nem csökkent le az 1 hónapos mintákban sem (18. ábra A). A medián FM értékek ugyanakkor a referencia tartományban (<10 mg/L) maradtak.

Az intervenciók során bekövetkezett átmeneti myocardialis ischemia értékelésére szérums 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, melyek 1 hónap elteltével visszacsökkentek a kiindulási értékekre (18. ábra B).

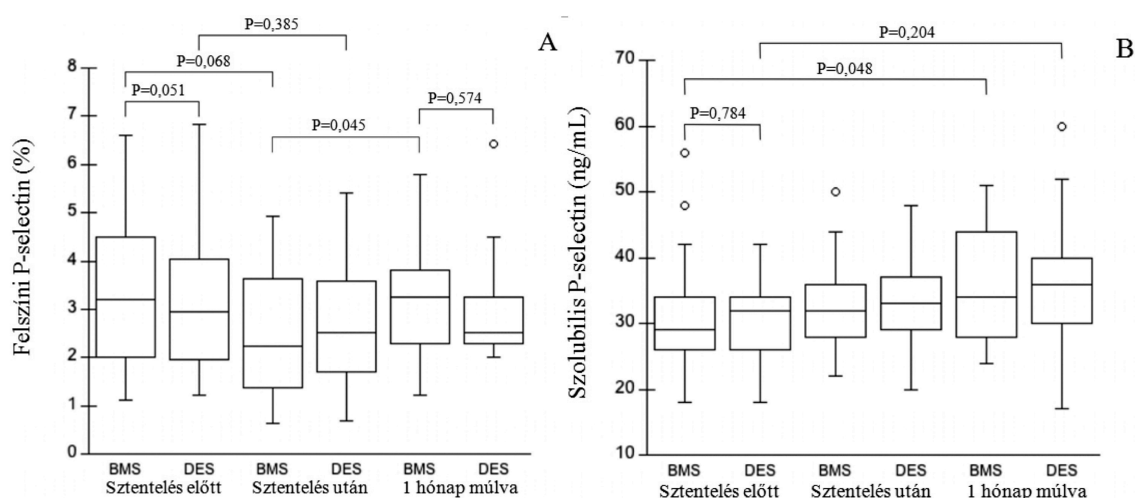


18. ábra. A BMS és DES csoportok fibrin monomer (FM) és cardialis troponin T (cTnT) eredményei. A DES csoportban a FM koncentrációja jelentősen emelkedett már 24 órával a beavatkozást követően, ami nem csökkent vissza a kiindulási értékekre 1 hónap múlva sem. A BMS csoportban nem tapasztaltunk hasonló mértékű eltérést az FM szintekben (A). Az intervenció után kialakult myocardialis ischemia miatt a sztent beültetést követő napon jelentősen magasabb cTnT koncentrációkat figyeltünk meg mind a BMS, mind a DES csoportban (B). Ez a folyamat 1 hónap elteltével mérséklődött és a cTnT koncentrációk mindkét csoportban visszacsökkentek a kiindulási értékekre (B). Az ábrán a medián mellett az 5-95 percentilis értékeket tüntettük fel. (BMS: $n=28$ és DES: $n=21$).

5.2.2 A vérlemezke aktivációs markerek

A vérlemezke aktiváció mértékét a felszíni P-selectin áramlási citometriai, valamint a plazma minták szolubilis P-selectin, CD40L és PDGF-BB koncentrációk mérésével detektáltuk a sztent-kezelés előtt és után. A kettős thrombocyta funkciót gátló

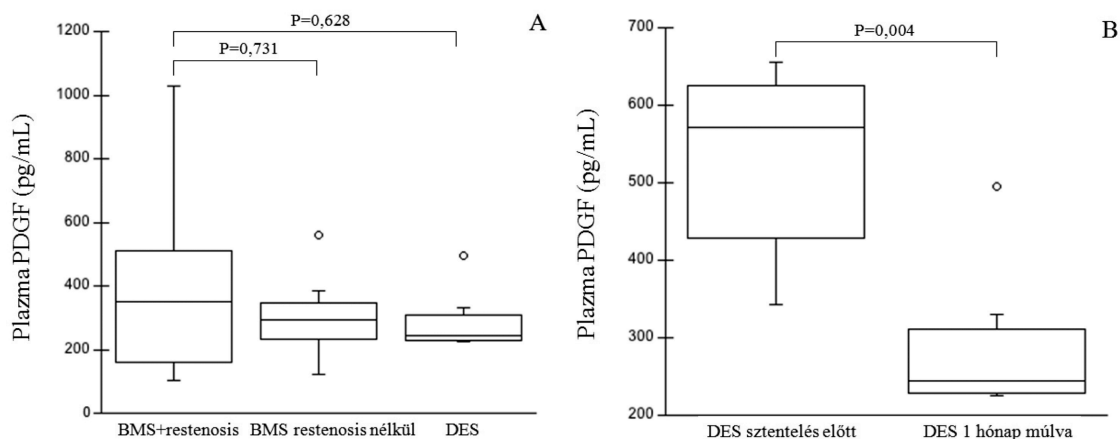
terápia ellenére mindkét sztent típus alkalmazása mellett fokozott vérlemezke aktivációt figyeltünk meg a sztent beültetést követően 1 hónappal, de a két csoport között nem volt különbség a felszíni P-selectin expressziókban (BMS: 3,3 [2,3–3,8] %; DES: 2,5 [2,3–3,2] %; $P=0,574$) (19. ábra A). Ehhez hasonlóan a szolubilis P-selectin koncentrációk is fokozatosan megemelkedtek a keringésben, különösen a BMS csoportban, ahol a beavatkozás után 1 hónappal szignifikánsan magasabb koncentrációk voltak (a kezelés előtti értékekhez képest $P=0,048$) (19. ábra B). A szolubilis CD40L szintek a referens tartományon (<100 pg/mL) belül maradtak a követés során és a két csoport között nem volt jelentős különbség.



19. ábra. A koronária sztentelést követő vérlemezke aktiváció mértékének változása. A sztent beültetést követően 1 hónappal mindkét sztent típus alkalmazása mellett fokozott vérlemezke aktivációt figyeltünk meg. A felszíni P-selectin expressziókban azonban nem volt különbség a BMS és a DES között (A). Ehhez hasonlóan a szolubilis P-selectin koncentrációk is fokozatosan megemelkedtek a keringésben, különösen a BMS csoportban, ahol a beavatkozás után 1 hónappal szignifikánsan magasabb szintek voltak a kezelés előtti értékekhez képest (B). Az ábrán a medián mellett az 5-95 percentilis értékeket tüntettük fel. (BMS: $n=28$ és DES: $n=21$).

A sztentelés okozta vaszkuláris sérülést követően az aktiválódott vérlemezkékből nagy mennyiségű PDGF-BB is kikerülhet a keringésbe, ami a simaizomsejtek proliferációját stimulálhatja [130]. Emellett más növekedési faktorok, a gyulladós sejtek infiltrációja és az intenzív extracelluláris remodelling további érszűkületet okozhat a sztentelés helyén vagy annak környékén [130]. Mindezek ismeretében meghatároztuk a plazma minták PDGF-BB szintjét is ELISA módszerrel, hogy további bizonyítékot kapjunk a BMS indukálta ISR kialakulására. Azoknál a betegeknél, akiknél a BMS mellett kialakult az ISR, átlagosan magasabb PDGF koncentrációkat mértünk a sztentelés után 1 hónappal a komplikációt nem mutató BMS betegekhez és a DES csoporthoz képest (20. ábra A). A DES csoportban ugyanakkora PDGF szintje

önmaga kiindulási értékéhez képest jelentősen lecsökkent ($P=0,004$) 1 hónappal a beavatkozást követően (20. ábra B), ami részben magyarázhatja, hogy miért nem alakult ki ISR ebben a csoportban.

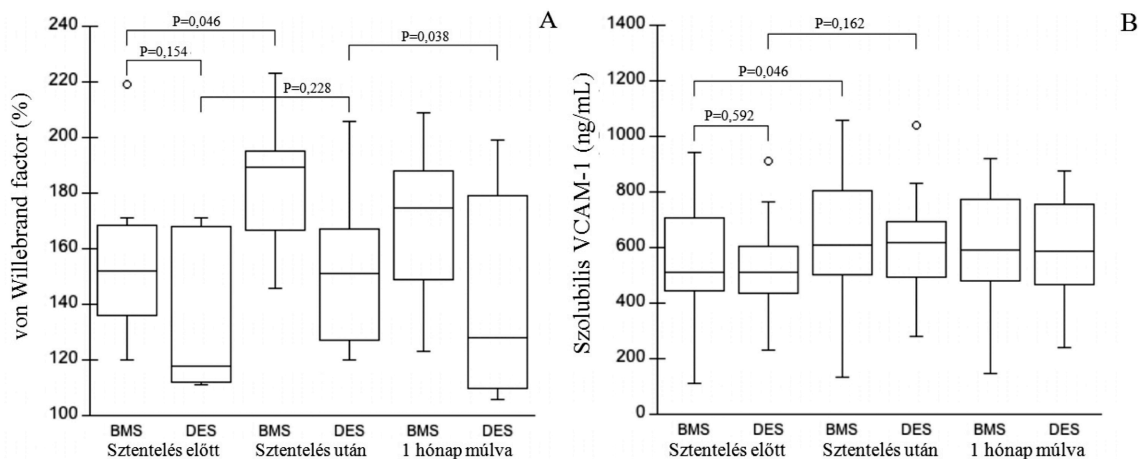


20. ábra. A plazma PDGF szintek összehasonlítása az egyes betegcsoportok között. A követési idő alatt a BMS-t kapott betegek 20%-ában korai ISR alakult ki, szemben a DES csoporttal, ahol nem volt ilyen komplikáció. A sztent kezelés után 1 hónappal az ISR csoportban mérsékelt emelkedést tapasztaltunk a PDGF szintekben a komplikáció nélküli BMS és DES csoportokhoz képest, ami statisztikailag nem volt szignifikáns különbség (A). Ugyanakkor a DES csoportban jelentősen csökkent a PDGF koncentrációja 1 hónappal a sztent kezelést követően az azt megelőző állapothoz képest (B). Az ábrán a medián mellett az 5-95 percentilis értékeket tüntettük fel. (BMS+restenosis: $n=6$, BMS restenosis nélkül: $n=22$ és DES: $n=21$).

5.2.3 Az endothelsejt aktivációs markerek

Az endothelsejt aktivációs markereket két fő csoportra lehet osztani aszerint, hogy milyen gyorsan jelzik az endothelsejt károsodást [131]. Az I. típusba tartoznak a korai vagy azonnali (pl. a vWF) markerek, a II. típust a sejtaktivációt követően (4-6 óra alatt) szintetizálódó, majd expresszálódó fehérjék (pl. VCAM-1, E-selectin, ICAM-1) alkotják [131].

A vWF az endothelsejtekben a Weibel-Palade testekben raktározódnak, ahonnan gyorsan szekretálódnak az endothelsejt sérülést követően. A sztent kezelés előtt nem volt különbség ($P=0,154$) a medián vWF-Ag koncentrációkban a két csoport között, ugyanakkor a BMS beavatkozás után 24 órával szignifikáns emelkedést (190 [173-195] vs. 152 [142-167] %, $P=0,046$) mutatott (21. ábra A). A DES csoportban nem tapasztaltunk ilyen mértékű eltérést, a legtöbb esetben a referencia tartományon belül (50-160 %) voltak az értékek (21. ábra A).



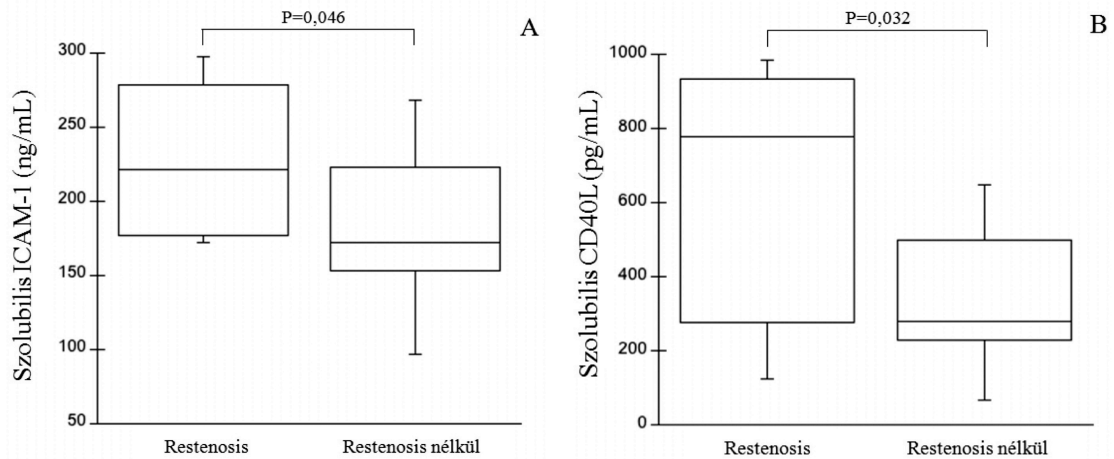
21. ábra. Az endothelsejt aktivációs markerek (vWF és VCAM-1) változása a BMS és DES implantációt követően. A von Willebrand factor (vWF) szintje szignifikánsan megemelkedett a fémstent (BMS) beültetését követő napon és a legtöbb beteg esetében az értékek a referens tartomány felett maradtak az 1 hónapos mintákban (A). Ezzel ellentétben a DES csoportban a vWF koncentrációk alapján nem volt ilyen mértékű endothelsejt aktiváció (A). A sztentelés után 24 órával egy másik aktivációs marker szintje, a szolubilis VCAM-1 is szignifikánsan magasabb volt a BMS csoportban, ugyanakkor a gyógyszer kibocsátó stent alkalmazása mellett ez nem emelkedett jelentősen (B). Az ábrán a medián mellett az 5-95 percentilis értékeket tüntettük fel. (BMS: n=28 és DES: n=21).

A BMS csoportban a sztent kezelés után 1 nappal vett 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 (21. ábra B), ahol ez nem emelkedett jelentősen ($P=0,162$). A szolubilis ICAM-1 csak mérsékelt emelkedést mutatott a sztent implantációt követően 1 hónappal, és ez a változás azonos mértékű volt a BMS és a DES csoportok között, azonban az E-selectin értékekhez hasonlóan, jelentősen magasabb volt ISR-ben (lásd a következő alfejezetben).

5.2.4 ISR-ben emelkedett sejtaktivációs markerek

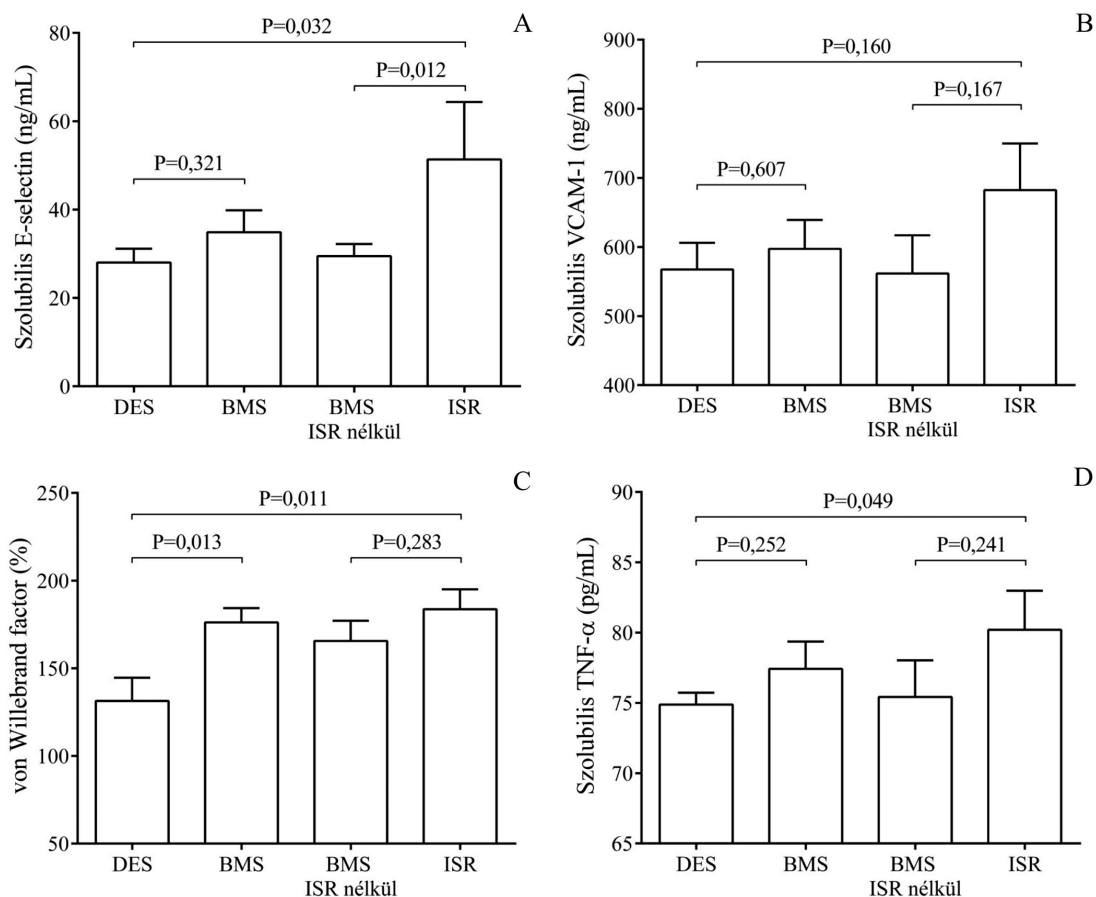
A BMS kezelésben részesült betegek közül 6 esetben (kb. 20 %) ISR alakult ki a követési idő alatt, viszont a DES csoportban nem volt ilyen komplikáció, ezért a csoportbontás után is megvizsgáltuk az aktivációs markerek eredményeit.

A CD40L és az ICAM-1 receptorok szintje a leukocyták aktivációját jelzik és az endothelsejtekhez való kötődését segítik elő. Habár az össz BMS és a DES csoportok között nem tapasztaltunk különbséget, az ISR jóval magasabb szolubilis ICAM-1 ($P=0,046$) és CD40L ($P=0,032$) koncentrációk jelenlétében következett be (22. ábra A, B), jelezve a nagyobb mértékű celluláris aktivációt.



22. ábra. A szolubilis ICAM-1 és CD40L koncentrációk in-stent restenosisban. A csoportbontást követően a szolubilis ICAM-1 (A) és CD40L (B) koncentrációja szignifikánsan magasabb volt restenosisban, mint azokban a betegekben, akiknél nem alakult ki komplikáció. Az ábrán a medián mellett az 5-95 percentilis értékeket tüntettük fel. (Restenosis: n=6, Restenosis nélkül: n=22).

Ehhez hasonlóan az endothelsejt aktivációs markerek az E-selectin, a VCAM-1 és a vWF szintek is magasabbak voltak ISR-ben (23. ábra A-C) a DES csoporthoz képest. Ez a változás különösen a szolubilis E-selectin és a vWF esetében volt jelentős mértékű (P=0,032 és P=0,011), míg a szolubilis VCAM-1 esetében egy hasonló irányú tendenciát tapasztalhattunk (P=0,160).



23. ábra. Az in-stent restenosis (ISR) fokozott endothelsejt aktiváció és nagyobb vaszkuláris gyulladás mellett alakult ki. A DES csoporthoz képest, ISR-ben jelentősen magasabb E-selectin (A), VCAM-1 (B) és vWF (C) szinteket detektáltunk. Emellett, az ISR-ben emelkedett TNF- α koncentráció (D) fokozottabb vaszkuláris gyulladási folyamatokra utalhat. Az ábrán az átlag és SEM értékeket ábrázoltuk. (DES: n=21, BMS: n=28, BMS-ISR nélkül: n=22 és ISR: n=6).

Az ISR kialakulása során lejátszódó vaszkuláris gyulladási folyamatokról az emelkedett TNF- α szint nyújthat további információt [112]. Az ELISA méréseket követően azt tapasztaltuk, hogy a plazma mintákban lényegesen magasabb (P=0,049) volt a citokin plazma koncentrációja ISR-ben (23. ábra D).

5.2.5 A vérlemezke funkció gátló kezelésekre adott válasz hatása a sztent indukálta sejtaktivációra

Az aspirin/clopidogrel kezelés hatékonysága a vérlemezke aggregáció és a VASP fehérje foszforiláció vizsgálatán keresztül került megállapításra 4 héttel a terápia megkezdését követően. A reszponderek közé tartoztak azok a betegek, akinek a vérlemezke reaktivitási indexe <50%, a nem reagáló személyeknél ez az érték >72% 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 (7. táblázat). A

kezelés hatékonysága nem befolyásolta a szolubilis markerek szintjét. A BMS csoportban a felszíni P-selectin pozitivitásban, a DES csoportban a plazma PDGF szintekben tapasztaltunk enyhe különbségeket a reszponderek és a gyengén vagy nem reagáló betegek között (7. táblázat).

Csoportok	Felszíni P-selectin (%)	Szolubilis P-selectin (ng/mL)	Szolubilis VCAM-1 (ng/mL)	Szolubilis ICAM-1 (ng/mL)	Szolubilis CD40L (pg/mL)	Szolubilis E-selectin (ng/mL)	PDGF-BB (pg/mL)
BMS							
Gyengén (n=6) és nem reagáló személyek (n=1)	3,6 (3,2-3,9)*	40 (28-46)	548 (478-753)	194 (175-242)	405 (254-576)	28 (20-33)	384 (256-452)
Reszponder (n=21)	2,9 (2,1-3,5)	32 (29-44)	620 (491-817)	193 (155-247)	376 (221-539)	33 (22-41)	374 (184-303)
DES							
Gyengén reagáló személyek (n=5)	2,8 (2,3-3,7)	36 (30-40)	580 (558-592)	180 (167-205)	398 (269-447)	24 (21-25)	300 (291-330)#
Reszponder (n=16)	2,4 (2,3-3,0)	36 (29-39)	591 (468-757)	181 (162-268)	374 (326-512)	25 (22-32)	229 (228-244)

7. táblázat. A reszponder és nem reszponder személyek eredményeinek összehasonlítása. A BMS és DES csoportokban a betegek válaszreakciója a thrombocyta funkciót gátló terápiára nem volt jelentős hatással a sejtaktivációs markerek szintjének változására. * A BMS csoportban csak a felszíni P-selectin expressziókban tapasztaltunk enyhe emelkedést a nem vagy gyengén reagáló személyeknél. # Hasonló mértékű változást figyeltünk meg a PDGF koncentrációkban a DES csoportban, azonban ez nem volt statisztikailag szignifikáns különbség. Az eredményeket medián érték és kvartilisek formában tüntettük fel a táblázatban.

5.3 Az everolimus endothelsejt aktivációt csökkentő hatásának vizsgálata

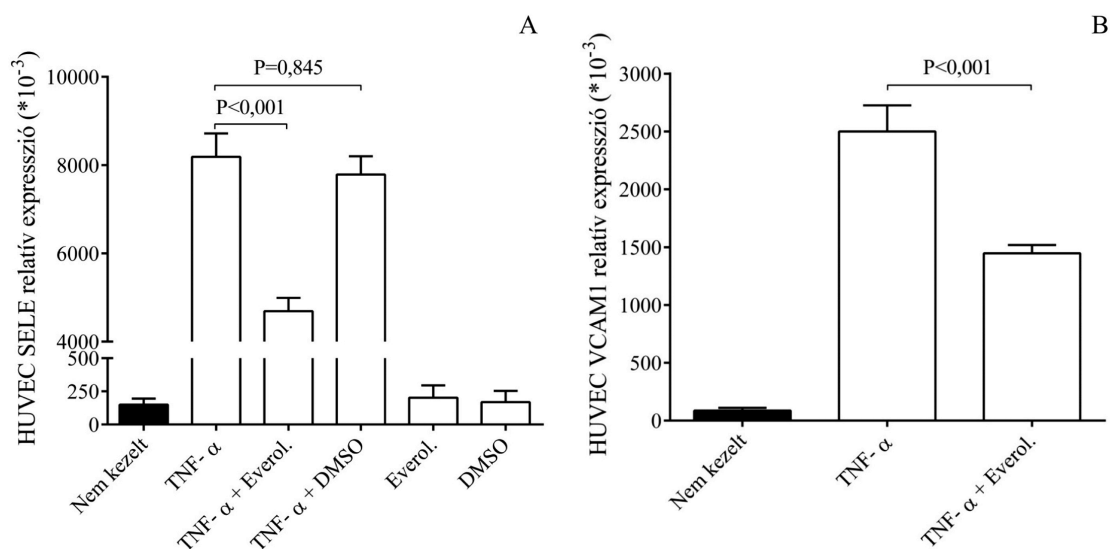
Eddigi vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy stabil anginában a koronária fémsztentek (BMS) és a gyógyszerrel eluálós sztentek (DES) az implantációt követően eltérő mértékben befolyásolták a thrombocyta és endothelsejt aktivációt a beavatkozás után 1 hónap elteltével. A koronária BMS implantációt követően a betegek egyötödében (n=6) ISR alakult ki szemben a DES kezelésben részesült személyekkel. Ennek hátterében a sztentelés miatti vérlemezke aktiváció indukálta érfali gyulladáshoz vezető folyamatok, endothelsejt aktiváció és fokozott simaizomsejt-proliferáció állhatnak [130], amely folyamatokat a gyógyszeres sztent megelőzni vagy jelentős mértékben csökkenteni tudott. Emellett az ISR magasabb szolubilis E-selectin és VCAM-1 szintekkel járt együtt, azonban ezen gének expressziójának potenciális transkripciós és posttranskripciós szabályozásáról és az everolimus moduláló hatásáról még kevés információ állt rendelkezésre. Az ISR kialakulásában továbbá felmerült a megváltozott expressziót mutató keringő miRNS-ek szerepe is. Ennek érdekében először *in vitro* endothelsejt tenyészetekben megnéztük, hogy a sztentelés provokálta inflammációt modellező, TNF- α indukálta sejtaktiváció hatására hogyan változnak ezen mRNS-ek

expressziója és az everolimus ezt milyen szinten képes mérsékelni. Ezt követően megvizsgáltuk a gének posttranscriptiós szabályozását a miR-181b expresszió mérésen keresztül. Végül a betegektől származó plazma mintákban is meghatároztuk a miRNS profilt, amit a szolubilis markerekkel korreláltattunk.

5.3.1 Az everolimus csökkentette a TNF- α kezelés hatására megemelkedett E-selectin és VCAM-1 szinteket in vitro endothelsejt kultúrákban

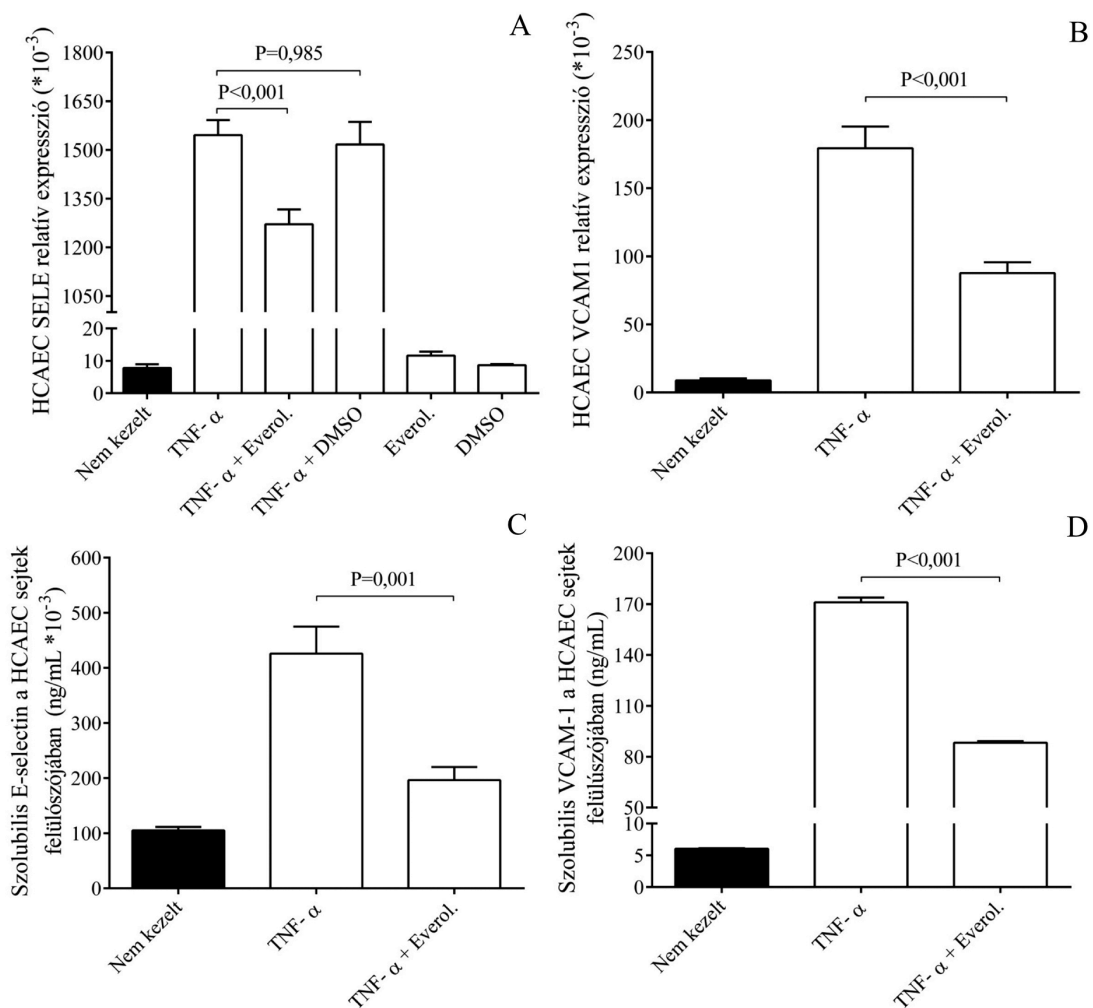
A vaszkuláris gyulladós folyamatokat TNF- α (100 ng/mL) aktiváció révén artériás koronária (HCAEC) és vénás (HUVEC) endothelsejteken modelleztük everolimus (0,5 μ M) jelenlétében és hiányában, majd RT-qPCR és ELISA módszerekkel meghatároztuk a SELE (E-selectin) és VCAM1 (VCAM-1) mRNS és fehérje expressziókat.

A SELE és VCAM-1 mRNS-ek szintje a TNF- α koncentrációjának (100 ng/mL) és az inkubálási idő (1-4 óra) függvényében markánsan növekedett (több tízszázszorosára), amit az everolimus (0,5 μ M) koncentráció függő módon szignifikánsan csökkenteni tudott a HUVEC (P<0,001) és a HCAEC (P<0,001) sejtekben (24. ábra és 25. ábra A, B). A gyógyszer önmagában nem volt jelentős hatással a sejtek működésére és az oldószere (DMSO) sem befolyásolta a celluláris folyamatokat.



24. ábra. A SELE és a VCAM1 mRNS szintek analízise HUVEC sejtekben. Az 1 órás TNF- α stimulus (100 ng/mL) hatására igen markáns emelkedést tapasztaltunk a SELE (A) és VCAM1 (B) mRNS szintekben a nem kezelt (sötét oszlop) mintákoz képest. A citokinnel együtt adott everolimus (0,5 μ M) szignifikánsan csökkenteni tudta mindkét mRNS expresszióját, ugyanakkor az oldószere (DMSO) nem befolyásolta a TNF- α hatását. Az everolimus és a DMSO önmagában nem volt hatással a celluláris folyamatokra. Az eredmények átlagát és a SEM értékeket ábrázoltuk, n=4-8/csoport.

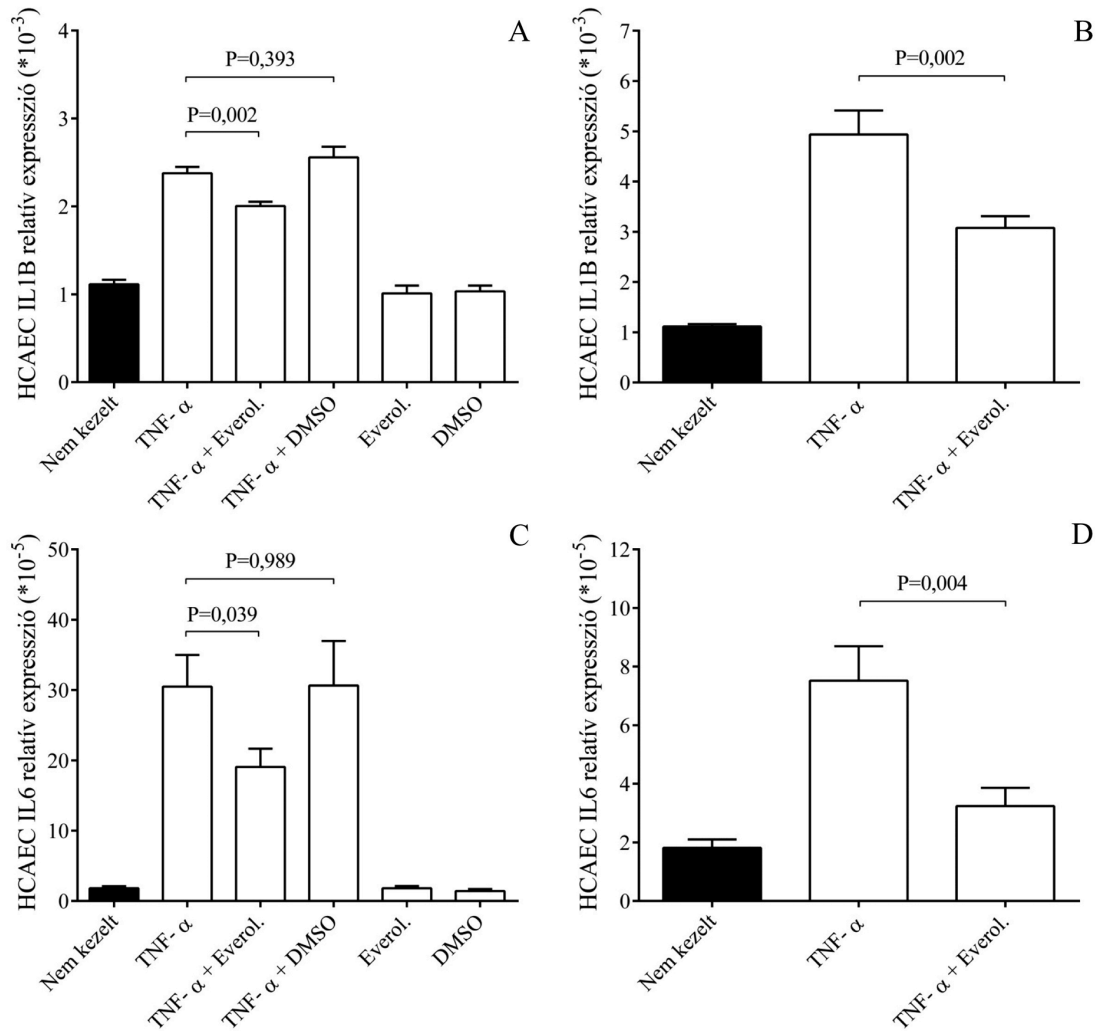
Az mRNA expressziók mellett a HCAEC sejtek felülcszójában a fehérje szinteket is meghatároztuk. A TNF- α kezelés hatására bekövetkező endothelsejt aktiváció következtében nagy mennyiségű E-selectin és VCAM-1 fehérje szabadult ki a sejtekből. Az everolimus az mRNA szintek befolyásolásán keresztül a fehérjék koncentrációját (E-selectin, $P=0,001$ és VCAM-1, $P<0,001$) is képes volt szignifikánsan csökkenteni (25. ábra C-D). Tehát ezek az *in vitro* eredmények előzetesen magyarázattal szolgálhatnak arra vonatkozóan, hogy a DES csoportban miért volt kisebb az endothelsejt aktiváció szintje és az E-selectin/VCAM-1 szintek a plazma mintákban.



25. ábra. Az E-selectin és a VCAM-1 mRNA és fehérje expressziók változása TNF- α stimulus hatására HCAEC sejtekben. A HUVEC sejtekben tapasztalt nagyfokú mRNA szint emelkedést a HCAEC sejtekben is megfigyeltük. A TNF- α kezelés (100 ng/mL) fokozott SELE (A) és VCAM1 (B) mRNA expressziókat eredményezett, ugyanakkor everolimus (0,5 μ M) jelenlétében ez jelentősen kisebb mértékű volt. A gyógyszer önmagában nem volt jelentős hatással a sejtek működésére és az oldószere (DMSO) sem befolyásolta a celluláris folyamatokat. Ezzel párhuzamosan a fehérjék koncentrációját is meghatároztuk a sejtek felülcszójában. A szolubilis E-selectin már 4 órás TNF- α kezelést követően szignifikánsan megemelkedett (C), míg a VCAM-1 esetén 24 óra után láttunk hasonló mértékű változást (D). Az everolimus az mRNA szintek befolyásolásán keresztül a fehérjék koncentrációját is jelentősen csökkentette (C, D). Az eredmények átlagát és a SEM értékeket ábrázoltuk, n=4-8/csoport.

5.3.2 Az everolimus gyulladáscsökkentő hatása az endothelsejtekben

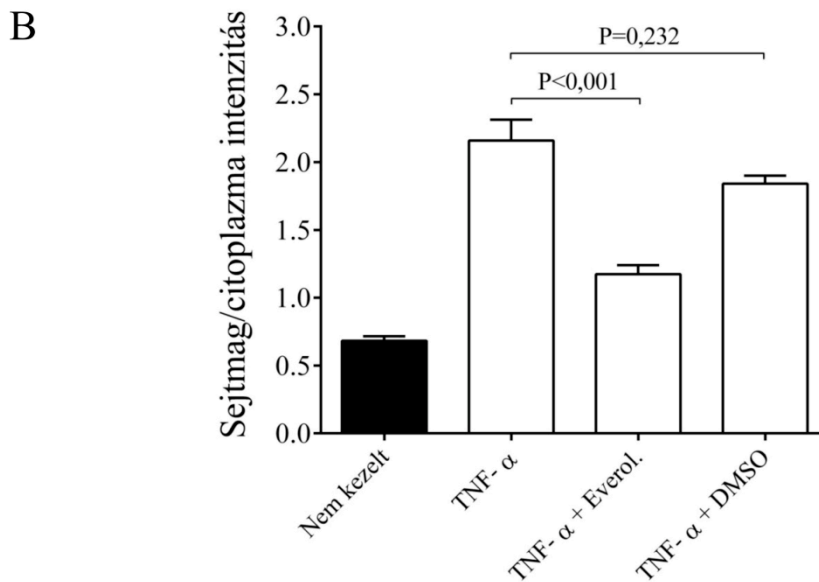
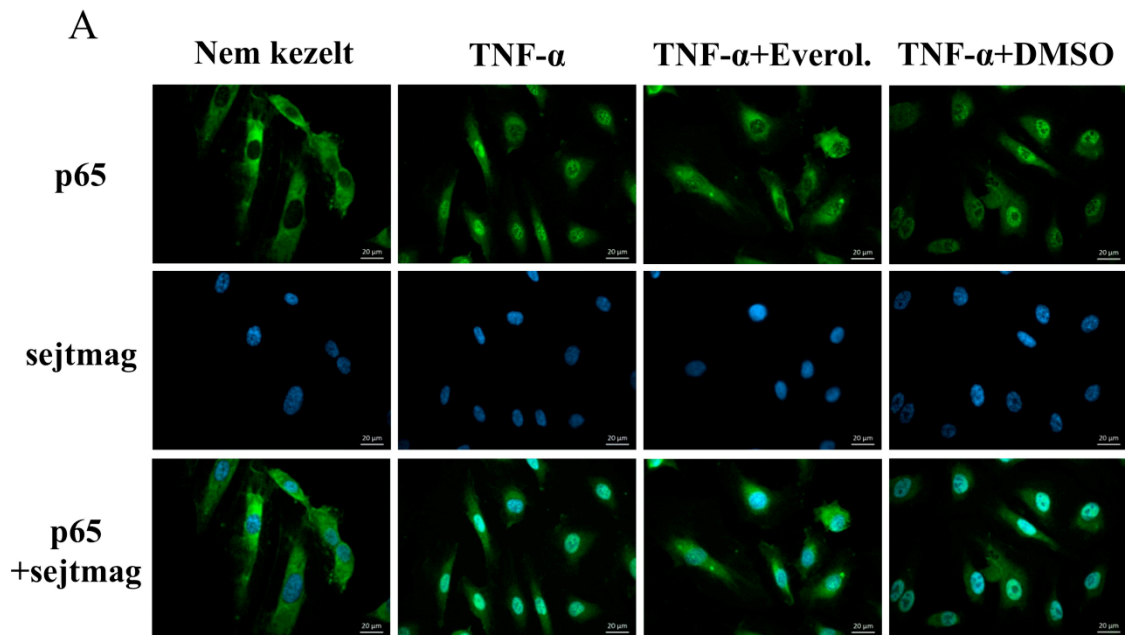
Az endothelsejt aktivációs markerek szabályozásában betöltött szerepe mellett az everolimus gyulladáscsökkentő hatását az IL-1 β és IL-6 mRNS-ek expresszióján keresztül analizáltuk. A HCAEC sejtekben TNF- α citokinnal kiváltott gyulladást az emelkedett IL-1 β és IL-6 mRNS szintek igazolják, amik már 1-4 órával a kezelés után jelentős mértékűek voltak. Ezt a nagyfokú gyulladást az everolimus 1 óra alatt szignifikánsan redukálta (26. ábra A, C), ami 4 órát követően még kifejezőbbé vált az IL-1 β (P<0,002) és az IL-6 (P=0,004) mRNS esetén is (26. ábra B, D). Ezen eredmények alapján az everolimus csökkenteni tudta a TNF- α indukálta gyulladást az endothelsejtekben.



26. ábra. A TNF- α citokinnal kiváltott gyulladást az everolimus az endothelsejtekben. A HCAEC sejtekben TNF- α citokinnal kiváltott gyulladást az emelkedett IL-1 β és IL-6 mRNS szintek igazolják, amik már 1 órával a kezelés után jelentős mértékűek voltak (A, C). Ezt a nagyfokú gyulladást az everolimus 1 óra alatt szignifikánsan redukálta (A, C), ami 4 órát követően még kifejezőbbé vált az IL-1 β és IL-6 mRNS esetén is (B, D). Az eredmények átlagát és a SEM értékeit ábrázoltuk, n=4-8/csoport.

5.3.3 Az everolimus hatása az NF- κ B útvonal aktiválódására

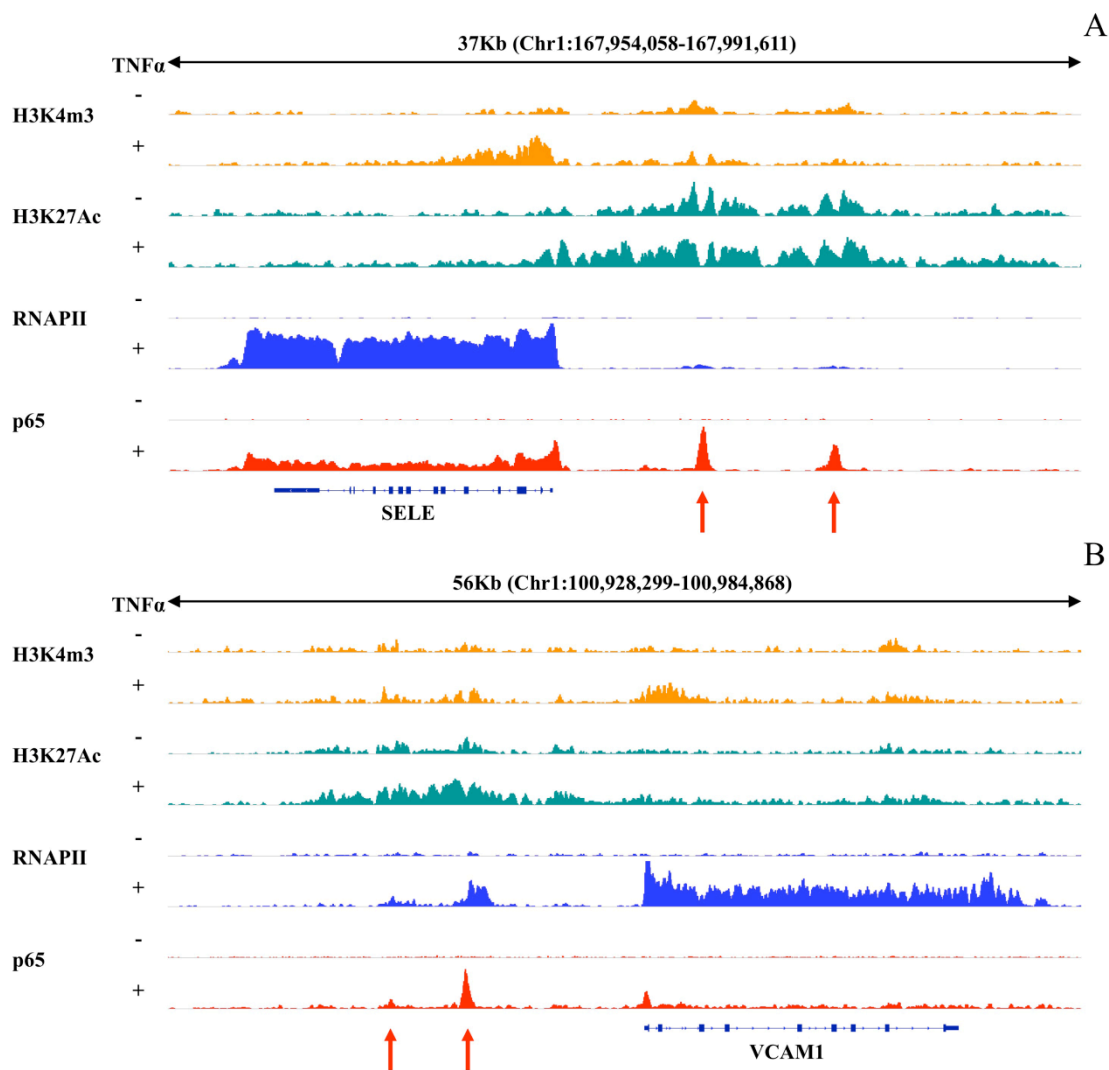
Az NF- κ B útvonal aktivációja során a p65 transzkripciós faktor (TF) a citoplazmából bejut a sejtmagba, ahol gyulladásozó gének transkripcióját serkenti, ezért a magtranszlokáció mérésével következtetni lehet a gyulladásozó válaszüreakció mértékére [128]. Ebből kifolyólag megvizsgáltuk, hogy az everolimus gyulladásozócsökkentő hatása a korai p65 transzlokáció gátlásán keresztül megy-e végbe. Ehhez a HCAEC sejteket rekombináns TNF- α -val (100 ng/mL) 1 órány 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. 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 (27. ábra). Ezzel ellentétben a DMSO nem befolyásolta a citokin hatását ($P = 0,232$). Ezekkel a kísérletekkel igazolni tudtuk, hogy az everolimus az NF- κ B útvonal gátlásán keresztül fejti ki gyulladásozócsökkentő hatását.



27. ábra. Az NF- κ B útvonal aktivációját a p65 transzkripciós faktor magtranszlokációja révén vizsgáltuk immunfestéssel. A HCAEC sejteket 1 órán keresztül stimuláltuk TNF- α -val (100 ng/mL) everolimus (0,5 μ M) vagy az oldószere (DMSO) jelenlétében és hiányában. A p65 jelölődést fluoreszcens mikroszkóppal analizáltuk (A) és meghatároztuk a sejtmag és citoplazma jelintenzitás arányát (B). A stimulus hatására a p65 nagy része bekerült a sejtmagba, ahol gyulladásos gének expresszióját fokozhatta. Az everolimus az NF- κ B útvonal gátlásán keresztül csökkentette a p65 magtranszlokáció mértékét, ezáltal csökkentve a gyulladásos sejtválasz mértékét. Zöld színnel a p65 specifikus festődése 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.

5.3.4 Az SELE és a VCAM1 gén transcriptió szintű szabályozása és az everolimus hatása az enhancer RNS-ek kifejeződésére

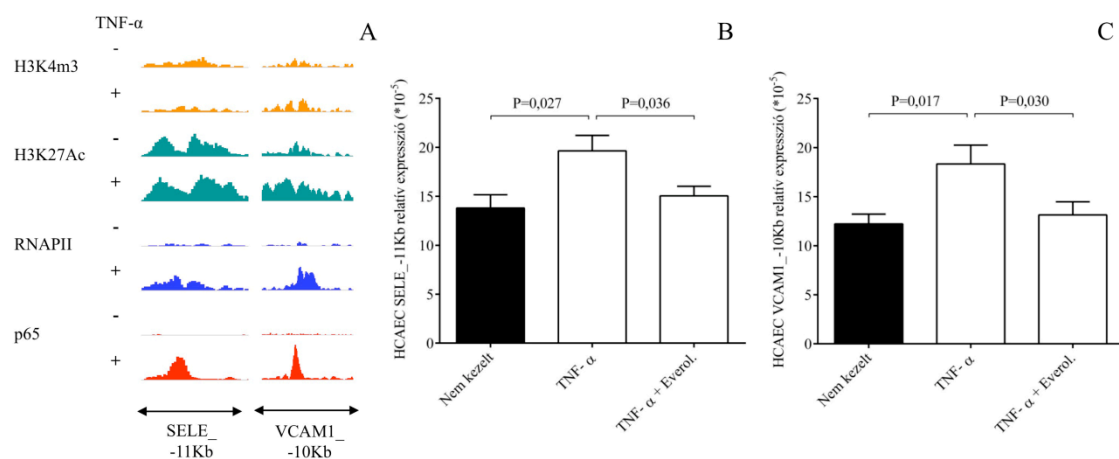
Az E-selectin és VCAM-1 expressziók transcriptió szintű szabályozásában részt vevő gyulladási jelátviteli folyamatokat eddig LPS-el kezelt endothelsejtekben vizsgálták [132]. A fenti eredmények alapján feltételeztük, hogy az everolimus a gének közelében található aktív enhancerek represszálásán keresztül képes csökkenteni a TNF- α hatására megemelkedett SELE és VCAM1 mRNS szinteket. A SELE és VCAM1 gének közelében lévő TNF- α indukált aktív enhancer régiókat a nyilvánosan elérhető Chip-szekvenálási adatok [122, 123] újraelmézésével azonosítottuk. HUVEC sejtekben az RNS polimeráz II, a p65 TF jelenlétében és az aktív gén promóter marker (H3K27Ac) alapján a TNF- α kezelés hatására aktív transcriptió zajlott a SELE és VCAM1 gének esetében (28. ábra A, B). Emellett az aktív enhancer jelölő (H3K4m3) segítségével mindkét gén közelében két p65 és RNS polimeráz II-vel kapcsolt enhancer régiót azonosítottunk (28. ábra).



28. ábra. A SELE és a VCAM1 gének közelében található aktív enhancerek azonosítása Chip-seq adatok elemzésével. A nyilvánosan elérhető Chip-szekvenálási adatok újra elemzésével megvizsgáltuk a TNF- α kezelés hatását a SELE és VCAM1 gének transcriptiójára. HUVEC sejtekben az RNS polimeráz II aktivitása, a p65 transzkripció faktor jelenlétében és az aktív gén promotor marker (H3K27Ac) alapján az 1 órás TNF- α stimulus fokozta a SELE és VCAM1 gének transcriptióját. Továbbá az aktív enhancer jelölő (H3K4m3) segítségével mindkét gén közelében két-két p65 és RNS polimeráz II-vel kapcsolt enhancer régiót azonosítottunk, amit piros nyilakkal jelöltünk az ábrán. Rövidítések: TNF- α : tumor necrosis factor- α , H3K4m3: trimethylation of lysine 4 on the histone H3 protein subunit, H3K27Ac: acetylation lysine 27 on the histone H3 protein subunit, RNAPII: RNS polimeráz II, p65: p65 transzkripció faktor.

A közelmúltban megjelent közleményekben bemutatták, hogy az enhancer aktivitásra jól lehet következtetni az eRNS expresszió változásának mérésével [123, 133-135]. Ebből adódóan egy-egy kiválasztott eRNS expresszióját határoztuk meg mindkét gén esetén (29. ábra A). Megerősítettük, hogy a TNF- α stimulus hatására a SELE_-11Kb ($P=0,027$) és VCAM1_-10Kb ($P=0,017$) eRNS-ek expressziója fokozódik (29. ábra B, C), amit az everolimus 1 órás kezelést követően csökkenteni tudott ($P<0,05$) a HCAEC sejtekben. Mindezek alapján azt gondoljuk, hogy az everolimus a

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



29. ábra. Az enhancer RNS-ek (eRNS) expressziójának vizsgálata. Az everolimus enhancer aktivitására 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: TNF- α : tumor necrosis factor- α , H3K4m3: trimethylation of lysine 4 on the histone H3 protein subunit, H3K27Ac: acetylation lysine 27 on the histone H3 protein subunit, RNAPII: RNS polimeráz II, p65: p65 transzkripciósi faktor. Az eRNS-ek expressziójának átlagát a SEM értékeit ábrázoltuk, n=4-8/csoport.

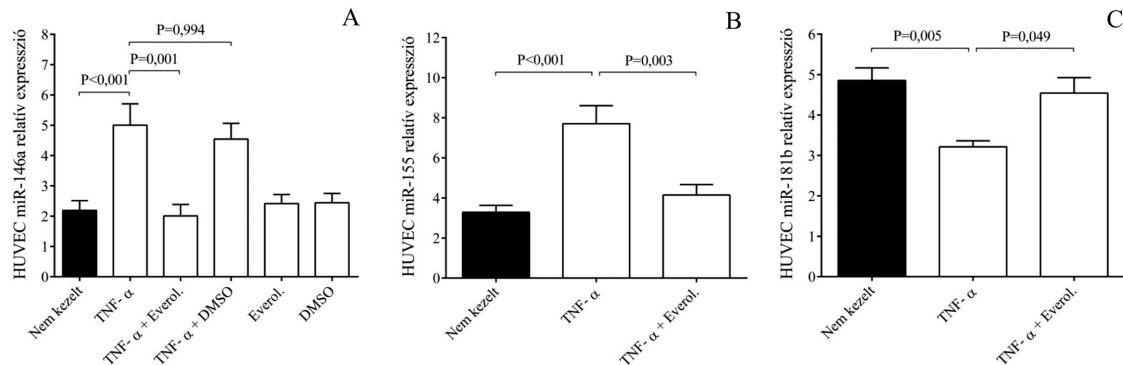
5.3.5 Az endothelsejt aktiváció posttranscriptiós szabályozása

Az E-selectin és VCAM-1 gének posttranscriptiós szabályozása miRNS-ek által is történhet [120], mint ahogy azt korábban HUVEC sejtekben már vizsgálták. Ebből kifolyólag a miR-181b szerepét analizáltuk *in vitro* TNF- α stimulált endothelsejt sejt kultúrákban (HCAEC és HUVEC), valamint megvizsgáltuk az everolimus potenciális szabályozó funkcióját is. A TNF- α -val kiváltott sejtaktivációs folyamatokat a gyulladás specifikus miRNS-ek expresszió változásán keresztül követtük [133].

A miR-155, miR-146a és miR-185 szintek jelentősen megemelkedtek a nem kezelt mintákhoz képest ($P < 0,001$) mindkét sejt típusban (30. ábra A, B és 31. ábra A), ami az IL-1 β és IL-6 mRNS-ekhez hasonlóan (26. ábra) jelezte a TNF- α által kiváltott gyulladásos válaszreakciót és az endothelsejt diszfunkciót [136, 137]. Ezzel szemben ezen miRNS-ek fokozott expressziója az everolimus jelenlétében nem következett be.

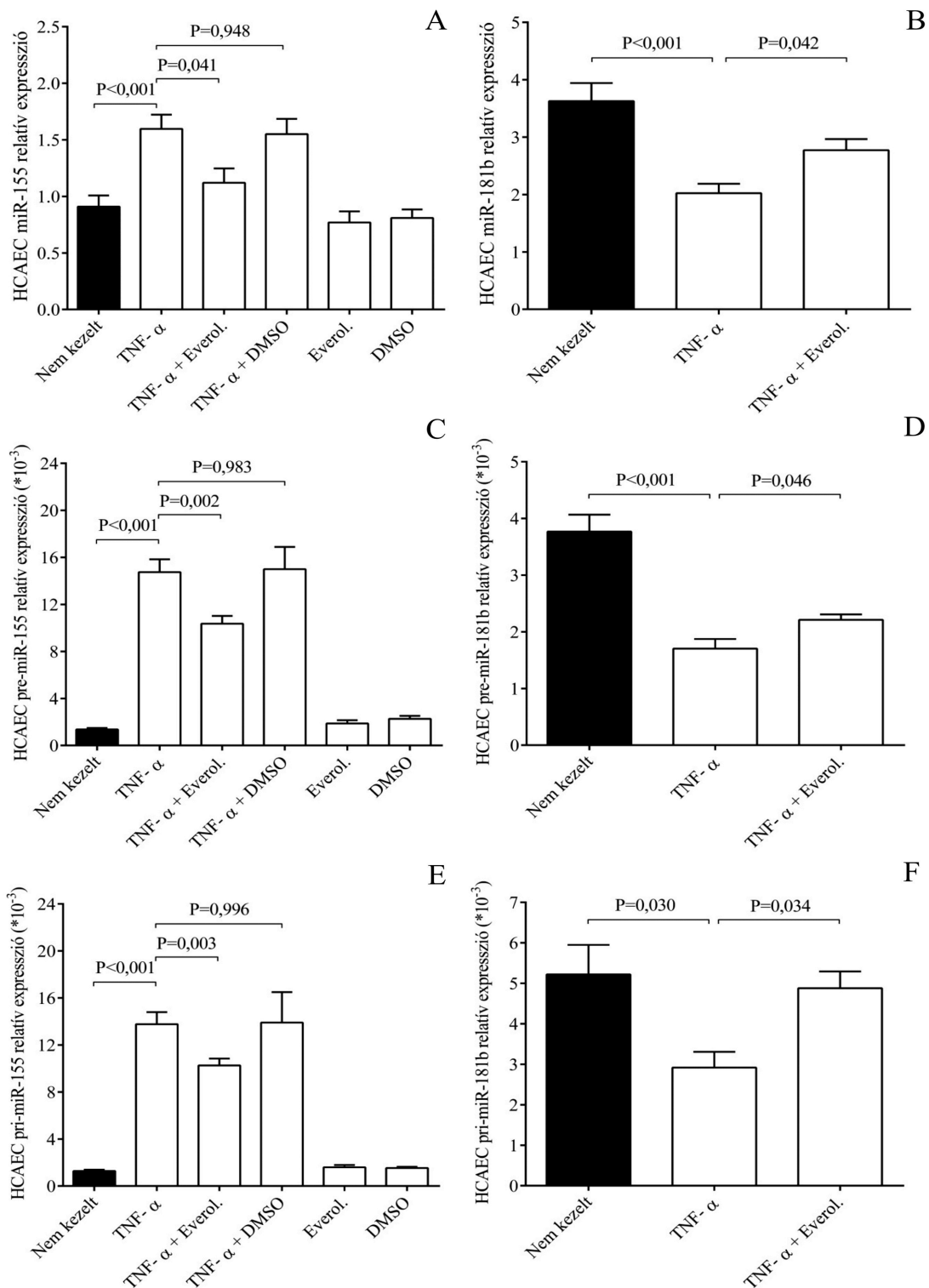
A miR-181b expressziója lényegesen lecsökkent ($P < 0,01$) a TNF- α stimulus hatására, ami hozzájárulhat a SELE és VCAM1 mRNS szintek további emelkedéséhez.

A gyulladással egy időben alkalmazott everolimus megakadályozhatta a miR-181b expressziójának csökkenését, ezáltal mérsékelheti 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 (30. ábra C, 31. ábra B).



30. ábra. A mikroRNS-ek expressziójának változása a HUVEC sejtekben. A TNF- α -val kiváltott gyulladással válaszreakciót az emelkedett miR-146a (A) és miR-155 (B) expressziókkal is alátámasztottuk, amit az everolimus szignifikánsan csökkenteni tudott (A, B). Ezzel ellentétben az E-selectin és a VCAM-1 mRNS-eket szabályozó miR-181b szintje jelentősen csökkent a kezelés hatására, ami az everolimus jelenlétében nem történt meg (C). Az everolimus önmagában és az oldószere (DMSO) nem befolyásolták a miRNS expressziókat (A). Az eredmények átlagát és SEM értékeit ábrázoltuk, n=6-8/csoport.

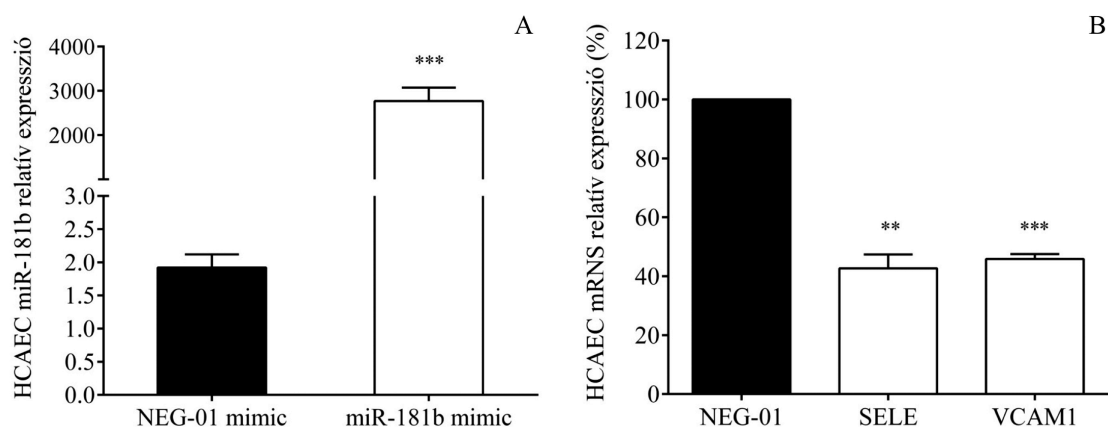
Ezt követően tanulmányoztuk, hogy a miR-155 és a miR-181b szintek változása a biogenezisük mely lépésénél szabályozódik, ezért meghatároztuk mindkét prekursor (pre- és pri-miRNS) mennyiségét a HCAEC sejtekben. Az érett miRNS mintázatokhoz hasonló változásokat tapasztaltunk a miR-155 és a miR-181b prekursor formáinál (31. ábra C-F). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy ezen miRNS-ek expressziója a transcriptiójuk szintjén szabályozódik, amit a TNF- α és everolimus regulálhat.



31. ábra. A HCAEC sejtek érett és prekursor miRNS-ek tartalma. A HCAEC sejteket TNF- α -val kezeltük 1-4 órán keresztül és RT-qPCR módszerrel meghatároztuk a SELE és VCAM1 mRNS-eket reguláló miR-181b és a gyulladás specifikus miR-155 érett és prekursor formáinak expresszióját. A citokin hatására a miR-155 szintje jelentősen megemelkedett a nem kezelt mintához képest (sötét oszlop), amit az everolimus szignifikánsan csökkenteni tudott (A). Ezzel szemben a miR-181b expressziója szignifikánsan csökkent 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) és 181b (D, F) expressziójában hasonló mértékű változást tapasztaltunk, mint az érett miRNS-ek esetében. Ezen miRNS-ek expresszióját mindezek alapján a TNF- α és az everolimus a transcriptiójuk szintjén szabályozhatja. Az eredmények átlagát és SEM értékeit ábrázoltuk, n=4-8/csoport.

5.3.6 A miR-181b posttranscriptiós szinten szabályozza a SELE és VCAM1 mRNS-ek expresszióját

A korábban megjelent HUVEC sejtekkel végzett kísérletek [120] mellett, meg kívántuk erősíteni a miR-181b és a SELE, valamint a VCAM1 mRNS-ek közötti összefüggést TNF- α stimulált HCAEC sejtekben is. Az endothelsejtek érett miR-181b szintjét specifikus miRNS mimic-et használva „mesterségesen” fokoztuk (32. ábra A), ami következtében a SELE (P=0,006) és a VCAM1 (P<0,001) mRNS-ek expressziója jelentősen lecsökkent a negatív kontrol mimic-kel (NEG-01) transzfektált mintához képest (32. ábra B). Ezen eredményeink alapján, az *in vitro* kísérletes modellünkben igazolni tudtuk a miR-181b SELE és VCAM1 mRNS-ek szabályozásában betöltött szerepét.



32. ábra. A miR-181b és a cél mRNS-ek (SELE és VCAM1) közötti direkt kapcsolat vizsgálata. A TNF- α -val 1 órán át „előkezelt” HCAEC sejtekbe miR-181b mimic-et (25 pmol) transzfektáltunk Lipofectamine reagenssel. Ezzel párhuzamosan negatív kontrollként a sejtekhez NEG-01 mimic-et (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.

5.3.7 Az extracelluláris miRNS szintek alakulása az endothelsejt aktivációban és az ISR kialakulásakor

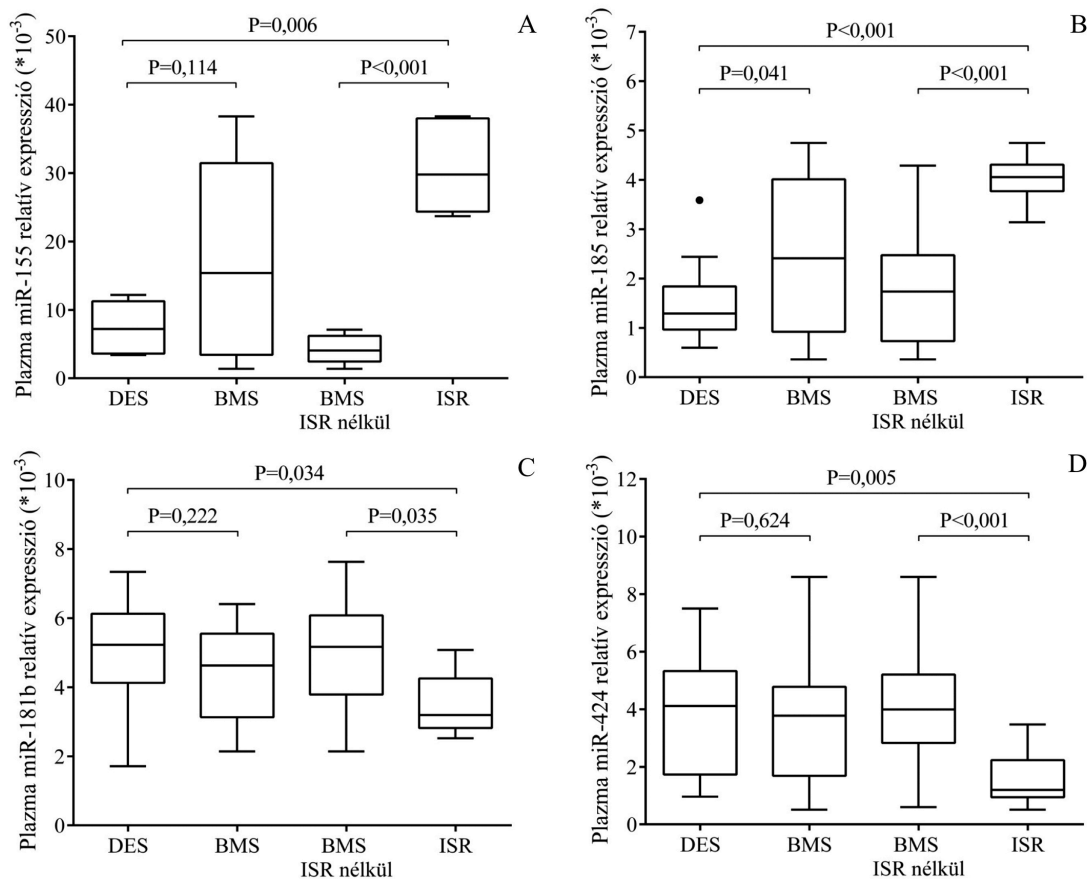
A keringő miRNS-ek profilját a sztent kezelés után 1 hónappal levett plazma mintákban vizsgáltuk meg, melyhez csoportonként random módon 3-3 RNS mintát választottunk ki. Az Open Array analízissel 66 miRNS-t detektáltunk a plazma mintákban. ISR-ben 17 miRNS expressziója nagyobb, mint másfélszeres mértékben (fold change $\geq 1,5$) csökkent (pl. miR-126, miR-223, miR-424), míg 19 másik miRNS

szintje ugyanilyen 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 (33. ábra). Adatbázisok és predikciós programok segítségével összegyűjtöttük a potenciális miRNS és cél mRNS kapcsolatokat (8. táblázat). Mivel a miR-181b specifikus assay nem szerepelt az Open Array lemezen, ezért ezt egy korábbi közlemény [120] és az *in vitro* kísérleteink eredményei alapján vontuk be vizsgálatainkba.

miRNS	Seed egyezés	TargetScan score percentilis	P _{CT}	Cél mRNS	Referencia
miR-181b-5p	8mer	89	<0,1	VCAM1	[120]
miR-181b-5p	7mer	54	<0,1	SELE	[120]
miR-424-5p	7mer	78	0,14	VWF	[138]

8. táblázat. Az endothelsejt aktivációban résztvevő potenciális miRNS és cél mRNS kapcsolatok. A miR-181b és miR-424 seed régiója 7-8 nukleotidos (7-8mer) egyezést mutat a VCAM1, SELE és VWF mRNS-ek 3' UTR kapcsolódási helyeivel. A TargetScan Score érték és a P_{CT} (probability of conserved targeting) [41] olyan mérőszámok, melyek a miRNS és a cél mRNS kapcsolat erősségéről adnak információt.

Az *ex vivo* plazma mintákban tapasztalt magasabb TNF- α koncentrációk mellett (23. ábra), a markánsan emelkedett keringő miR-155 (P<0,01) és miR-185 (P<0,001) expressziók is alátámasztják az ISR-ben kialakult vaszkuláris gyulladós folyamatokat, szemben a komplikáció nélküli BMS és DES csoportokkal (33. ábra A, B). 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 (33. ábra C). Ahogy az a 8. táblázatban is látszik, a miR-424 egy másik endothelsejt aktivációs marker, a vWF kifejeződését szabályozhatja [138]. Az Open Array analízissel kapott eredményeket validálni tudtuk a teljes betegcsoportban a miR-424 esetében is, miszerint a miRNS szintje jelentős mértékben lecsökkent (P<0,01) a komplikáció nélküli csoportokhoz képest (33. ábra D). ISR-ben a miR-126 (P=0,036) és miR-34a (P<0,001) expressziók nagyban csökkentek a DES-hez képest, azonban a vaszkuláris gyulladós folyamatokban betöltött funkciójukat már azonosították [119, 139], ezért mint „kontroll miRNS-ek” szolgálták a méréseink során. Ugyanakkor, a miR-223 csökkent szintjét nem tudtuk megerősíteni ISR-ben (ezekből az adatokból nem készült ábra).



33. ábra. Az extracelluláris miRNS-ek expressziója a BMS és a DES betegek plazma mintáiban. Az ISR-ben kialakult vaszkuláris gyulladási folyamatokat és endothelsejt diszfunkciót a markánsan emelkedett miR-155 (A) és miR-185 (B) expressziók is alátámasztják. A komplikáció nélküli BMS és DES csoportokhoz képest az E-selectin és VCAM-1 géneket szabályozó miR-181b szintje szignifikánsan kisebb volt ISR-ben (C). A miR-424 expressziója is jelentősen csökkent volt ISR-ben (D), ami hozzájárulhat az emelkedett vWF szintekhez. A medián (minimum – maximum) értékeket ábrázoltuk. (DES: n=21, BMS: n=28, BMS-ISR nélkül: n=22 és ISR: n=6).

Végül a két miRNS (miR-181b és miR-424) expresszióját korreláltattuk a plazma mintákban mért endothelsejt aktivációs markerek szintjével (9. táblázat).

Plazma fehérje koncentráció	Plazma miRNS expresszió	Pearson r	P érték
VCAM-1	miR-181b	-0,441	0,019
E-selectin	miR-181b	-0,375	0,049
vWF	miR-424	-0,647	0,009

9. táblázat. Az endothelsejt aktivációs markerek és a keringő miRNS-ek közötti korrelációk.

A hipotézisünknek megfelelően 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.

6. Megbeszélés

A cukorbetegség okozta gyulladáshoz és trombotikus komplikációk gyakori kialakulása, továbbá a koronária betegségek miatt szükségessé váló sztent beültetésekhez esetlegesen társuló klinikai szövődmények bekövetkezése miatt fontos megismernünk az eltérések háttérében álló kóros celluláris folyamatokat. Az elmúlt években egyre több ismeret gyűlt össze ezen intracelluláris történésekről nemcsak fehérjeszinten, de RNS szinten is, amelyek a kóros folyamatok szabályozásáért felelősek. A további részletek feltérképezése érdekében megvizsgáltuk a fokozott vérlemezke aktiválódást elősegítő thrombocytá és MK miRNS szint változásokat DM2-ben. Ezzel párhuzamosan analizáltuk a koronária sztent implantációt követően kialakult, endothelsejt aktivációval együtt járó ISR háttérében álló molekuláris mechanizmusokat, valamint az everolimus gyógyszer ezt jelentősen csökkentő hatását.

Az utóbbi években vált ismertté, hogy a vérlemezkek nagy számban és relatíve nagy mennyiségben miRNS-t és mRNS-t hordoznak [80, 83, 85]. Részben ebből is következik, hogy az extracelluláris (keringő) miRNS-ek főként az aktivált vérlemezkekből kerülnek ki a keringésbe [67, 129]. A miRNS-ek a gének egy jelentős részének a posttranscriptiós finomszabályozásában vesznek részt a cél mRNS-ek működésének gátlásán keresztül. Ez megtörténik intracellulárisan a saját sejtben, de a miRNS-ek más sejtekbe való átjutása, transzportálása révén más sejtek funkcióit is képesek befolyásolni [58]. Sokan sokáig kételkedve fogadták, hogy a sejttaggal nem rendelkező vérlemezkek a 8-12 napos átlag élettartamukkal hordozhatnak-e egyáltalán funkcionális RNS molekulákat, és ezáltal képesek lehetnek-e akár fehérjeszintézisre is különböző stimulusok hatására. Az elmúlt néhány évben számos közlemény jelent meg, amely bizonyította bizonyos vérlemezke mRNS-ek és azok működését reguláló miRNS-ek sejtaktivációt szabályozó szerepét olyan betegségekben is, melyben a thrombocyták fokozott aktivációs állapotba kerülnek, pl. DM2-ben vagy széptikus állapotban [140]. Patofiziológiai szerepük mellett a miRNS-ek új biomarkerek is lehetnek ezen betegségek vizsgálatában vagy azok differenciáldiagnosztikájában [140].

Jól ismert tény, hogy DM2-ben a vaszkuláris és trombotikus komplikációk igen nagy epidemiológiai jelentőséggel bírnak a fejlett országokban. A gyakran kialakuló és akár hosszan tartó hyperglycaemiás állapot miatt számos sejt működése megváltozik, így a csontvelőben a MK sejtéké és a keringésben a thrombocytáké is [74, 81, 141]. A

megváltozott metabolikus környezetben a vérlemezkék aktiváltsági állapota fokozódik, a keringésben nagyobb számban lesznek jelen ún. reaktív thrombocyták, melyek kisebb stimulus hatására könnyebben és akár nagyobb mértékben aktiválódhatnak. A DM2-ben és már obezításban is kimutatott vérlemezke aktivációt többek között emelkedett sejtfelszíni és szolubilis P-selectin expresszióval jellemezhetők [73, 78] növelve a szövődmények kialakulásának a kockázatát [142].

Az eddig megjelent közlemények többsége a keringő, szérumban vagy plazmában megmért miRNS-ek expressziójának változását vizsgálta DM2-ben és obezításban [99, 143, 144], viszont kevés információ áll rendelkezésre a humán MK és vérlemezke miRNS-ek szintjének és funkciójának változásáról ezekben a betegségekben. Előzetesen vizsgálták, hogy a reaktív thrombocytákban csökkent a miR-96 és emelkedett a VAMP8 cél mRNS és fehérje szintje, ami hozzájárult a vérlemezkék fokozott szekrécijához, mivel a VAMP8 protein a szekrécios folyamatok lezajlásában vesz részt [94]. Egy másik tanulmányban szoros összefüggést találtak a miR-223 és a P2Y12 ADP-receptor mRNS 3' UTR régiója között a vérlemezkékben és a MK sejtekben [80]. Ezek az eredmények felvetik a thrombocyta miRNS-ek szerepének fontosságát az adott vérlemezke fehérje vagy receptor működésének szabályozásában egészséges és kóros körülmények között is, azonban sok miRNS és cél mRNS funkciója még nem tisztázott.

Korábbi irodalmi adatok, valamint publikusan elérhető adatbázisok és predikciós programok (pl. www.mirbase.org) alapján olyan miRNS-ek analízisét végeztük el DM2-ben, amelyek a vérlemezke aktivációhoz kapcsolható fehérjék/receptorok expresszióját szabályozhatják [83-85]. Tudomásunk szerint korábban nem vizsgálták a P2Y12 és a P-selectin receptorok szabályozásában részt vevő vérlemezke miRNS-ek expresszióját DM2-ben. Ezért DM2-ben szenvedő betegek vérlemezke és plazma mintáiban kvantitáltuk az érett és a prekursor miR-223, miR-26b, miR-140 és miR-126 expressziókat, valamint a cél (P2RY12, SELP) mRNS szinteket. A hyperglycaemia hatását *in vitro* MK sejt kultúrákban is modelleztük, illetve tanulmányoztuk a miR-26b és a miR-140 direkt kapcsolatát a SELP mRNS-hez.

A vizsgálatainkban részt vevő obez DM2 betegek jelentős mértékű hyperglycaemia, hyperinsulinaemia és mérsékelt hypertrigliceridaemia volt jellemző. A korban és nemből megfelelő egészséges kontroll személyek mellett nem diabeteses, de obez egyéneket is bevontunk a tanulmányba, hogy kizárjuk a miRNS szinteket potenciálisan befolyásoló demográfiai paraméterek (pl. kor, nem, BMI). A thrombocyta

funkció gátló gyógyszerek alkalmazásában sem volt különbség a vizsgálati csoportok között, ami szintén kihathatott volna a miRNS szintekre [143, 145]. A vérlemezke aktiváció gátló gyógyszert (clopidogrel) szedő DM2 betegekben a miR-126 expressziója magasabb volt [146]. A mintavétel idején bár nem alakult ki egy betegben sem akut trombotikus esemény, mégis a felszíni P-selectin pozitivitás alapján fokozott vérlemezke aktivációt detektáltunk DM2-ben a kontroll csoportokhoz képest, ahogy azt munkacsoportunk már korábban is tapasztalta [73], és az emelkedett P-selectin értékek már obezitásban is megmutatkoztak az egészséges személyekhez viszonyítva [78]. Mind a vérlemezke, mind a plazma mintákban jelentősen magasabbnak találtuk DM2-ben az egészséges kontrollokhoz hasonlítva, ami arra utalhat, hogy a P-selectin-nek nemcsak fokozott szekréciója történik DM2-ben, hanem több fehérje is termelődhet a tartósan fennálló metabolikus stimulusok hatására. Mindez fokozhatja a heterotipikus aggregátumok kialakulását, a gyulladós és atherotrombotikus szövődmények bekövetkezésének a lehetőségét.

A fenti eredmények alapján célunk volt a DM2-hoz társult vérlemezke aktiváció szabályozásában szerepet játszó miRNS expressziók analízise. A miR-223 és a P2RY12 mRNS között már mások által leírt szoros kapcsolatot [80] figyelembe véve vizsgáltuk ennek a miRNS-nek az expresszióját. A miR-223 szintje a kontroll csoportokhoz képest lecsökkent a DM2 betegek vérlemezkéiben. Elgheznawy és munkatársai miR-223 deficiens egerekben a miR-223 egyéb funkcióit is igazolta, így a FXIII-A és kindlin-3 fehérjék kifejeződésének szabályozása [88]. A vérlemezke mintákban megmértük a miR-223 által szabályozott P2RY12 mRNS expresszióját, ami magasabb volt DM2-ben, mint az egészséges kontrollokban. A thrombocytá reaktivitásban fontos szereppel bíró P2Y12 receptor mediált útvonal és a fokozott receptor expresszió magas koleszterin koncentrációk és DM2-ben között szoros összefüggést találtak [77], valamint a csökkent P2RY12 mRNS és fehérje szintek megelőzték a trombotikus komplikációk kialakulását systemic lupus erythematosus-ban [147]. Továbbá, ez az ADP receptor jelentős mértékben befolyásolta a vérlemezkek érzékenységét DM2-ben [148, 149]. Összességében elmondható, hogy a DM2-ben megváltozott miR-223 expresszió a P2RY12 szabályozásán keresztül befolyásolhatja a vérlemezke aktivációt. A miR-223 mellett a miR-126 expresszióját is szignifikánsan kisebbnek találtuk DM2-ben a kontrollokhoz képest, ugyanakkor Stratz és munkatársai nem tapasztaltak hasonló változást DM2-ben [146].

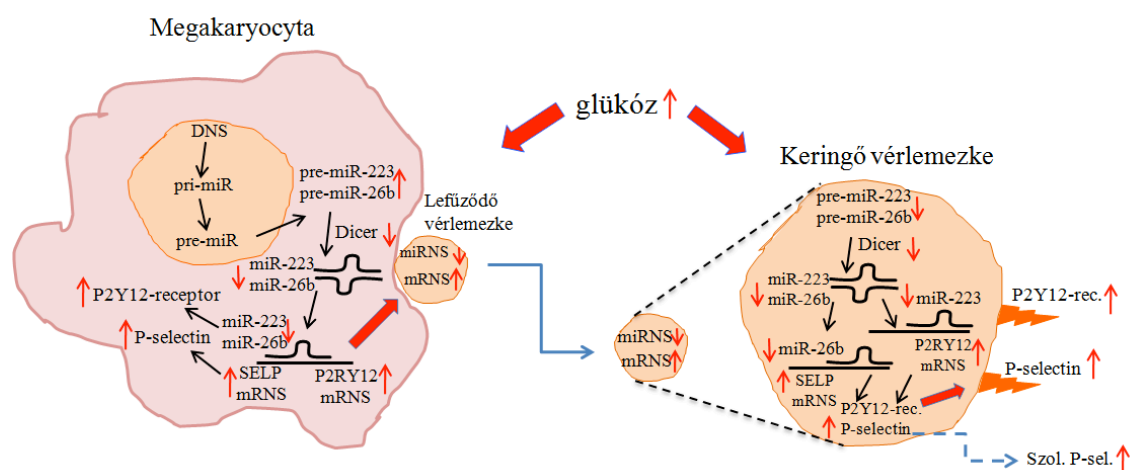
Az adatbázisok és predikciós programok alapján a miR-26b és miR-140 többek között a SELP mRNS-t (P-selectin) szabályozhatja, azonban eddig mindössze a miR-26b és az IL-6 expresszió kapcsolatát írták le [150]. A P-selectin amellet, hogy a vérlemezke aktiváció érzékeny biomarkere, fontos szerepet játszik a vérlemezke-fehérvérsejt interakciókban és ezáltal az angiopáthia kialakulásában 1-es és 2-es típusú diabetesben [151]. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a vérlemezkék miR-26b és miR-140 expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt DM2-ben az egészséges és az obese személyekhez viszonyítva. Ezzel ellentétben a SELP mRNS expressziója 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 MK sejtekben igazolni tudtuk. A mimic-ek hatására a miR-26b és a miR-140 fokozottan expresszálódott, míg a miRNS inhibitor-ok jelentősen gátolták ezen miRNS-ek szintjét. A miRNS szintek megváltoztatása után mértük külön-külön a SELP mRNS-re kifejtett hatásukat. A SELP mRNS mennyisége jelentős mértékben csökkent mindkét miRNS mimic hatására. Az anti-miR-26b és az anti-miR-140 pedig a SELP mRNS szignifikáns emelkedéséhez vezetett. A vérlemezkékben megtalálható több száz miRNS közül, azonban más miRNS-ek vagy hosszú nem kódoló RNS-ek is részt vehetnek a P-selectin szabályozásában.

A miR-223, miR-126, miR-26b és miR-140 szintje a plazma mintákban is jelentősen alacsonyabb volt az egészséges kontrollokhoz képest, mely összhangban van korábban megfigyelt eredményekkel DM2-ben [99, 100, 143]. Ezzel ellentétben nem találtunk szignifikáns különbséget sem a vérlemezke, sem a plazma mintákban a sejtciklus szabályozásában részt vevő CLOCK fehérje szabályozó egyik miRNS [84], a miR-107 expressziójában, ami arra utalhat, hogy a hyperglycaemia eltérő módon, nem egységesen befolyásolja az egyes miRNS-ek működését. A megváltozott miRNS és mRNS szintek bizonyos stimulusok hatására elősegíthetik a P2Y12 receptor és a P-selectin fokozott kifejeződését, ami abnormális vérlemezke aktiváció kialakulásához vezethet DM2-ben [149].

A thrombocyták csökkent miRNS tartalma arra utalhat, hogy már a MK sejtekből eleve kevesebb miRNS kerülhet a lefűződő vérlemezkékbe. Ennek érdekében diabeteses körülményeket modellezve, magas glükóz koncentráció mellett fenntartott MK sejtek (MEG-01, K562-MK) érett miRNS expresszióját vizsgáltuk rövid (8-24 óra) és hosszú távú (1-4 hét) kezelést követően. A hyperglycaemia hatására egy csökkenő tendenciát

láttunk a miRNS expressziókban mindkét MK sejtvonal esetében, ami 24 óra elteltével már szignifikáns eltérés volt és az 1-4 hetes kezelés végére ez a csökkenés még markánsabbá vált. A mannitol (ozmotikus) kezelés nem befolyásolta a miRNS expressziókat [100]. Eredményeink összhangban vannak egy korábbi feltételezéssel, miszerint a MK sejtek hyperglycaemia hatására abnormális vérlemezkékek produkálnak, melyek a megnövekedett sejt felszíni glikoprotein receptorok miatt könnyebben aktiválódhatnak a keringésben [141]. Ehhez hasonlóan, a hyperglycaemia a csontvelői stroma sejtek és endothelsejtek működését is befolyásolta, ami szintén vaszkuláris komplikációk kialakulásához járulhat hozzá DM2-ben [143, 152].

A glükózzal *in vitro* kezelt MEG-01 MK sejtekben a csökkent miRNS szintek a vérlemezkékhez hasonlóan emelkedett P2RY12 és SELP mRNS szintekkel járt együtt 24 óra elteltével. A megváltozott MK RNS szintek megalapozhatják az abnormális vérlemezke RNS tartalom és aktivációs állapot kialakulását DM2-ben (34. ábra). Mások a hyperglycaemia miRNS és mRNS szinteket befolyásoló hatását endothelsejtekben vizsgálták. A csökkent miR-24 szint emelkedett vWF expresszióhoz és szekréciónak vezetett [153]. Összességében elmondhatjuk, hogy ezen kísérleti modellünkben a magas glükóz koncentrációval befolyásolni tudtuk a MK sejtek miRNS-ek szintjét (34. ábra), azonban a pontos molekuláris mechanizmus felderítéséhez további vizsgálatok szükségesek.



34. ábra. A magas glükóz koncentráció az RNS expressziókra direkt módon kifejtett celluláris hatásai MK sejtekben és thrombocytákban. A tartósan fennálló hyperglycaemia képes a MK sejtekben csökkent Dicer aktivitást okozni, ami alacsonyabb érett miRNS expresszióval és ezáltal emelkedett cél mRNS szinttel jár együtt. Így eredendően is megváltozott RNS tartalmú thrombocyták képződnek a csontvelőben. A glükóz közvetlenül a thrombocyták működésére is hatással lehet, ahol hasonló RNS változásokat idéz elő, ami fokozott P2Y12 receptor és P-selectin fehérje expresszióhoz vezet. Rövidítések: miRNS: mikroRNS, mRNS: messenger RNS, Pre-miR: prekursor miRNS, pri-miR: elsődleges miRNS, szol. P-sel: szolubilis P-selectin.

A DM2-ben tapasztalt csökkent miRNS expressziók hátterében a kisebb pre-miRNS szintek mellett az alacsonyabb Dicer aktivitás is állhat [88] (34. ábra). A Dicer működését jelentősen befolyásolják a calpainok, ezért, ha calpeptinnel gátoltuk, megvédtük a Dicer enzim funkcióját. A hyperglycaemiás MK sejtekhez adott calpeptin korrigálta a glükóz által lecsökkentett Dicer aktivitást, ami javította a thrombocyta miR-223 és miR-26b expressziókat. A calpain inhibitor DM2-ben korrigálta a megváltozott miRNS szinteket és az ezzel összefüggésben kialakult fokozott vérlemezke aktivációt [154].

A PhD dolgozatban a BMS és a DES koronária sztentek sejtaktiváló hatásának összehasonlítását is elvégeztük stabil anginás betegekben, valamint *in vitro* körülmények között vizsgáltuk az endothelsejt aktivációt szabályozó bizonyos transcriptiós és posttranscriptiós folyamatokat az everolimus gátló hatásán keresztül.

Az elmúlt években számos mTOR inhibitor, illetve más gyógyszert kibocsátó DES kifejlesztése történt, melyek rutinszerű alkalmazása során egyre több tanulmány kezdett foglalkozni ezek klinikai összehasonlításával, a beültetést követően potenciálisan kialakuló komplikációk (ISR, trombózis) kimutatásával, illetve a betegek túlélésének kiértékelésével [155-166]. A hagyományos BMS és az első generációs everolimust kibocsátó DES összevetésével [109] párhuzamosan intenzíven foglalkoztak a sirolimust eluáló DES implantáció mutatóival is, ahol az 1. évben a betegek jelentősen jobb esemény-mentes túlélési arányt mutattak, kevesebb ISR vagy revaszkularizáció miatti beavatkozással, mint a BMS-t kapott személyek [105, 156]. Az EXCELLENT-study az everolimus és a sirolimus hatását vette össze DES-t követően és kisebb revaszkularizációs arányt írtak le az everolimus hatása mellett [157]. Egyaránt megbízható beavatkozásnak véleményezték a sirolimus egyéb analógját, a zotarolimust kibocsátó DES-t egy 5 éves követési időszakot felölelő összehasonlító vizsgálat-sorozatban [158]. A zotarolimust és az everolimust egyben eluáló DES, illetve egy másik mTOR inhibitor analógot (biolimus) kibocsátó sztent dyslipidémiás AMI-ben szenvedő betegekben egyformán jó eredményeket mutattak [159]. Külön vizsgálták a DM2 befolyásoló hatását a DES, illetve bypass műtétek kapcsán (COMPARE-study) [160], továbbá a különböző DES-ek felhasználásával elvégzett implantációkat követően (ESSENCE-DIABETES-study) [161]. A DM2 jelenlétének nem volt számottevő hatása a koronária betegség kimenetére egyik vizsgálatban sem, a két DES hasonló arányban járt ISR-sel a kezelést követően 8 hónappal [161, 161]. Az mTOR inhibitoros vs. egyéb

(citotoxikus) gyógyszeres DES összehasonlító vizsgálatok nem egységes eredményeket mutattak. A 3 éves SPIRIT-tanulmány az everolimust kibocsátó sztentet jobbnak mutatta ki a mortalitás és sztenttrombózis tekintetében, mint a paclitaxellel bevont sztentet [162]. Ugyanakkor egy 10 éves követéses periódus után a kardiális történések százalékos arányai nem tértek el az sirolimust vs. paclitaxelt eluáló sztentek között [163]. A koronária sztentek mellett előtérbe kerültek a gyógyszert kibocsátó ballonok, pl. paclitaxeles ballon, ami nemcsak ISR kezelésére, hanem akár *de novo* léziók kezelésére is ajánlanak. Ez a típusú ballon DM2 betegekben nem mutatott különbséget a komplikációkban (minimális lumen átmérő, reinfarktus arány) szemben az everolimust eluáló DES-sel [164], és hasonló klinikai kimenetet találtak a 2. generációs sirolimus sztent és közte [165]. Polimer nélküli, umirolimust eluáló sztentek is elérhetők olyan betegeknek, akikben nagyobb eséllyel alakulhat vérzéses szövődmény, és 1 hónapot követően hatékonyabbnak bizonyultak a hagyományos BMS-sel szemben [166].

A DES és BMS különböző típusainak hatékonyságát bár klinikai tanulmányokban vizsgálták [106-109, 155-166], kevés információ áll rendelkezésre a kétféle sztent különböző sejttípusok aktivációját érintő direkt hatásáról.

Ebben a tanulmányban 28 BMS és 21 DES kezelésben részesült stabil anginás betegektől származó vérmintákban hasonlítottuk össze a vérlemezke, a fehérvérsejt és endothelsejt aktivációs markereket. A betegektől egységesen három időpontban gyűjtöttünk mintákat: i) a beavatkozás előtt, ii) a sztent kezelés után 24 órával és iii) 1 hónappal az implantációt követően. A betegek azonos típusú BMS sztentet vagy everolimust eluáló sztentet kaptak, és a két csoport korban és nemben megfelelő volt, nem volt különbség a dohányzásban és a társbetegségek (DM2, hyperkoleszterinaemia) arányában, amelyek befolyásolhatták volna a sejtaktivációk mértékét [167].

A sztentek beültetését követő hemosztázis eltérések monitorozására a D-dimer és a FM koncentrációkat értékeltük. Amíg a D-dimer és a fibrinogén szintekben nem voltak különbségek, addig az FM - különösen az alacsonyabb kiindulási értékekhez képest - jelentősen emelkedett a beavatkozást követően, amely inkább a koronária érszakasz átmeneti sérülésének köszönhető, nem pedig a fokozott véralvadási folyamatnak [168]. A véralvadási kaszkád általában nem aktiválódik a sztentelés után, a D-dimer, szöveti faktor, F1+2 és FVII aktivitásban a ballonos koronária tágítás során tapasztaltak átmeneti emelkedést [169]. A beavatkozást követően a betegeket fél éven keresztül követtük, amely során nem tapasztaltunk sztenttrombózist, azonban 6 BMS

betegünknel (21,4 %) ISR alakult ki. Egy korábbi tanulmányban a komplikáció kialakulásának aránya (20,1%) nagyon hasonló volt a BMS betegeknel [170], viszont a DES csoportban nem volt komplikáció.

A vérlemezke aktiváció mértékét a felszíni P-selectin áramlási citometriai, valamint a plazma minták szolubilis P-selectin, CD40L és PDGF-BB koncentrációk mérésével analizáltuk a sztent kezelés előtt és után. Két korábbi tanulmányhoz hasonlóan mindkét sztent típus alkalmazása mellett – a posztimplantációs vérlemezke gátló kezelés ellenére is - emelkedett vérlemezke aktivációt figyeltünk meg, ahol magasabb P-selectin expressziót [171] és megnövelt thrombocyta-eredetű mikropartikula szinteket detektáltak [172]. A szolubilis P-selectin koncentrációk fokozatosan emelkedtek a keringésben a vizsgálati időszak alatt különösen a BMS csoportban, ahol a beavatkozás után 1 hónappal szignifikánsan magasabb értékeket mértünk a kezelés előtti értékekhez képest. Ezzel ellentétben mások nem találtak különbséget a szolubilis P-selectin szintekben vagy inkább csökkentek a beavatkozást követő 24 órában [173, 174], mint amit a felszíni P-selectin pozitivásban találtunk.

Az endothelsejt aktivációs markereket megjelenésük alapján két csoportba lehet sorolni: I. típusba tartoznak a korai vagy azonnali markerek (pl. vWF), amiket már korábban szintetizált az endothelsejt és stimulus hatására rövid időn belül szekretálja azokat. A II. csoportot a sejtaktivációt követően szintetizálódó fehérjék (pl. VCAM-1, E-selectin, ICAM-1, stb.) alkotják [131]. Előző közleményekben emelkedett vWF szinteket mértek BMS kezelés után 24-96 óra elteltével [111, 175]. A sztent kezelés 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 szolubilis VCAM-1 receptorszint jól korrelál a TNF- α koncentrációval és az általa indukált endothelsejt aktivációval [176]. A BMS csoportban a sztent kezelés után vett plazma mintákban mi is szignifikánsan magasabb szolubilis VCAM-1 koncentrációkat mértünk szemben a DES csoporttal. Hasonló eredményekről számoltak be a BMS kezelést követően 3 nappal [174], valamint ISR kialakulása után is [112].

Továbbá az ISR szignifikánsan magasabb szolubilis ICAM-1 és CD40L koncentrációk jelenlétében következett be, jelezve a nagyobb mértékű celluláris aktivációt. Ehhez hasonlóan a két endothelsejt aktivációs marker, az E-selectin és a VCAM-1 szintek is emelkedetebbek voltak ISR-ben a DES csoporthoz képest. A vaszkuláris sérülést követően aktiválódott vérlemezkékből nagyobb mennyiségű PDGF-

BB került ki a keringésbe, ami a simaizomsejtek proliferációját okozhatta fokozva az ISR kialakulás valószínűségét [130]. Az irodalomban ellentmondásos adatok találhatóak, mások az intervenció után nem figyeltek meg PDGF emelkedést [177], vagy nem találtak különbséget a BMS és a DES csoport között [178]. Végül a magas TNF- α szint az ISR kialakulása során lejátszódo gyulladáso folyamatokat jelezhetette [112].

A BMS és a DES implantáció eltérő mértékben befolyásolták a thrombocytá és endothelsejt aktivációt, ami a sztentről eluálodo gyógyszernek volt köszönhető. A BMS betegek egy részénél kialakult ISR viszont magasabb E-selectin és VCAM-1 plazma szintekkel járt együtt, azonban ezen gének expressziójának transcriptiós és posttranscriptiós szabályozásáról, valamint az everolimus sejtaktivációt csökkentő hatásáról kevés információ áll rendelkezésre. A vaszkuláris gyulladáso folyamatokat Palmieri és munkatársaihoz hasonlóan [179] TNF- α aktivációval modelleztük koronária (artériás) és vénás endothelsejteken everolimus jelenlétében és hiányában. A HCAEC alkalmas sejt kultúrának bizonyult az artériás endothelsejtek vizsgálatára [180], míg a széles körben használt HUVEC sejtekben [181, 182] pedig megerősítettük eredményeinket.

A SELE és a VCAM-1 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 IL-1 β és IL-6 mRNS-ek expresszióján keresztül is analizáltuk. A HCAEC sejtekben TNF- α -val kiváltott általános gyulladáso folyamatokat az emelkedett IL-1 β és IL-6 mRNS szintek igazolták. Az endothelsejtek gyulladáso folyamatait az everolimus már 1 óra alatt szignifikánsan redukálta, ami 4 órát követően még kifejezőbbé vált.

Az NF- κ B útvonal aktivációja során a p65 transzkriptiós faktor a citoplazmából bejut a sejtmagba, ahol gyulladáso gének transcriptióját serkenti, ezért a p65 magtranszlokációjának detektálásával következtetni lehet a gyulladáso válaszreakció

bekövetkeztére [128]. Ezért megvizsgáltuk, hogy az everolimus hatása a korai p65 transzlokáció gátlásán keresztül megy-e végbe. A HCAEC sejteket rekombináns TNF- α -val kezeltünk 1 órán keresztül everolimus vagy DMSO jelenlétében. Fluoreszcens mikroszkóppal a p65 festődés intenzitását analizáltuk a sejtek citoplazmájában és a sejtmagban. A nem kezelt sejtekhez képest a TNF- α hatására a p65 a citoplazmából bekerült a sejtmagba, amit az everolimus jelentős mértékben megakadályozott, míg a DMSO ezt nem befolyásolta. Ezekkel a kísérletekkel igazolni tudtuk, hogy az everolimus képes az NF- κ B útvonalat gátolni.

Az E-selectin és VCAM-1 expressziók transcriptiós szabályozásában részt vevő gyulladáshoz kapcsolódó jelátviteli folyamatokat eddig LPS-el kezelt endothelsejtben vizsgálták [132]. A fenti eredmények alapján feltételeztük, hogy az everolimus a gének közelében található aktív enhancerek represszálásán keresztül képes csökkenteni a TNF- α hatására megemelkedett SELE és VCAM1 mRNS szinteket. A SELE és VCAM1 közelében lévő TNF- α indukált aktív enhancer régiókat a publikus Chip-szekvenálási adatok [122, 123] újraelemzésével azonosítottuk. HUVEC sejtekben az RNS polimeráz II és p65 TF jelenlétében és az aktív gén promoter marker (H3K27Ac) alapján a TNF- α kezelés hatására aktív transcriptió zajlott a SELE és VCAM1 gének esetében. Emellett az aktív enhancer jelölő (H3K4m3) segítségével mindkét gén közelében két p65 és RNS polimeráz II-vel kapcsolt enhancer régiót azonosítottunk.

A közelmúltban megjelent közleményekben bemutatták, hogy az enhancer aktivitásra jól lehet következtetni az eRNS expresszió változásának mérésével [123, 133-136]. Ebből adódóan egy-egy kiválasztott eRNS expresszióját határoztuk meg mindkét gén esetén. Megerősítettük, hogy a TNF- α stimulus hatására a SELE_{-11Kb} és VCAM1_{-10Kb} eRNS-ek expressziója fokozódik, amit az everolimus csökkentett a HCAEC sejtekben. Mindezek alapján azt gondoljuk, hogy az everolimus a p65 TF kapcsolt eRNS-ek represszálásán keresztül gátolni tudta a TNF- α indukálta SELE és VCAM1 gének fokozott transcriptióját, ezáltal mérsékelve az endothelsejt aktivációt.

Az E-selectin és VCAM-1 gének posttranscriptiós szabályozása miRNS-ek által is történhet [120], mint ahogy azt HUVEC sejtekben már korábban vizsgálták. Jelen vizsgálatunkban a miR-181b szerepét *in vitro* analizáltuk TNF- α stimulált endothelsejt kultúrákban (HCAEC és HUVEC), valamint megvizsgáltuk az everolimus lehetséges befolyásoló szerepét is. A TNF- α -val kiváltott sejtaktivációs folyamatokat a gyulladáshoz specifikus miRNS-ek expresszió változásán keresztül követtük [133]. Az irodalmi

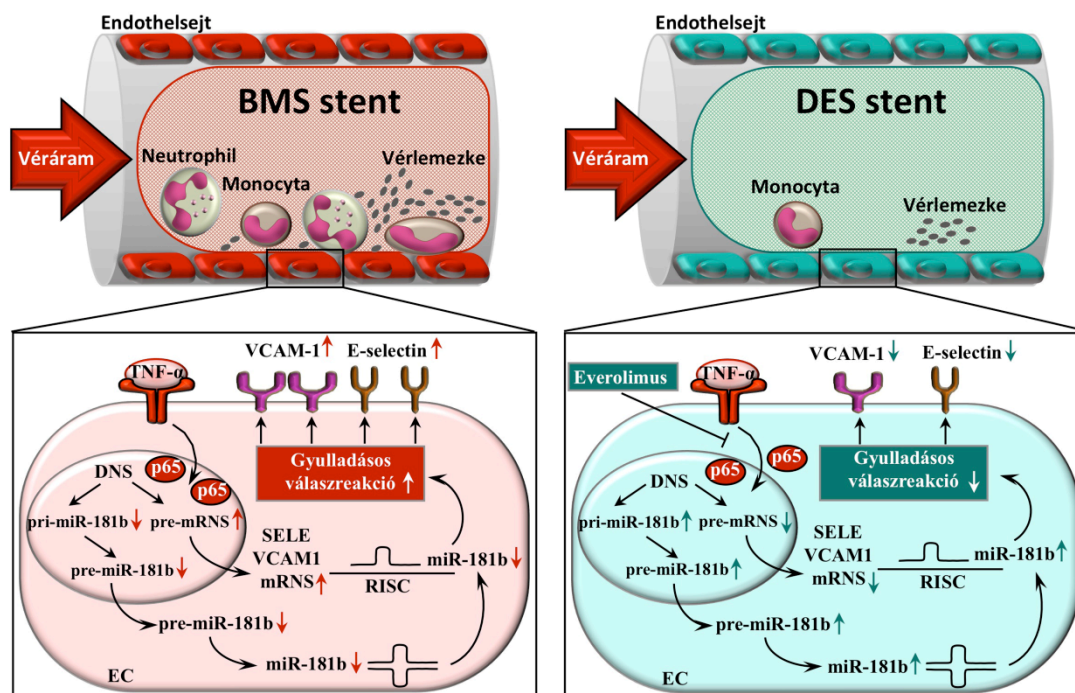
adatokkal egyezően a miR-155, miR-146a és miR-185 szint jelentősen megemelkedett a nem kezelt mintákhoz képest mindkét sejttípusban, ami az IL-1 β és IL-6 mRNS-hez hasonlóan jelezte a TNF- α által kiváltott gyulladós válaszreakciót és egyben a bekövetkező endothelsejt diszfunkciót [136, 137]. Ugyanakkor ezen miRNS-ek fokozott expressziója az everolimus jelenlétében nem következett be.

Kiemelendő, hogy a miR-181b expressziója lényegesen lecsökkent a TNF- α stimulus hatására, ami a hozzájárulhat a SELE és VCAM1 mRNS szintek további emelkedéséhez. A gyulladós citokinnel egy időben alkalmazott everolimus viszont mérsékelte a miR-181b expressziójának csökkenését, ezáltal csökkentve a cél mRNS-ek fokozott kifejeződését. A TNF- α -val kezelt mintákhoz képest mind a HCAEC, mind a HUVEC sejtekben szignifikánsan magasabb miR-181b szinteket detektáltunk.

A korábban megjelent HUVEC sejtekkel végzett kísérletek [120] mellett meg kívántuk erősíteni a miR-181b és a SELE, valamint a VCAM1 mRNS-ek közötti direkt összefüggést a TNF- α stimulált HCAEC sejtekben. Az endothelsejtek érett miR-181b szintjét specifikus miRNS mimic-kel jelentősen fokoztuk, ami következtében a SELE és VCAM1 mRNS-ek expressziója jelentősen lecsökkent a negatív kontrollal (NEG-01) transzfektált mintához képest. Ezen eredményeink alapján az *in vitro* kísérletes modellünkben igazolni tudtuk a miR-181b SELE és VCAM1 mRNS-ek szabályozásában betöltött szerepét (35. ábra).

Az ISR kialakulásának hátterében a keringő miRNS-ek mennyiségének alakulását 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 gyulladós folyamatokat, szemben a komplikáció nélküli BMS és DES csoportokkal. Az E-selectin és VCAM-1 expressziókat szabályozó miR-181b szintje szignifikánsan kisebb volt ISR-ben a BMS és DES csoportokhoz képest. A miR-424 egy másik endothelsejt aktivációs marker a vWF expresszióját szabályozhatja [138]. Az Open Array analízissel kapott eredmények alapján a teljes betegcsoportban a miR-424 szintje is jelentős mértékben lecsökkent a komplikáció nélküli csoportokhoz képest. ISR-ben a miR-126 és miR-34 expressziók szintén csökkentek a DES-hez képest. A vaszkuláris gyulladós folyamatokban betöltött funkciójukat már mások azonosították [119, 139], ezért mint „kontroll miRNS-ek” szolgáltak a méréseink során. Vaszkuláris

endothelsejteken a miR-223 gátolta a szöveti faktor expresszióját [183], ugyanakkor a miR-223 csökkent szintjét ISR-ben nem tudtuk megerősíteni a teljes kohorszban.



35. ábra. A BMS és a DES implantáció eltérő hatásának következményei és a vizsgált molekuláris mechanizmusa. A BMS vaszkuláris gyulladást idézhet elő a beavatkozás területén, ami fokozott thrombocytá, fehérvérsejt és endothelsejt aktivációval járhat. Ezzel szemben a DES gyógyszert bocsát ki az érintett érszakaszban, pl. everolimust, ami képes az endothelsejtek aktivációs folyamatait több ponton is befolyásolni. Hatására csökken a p65 magtranszlokáció, vagyis az NF-κB út vonal aktivációja, nő a miR-181b szintje, ezáltal csökken a SELE és VCAM1 mRNS expresszió. Mindez kevesebb fehérje termelődéséhez, kisebb felszíni expresszióhoz vezet csökkentve a celluláris interakciók kialakulásának a valószínűségét. Rövidítések: BMS: bare metal stent, DES: drug eluting stent, EC: endothelsejt, mRNS: messenger RNS, TNF-α: tumor necrosis factor-α, RISC: RNA-induced silencing complex.

Végül két miRNS (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 (35. ábra).

A koronáriabetegség kezelésére használt sztentbeültetés vaszkuláris komplikációk kialakulását okozhatják, ami hatékony „lokális” gyógyszer szint fenntartásával jelentős mértékben kivédhető a másik modellünk eredményei alapján, pl. mTOR-inhibitorok segítségével. Ugyanakkor a DES-ről eluálódó eltérő hatásmechanizmussal bíró más gyógyszerek (pl. paclitaxel) endothelsejt funkciót befolyásoló hatásának feltérképezése további méréseket kíván.

7. Összefoglalás

A miRNS-ek jelentős szerepet játszanak számos betegség patomechanizmusában a gének expressziójának szabályozásán keresztül. A vérlemezkék és az endothelsejtek abnormális metabolikus és gyulladási környezetben aktiválódhatnak, ami trombotikus és vaszkuláris szövődmények kialakulásához vezethet. A kísérletes munkánk célja vérlemezke és endothelsejt eredetű miRNS-ek analízise volt fokozott sejtaktivációval járó metabolikus és kardiovaszkuláris betegségben.

Csökkent Dicer és pre-miRNS szintek miatt alacsonyabb vérlemezke és keringő miR-223, miR-26b és miR-140 expressziókat detektáltunk DM2-ben az obesez egyénekhez és az egészséges kontrollokhoz képest. A hyperglycaemia hatására a MEG-01 és az érett K562 MK sejtek miRNS tartalma is jelentősen csökkent *in vitro*. Az alacsony miR-26b és miR-140 emelkedett P-selectin (SELP) mRNS és fehérje szinteket eredményezett, míg a csökkent miR-223 a magasabb P2RY12 mRNS expresszióval mutatott összefüggést mind a vérlemezkékben, mind a MK sejtekben. A miR-26b, miR-140 és SELP mRNS közötti kapcsolatot miRNS mimic-ek és inhibitor-ok segítségével igazolni tudtuk MEG-01 sejtekben.

A koronária fémsztentek és a gyógyszer eluáló koronária sztentek eltérő mértékben befolyásolták a thrombocytá és endothelsejt aktivációt. Az emelkedettebb szolubilis P-selectin, VCAM-1 és vWF plazma szinteket okozó BMS használata mellett 28 betegből 6 esetben korai ISR alakult ki szemben a DES csoporttal. Emellett az ISR jóval magasabb szolubilis E-selectin és VCAM-1 koncentrációk jelenlétében következett be, jelezve a nagyobb mértékű endothelsejt aktivációt.

Az everolimus az NF- κ B útvonal p65 magtranszlokáció gátlásán és az enhancer RNS-ek represszáálásán keresztül csökkentette a TNF- α indukálta SELE és VCAM1 mRNS és fehérje expressziókat. Az E-selectin és VCAM-1 szintek posttranscriptiós szabályozásában a miR-181b fontos szerepet játszik. Az *ex vivo* plazma mintákban a csökkent miR-181b és miR-424 szoros korrelációt mutatott az ISR-ben emelkedett szolubilis E-selectin, VCAM-1 és vWF koncentrációkkal.

A különböző betegségekben kialakuló szövődmények hátterében számos kóros molekuláris folyamat állhat, amelyek feltérképezése elősegítheti ezen komplikációk jobb kezelhetőségét és könnyebb megelőzését.

7. Summary

MicroRNAs have been described as novel posttranscriptional fine regulators of gene expression in the pathomechanism of various diseases. Platelets and endothelial cells can become activated under abnormal metabolic or inflammatory conditions increasing the risk of thrombotic and vascular complications. In this thesis, our aim was to investigate platelet and endothelial cell miRNAs in metabolic and cardiovascular disorders associated with enhanced cell activation.

Due to decreased levels of Dicer and pre-miRNAs, we detected lower platelet and circulating miR-223, miR-26b és miR-140 expression in DM2 in contrast to obese and normal controls. In response to hyperglycemia, the miRNA levels were decreased in both MEG-01 and matured K562 MK cells among *in vitro* conditions. Lowered miR-26b and miR-140 levels were related to elevated P-selectin (SELP) mRNA and protein levels, while decreased miR-223 was associated with higher P2RY12 mRNA expression in platelets and megakaryocytes. The direct link between miR-26b, miR-140 and SELP mRNA was proved by using miRNA mimic and inhibitor in MEG-01 cells.

Coronary bare metal stent (BMS) and drug eluting stent (DES) induced platelet and endothelial cell activation at different extent. By the application of BMS causing higher soluble P-selectin, VCAM-1 and vWF plasma levels, there were 6 cases who suffered from early is-stent restenosis (ISR) out of 28 patients vs. DES cohort. In addition, ISR was associated with higher soluble E-selectin and VCAM-1 concentrations indicating the larger degree of endothelial cell activation.

Everolimus could depress TNF- α induced SELE and VCAM1 mRNA and protein levels via inhibition of p65 nuclues translocation of NF- κ B pathway and expression of enhancer RNAs. MiR-181b has an important role in the posttranscriptional regulation of E-selectin and VCAM-1 gene expression. In the *ex vivo* plasma samples decreased miR-181b and miR-424 showed a strong correlation with soluble E-selectin, VCAM-1 and vWF levels elevated in ISR.

In summary, there may be a number of impaired molecular events in the development of clinical complications of different diseases, which need to be explored to promote more sufficient treatment and prevention.

8. Az értekezés új tudományos eredményei, a jelölt saját megállapításai

1. DM2-ben alacsonyabb vérlemezke és keringő miR-223, miR-26b és miR-140 expressziók detektálhatók, melyek háttérében a csökkent Dicer funkció és alacsonyabb pre-miRNS szintek állnak.
2. A MEG-01 és a K562 MK sejtek miRNS tartalma is jelentősen csökkent a hyperglycaemia hatására *in vitro* körülmények között.
3. A csökkent miR-26b és miR-140 emelkedett P-selectin (SELP) mRNS és fehérje szintet eredményezett, míg az alacsonyabb miR-223 magasabb P2RY12 mRNS expresszióval mutatott összefüggést a vérlemezkékben és a MK sejtekben.
4. A miR-26b, miR-140 és SELP mRNS közötti direkt kapcsolatot miRNS mimic és inhibitor használatával igazoltuk MEG-01 sejtekben.
5. A koronária fémsztentek (BMS) és a gyógyszert eluáló sztentek (DES) eltérő mértékben befolyásolják a thrombocytá és endothelsejt aktiváció mértékét.
6. A BMS használata mellett gyakrabban kialakult korai in-stent restenosis (ISR) magasabb szolubilis E-selectin, VCAM-1 és vWF plazma koncentrációk jelenlétében következett be, jelezvén a nagyobb mértékű endothelsejt aktivációt.
7. Az everolimus az NF- κ B útvonal p65 magtranszlokáció gátlásán és az enhancer RNS-ek represszáálásán keresztül csökkentette a TNF- α indukálta SELE és VCAM1 mRNS és fehérje expressziókat, ezáltal az endothelsejt aktiváció mértékét HCAEC sejtekben.
8. Az E-selectin és VCAM-1 szintek posttranscriptiós szabályozásában a miR-181b fontos szerepet játszik. A pre- és pri-miR-181b változások alapján az érett miR-181b mennyiségét a TNF- α és az everolimus a transcriptiós szinten is szabályozhatja a HCAEC sejtekben.
9. A koronária sztentelt betegek *ex vivo* plazma mintáiban a csökkent miR-181b és miR-424 szoros korrelációt mutatott az ISR-ben megemelkedett szolubilis E-selectin, VCAM-1 és von Willebrand faktor szintekkel.

9. Irodalomjegyzék és publikációs lista

9.1 Irodalomjegyzék

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116: 281-297.
- [2] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391: 806-811.
- [3] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development*. 2001; 15: 188-200.
- [4] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001; 411: 494-498.
- [5] Tóth G, Schlammadinger J, Aradi J, Antal-Szalmás P, Sipka S, Balázs M, Kovács P, Fehér Z, Falus A. A DNA uptake-stimulating protein increases the antiproliferative effect of c-myb antisense oligonucleotide on leukemic cells. *Cell Biol Int*. 2004; 28: 817-823.
- [6] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75: 843-854.
- [7] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000; 403: 901-906.
- [8] Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000; 408: 86-89.
- [9] Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature". *Nucleic Acids Research*. 2006; 34 (Database issue): D140–144.

- [10] Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Research*. 2004; 14: 1902-1910.
- [11] Oszolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, Zhang X, Song JS, Fisher DE. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & Development*. 2008; 22: 3172-3183.
- [12] Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004; 10: 1957-1966.
- [13] Møller HG, Rasmussen AP, Andersen HH, Johnsen KB, Henriksen M, Duroux M. A systematic review of microRNA in glioblastoma multiforme: micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion. *Mol Neurobiol*. 2013; 47: 131-44.
- [14] Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009; 11: 228-234.
- [15] Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN. Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell*. 2006; 125: 887-901.
- [16] Lau PW, Guiley KZ, De N, Potter CS, Carragher B, MacRae IJ. The molecular architecture of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol*. 2012; 19: 436-440.
- [17] Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC. Mammalian Mirtron Genes. *Molecular Cell*. 2007; 28: 328-336.
- [18] Yang JS, Lai EC. Alternative miRNA Biogenesis Pathways and the Interpretation of Core miRNA Pathway Mutants. *Molecular Cell*. 2011; 43: 892-903.
- [19] Cifuentes D, Xue H, Taylor DW, Patnode H, Mishima Y, Cheloufi S, Ma E, Mane S, Hannon GJ, Lawson ND, Wolfe SA, Giraldez AJ. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science*. 2010; 328: 1694-1698.
- [20] Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*. 2010; 465: 584-589.

- [21] Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*. 2004; 15: 185-197.
- [22] Elkayam E, Kuhn CD, Tocilj A, Haase AD, Greene EM, Hannon GJ, Joshua-Tor L. The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a. *Cell*. 2012; 150: 100-110.
- [23] Schirle NT, MacRae IJ. The crystal structure of human Argonaute2. *Science*. 2012; 336: 1037-1040.
- [24] Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S, Suzuki T, Tomari Y. Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Molecular Cell*. 2010; 39: 292-299.
- [25] Kwak PB, Tomari Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol*. 2012; 19: 145-151.
- [26] Noland CL, Ma E, Doudna JA. siRNA repositioning for guide strand selection by human Dicer complexes. *Mol Cell*. 2011; 43: 110-121.
- [27] Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Research*. 2007; 35: 5944-5953.
- [28] Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*. 2005; 434: 666-670.
- [29] Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003; 115: 787-798.
- [30] Grimson A, Farh KKH, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Molecular Cell*. 2007; 27: 91-105.
- [31] Olsen PH, Ambros V. The lin-4 Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation. *Developmental Biology*. 1999; 216: 671-680.

- [32] Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W. Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells. *Science*. 2005; 309: 1573-1576.
- [33] Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem*. 2010; 79: 351-379.
- [34] Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & Development*. 2006; 20: 1885-1898.
- [35] Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel, DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 2008; 455: 64-71.
- [36] Selbach M, Schwanhausser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 2008; 455: 58-63.
- [37] Djuranovic S, Nahvi A, Green R. miRNA-Mediated Gene Silencing by Translational Repression Followed by mRNA Deadenylation and Decay. *Science*. 2012; 336, 237-240.
- [38] Bazzini AA, Lee MT, Giraldez AJ. Ribosome Profiling Shows That miR-430 Reduces Translation Before Causing mRNA Decay in Zebrafish. *Science*. 2012; 336: 233-237.
- [39] Vasudevan S, Steitz JA. AU-Rich-Element-Mediated Upregulation of Translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*. 2007; 128: 1105-1118.
- [40] Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. *Molecular Cell*. 2008; 30: 460-471.
- [41] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009; 19: 92-105.
- [42] Blakaj A, Lin H. Piecing Together the Mosaic of Early Mammalian Development through MicroRNAs. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283: 9505-9508.
- [43] Melton C, Judson RL, Billelloch R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature*. 2010; 463: 621-626.

- [44] Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C, Bozzoni I A. Minicircuitry Comprised of MicroRNA-223 and Transcription Factors NFI-A and C/EBP α Regulates Human Granulopoiesis. *Cell*. 2005; 123: 819-831.
- [45] Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. 2004; 303: 83-86.
- [46] Zhu Y, Lu Y, Zhang Q, Liu JJ, Li TJ, Yang JR, Zeng C, Zhuang SM. MicroRNA-26a/b and their host genes cooperate to inhibit the G1/S transition by activating the pRb protein. *Nucleic Acids Research*. 2012; 40: 4615-4625.
- [47] He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007; 447: 1130-1134.
- [48] Wiemer EA. The role of microRNAs in cancer: no small matter. *Eur J Cancer*. 2007; 43: 1529-1544.
- [49] Miko E, Czimmerer Z, Csánky E, Boros G, Buslig J, Dezso B, Scholtz B. Differentially expressed microRNAs in small cell lung cancer. *Exp Lung Res*. 2009; 35: 646-664.
- [50] Mouradian MM. MicroRNAs in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. 2012; 46: 279-284.
- [51] Schonrock N, Matamales M, Ittner LM, Götz J. MicroRNA networks surrounding APP and amyloid- β metabolism - Implications for Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*. 2012; 235: 447-454.
- [52] Rottiers V, Näär AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012; 13: 239-250.
- [53] Pan X, Wang ZX, Wang R. MicroRNA-21: A novel therapeutic target in human cancer. *Cancer Biology & Therapy*. 2010; 10: 1224-1232.
- [54] Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, How HK, Jen LM, Galas DJ, Wang K. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clinical Chemistry*. 2010; 56: 1733-1741.

- [55] Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol.* 2012; 22: 125-132.
- [56] 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: 654-659.
- [57] Umezu T, Ohyashiki K, Kuroda M, Ohyashiki JH. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene.* 2013; 32: 2747-2755.
- [58] Provost P. The clinical significance of platelet microparticle associated microRNAs. *Clin Chem Lab Med.* 2017; 55: 657-666.
- [59] 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: 3908-3917.
- [60] 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: 437-446.
- [61] 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: 133-144.
- [62] Brase J, Wuttig D, Kuner R, Sultmann H. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Molecular Cancer.* 2010; 9: 306.
- [63] Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res.* 2012; 110: 483-495.
- [64] Zampetaki A, Mayr M. MicroRNAs in vascular and metabolic disease. *Circ Res.* 2012; 110: 508-522.
- [65] Ward JA, Esa N, Pidikiti R, Freedman JE, Keaney JF, Tanriverdi K, Vitseva O, Ambros V, Lee R, McManus DD. Circulating Cell and Plasma microRNA Profiles Differ between Non-ST-Segment and ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *Fam Med Med Sci Res.* 2013; 2: 108.

- [66] De Rosa S, Fichtlscherer S, Lehmann R, Assmus B, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs. *Circulation*. 2011; 124: 1936-1944.
- [67] Hulsmans M, Holvoet P. MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease. *Cardiovasc Res*. 2013; 100: 7-18.
- [68] Michelson AD: How platelets work: platelet function and dysfunction. *J Thromb Thrombolysis*. 2003; 16: 7-12.
- [69] Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, Thornton EE, Headley MB, David T, Coughlin SR, Krummel MF, Leavitt AD, Passegué E, Looney MR. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*. 2017; 544: 105-109.
- [70] Ruggeri ZM: Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*. 2002; 8: 1227-1234.
- [71] Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE: Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Circ Res*. 2018; 122: 337-351.
- [72]. Hamzeh-Cognasse H, Damien P, Chabert A, Pozzetto B, Cognasse F, Garraud O. Platelets and infections - complex interactions with bacteria. *Front Immunol*. 2015; 6: 82.
- [73] 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: 186-191.
- [74] 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.
- [75] 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.
- [76]. 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.

- [77] 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: 810-819.
- [78] 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: 683-692.
- [79] Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent protein synthesis by activated platelets: new pathways to altered phenotype and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 17-24.
- [80] 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: 961-966.
- [81] Rondina MT, Weyrich AS. Regulation of the genetic code in megakaryocytes and platelets. *J Thromb Haemost.* 2015; 13 Suppl 1: S26-32.
- [82] 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: 379-391.
- [83] 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.
- [84] Nagalla S, Shaw C, Kong X, Kondkar A A, 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: 5189-5197.
- [85] 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.
- [86] 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.

- [87] 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: 1046-1059.
- [88] 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: 157-165.
- [89] 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: 1743-1751.
- [90] 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: 1903-1911.
- [91] 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: 479-486.
- [92] 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: 843-853.
- [93] 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: 570-580.
- [94] 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: 369-378.
- [95] 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: 420-432.

[96] 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: 5078-5083.

[97] Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost*. 2004; 2: 1282-1291.

[98] Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost*. 2009; 102: 248-257.

[99] 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: 810-817.

[100] 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: 705-710.

[101] Dangwal S, Stratmann B, Bang C, Lorenzen JM, Kumarswamy R, Fiedler J, Falk CS, Scholz CJ, Thum T, Tschöpe 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: 1480-1488.

[102] Zhang YY, Zhou X, Ji WJ, Shi R, Lu RY, Li JL, Yang GH, Luo T, Zhang JQ, Zhao JH, Jiang TM, Li YM. Decreased circulating microRNA-223 level predicts high on-treatment platelet reactivity in patients with troponin negative non-ST elevation acute coronary syndrome. *J Thromb Thrombolysis*. 2014; 38: 65-72.

[103] 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.

- [104] 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: 943-949.
- [105] 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: 1315-1323.
- [106] Colombo A, Iakovou I. Drug-eluting stents: The new gold standard for percutaneous coronary revascularisation. *Eur Heart J.* 2004; 25: 895-897.
- [107] 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: 210-214.
- [108] 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.
- [109] 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: 321-328.
- [110] Bavry AA, Bhatt DL. Appropriate use of drug-eluting stents: balancing the reduction in restenosis with the concern of late thrombosis. *Lancet.* 2008; 371: 2134-2143.
- [111] 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: 1920-1926.
- [112] 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: 678-685.

- [113] Panoulas VF, Mastoris I, Konstantinou K, Tespili M, Ielasi A. Everolimus-eluting stent platforms in percutaneous coronary intervention: comparative effectiveness and outcomes. *Med Devices (Auckl.)* 2015; 8: 317-329.
- [114] 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.
- [115] 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.
- [116] 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.
- [117] McDonald RA, Halliday CA, Miller AM, Diver LA, Dakin RS, Montgomery J, McBride MW, Kennedy S, McClure JD, Robertson KE, Douglas G, Channon KM, Oldroyd KG, Baker AH. Reducing In-Stent Restenosis: Therapeutic Manipulation of miRNA in Vascular Remodeling and Inflammation. *J Am Coll Cardiol.* 2015; 65: 2314-2327.
- [118] Wang D, Deuse T, Stubbendorff M, Chernogubova E, Erben RG, Eken SM, Jin H, Li Y, Busch A, Heeger CH, Behnisch B, Reichenspurner H, Robbins RC, Spin JM, Tsao PS, Schrepfer S, Maegdefessel L. Local MicroRNA Modulation Using a Novel Anti-miR-21-Eluting Stent Effectively Prevents Experimental In-Stent Restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35: 1945-1953.
- [119] 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: 4102-4114.
- [120] 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: 1973-1990.
- [121] 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: 182-187.

[122] 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: 219-231.

[123] Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*. 2012; 14: 178-192.

[124] 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.

[125] 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.

[126] 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: 2082-2094.

[127] Czimmerer Z, Hulvely J, Simandi Z, Varallyay E, Havelda Z, Szabo E, Varga A, Dezsó 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.

[128] Váradi J, Harazin A, Fenyvesi F, Réti-Nagy K, Gogolák P, Vámosi G, Bácskay I, Fehér P, Ujhelyi Z, Vasvári G, Róka E, Haines D, Deli MA, Vecsernyés M. Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone Protects against Cytokine-Induced Barrier Damage in Caco-2 Intestinal Epithelial Monolayers. *PLoS One*. 2017; 12: e0170537.

[129] Zampetaki A, Willeit P, Tilling L, Drozdov I, Prokopi M, Renard JM, Mayr A, Weger S, Schett G, Shah A, Boulanger CM, Willeit J, Chowienczyk PJ, Kiechl S, Mayr

M. Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2012; 60: 290-299.

[130] Marx SO, Totary-Jain H, Marks AR. Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis. *Circ Cardiovasc Intervention*. 2011; 4: 104-111.

[131] 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: 856-871.

[132] 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 trans-endothelial migration. *Cardiovasc Res*. 2010; 86: 283-292.

[133] 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.

[134] 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.

[135] 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.

[136] 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.

[137] Hou J, Liu L, Zhu Q, Wu Y, Tian B, Cui L, Liu Y, Li X. MicroRNA-185 inhibits angiogenesis in human microvascular endothelial cells through targeting stromal interaction molecule 1. *Cell Biol Int*. 2016; 40: 318-328.

- [138] 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.
- [139] 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.
- [140] Kingsley SMK, Bhat BV. Role of microRNAs in sepsis. *Inflamm Res.* 2017; 66: 553-569.
- [141] Tschoepe D. The activated megakaryocyte-platelet-system in vascular disease: focus on diabetes. *Semin Thromb Hemost.* 1995; 21: 152-160.
- [142] 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: 475-486.
- [143] 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: 771-787.
- [144] 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.
- [145] 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.
- [146] 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 micro-RNA expression. Results from microarray profiling in a cohort of 60 patients. *Thromb Haemost.* 2014; 111: 902-911.
- [147] Wang L, Erling P, Bengtsson AA, Truedsson L, Sturfelt G, Erlinge D. Transcriptional down-regulation of the platelet ADP receptor P2Y(12) and clusterin in patients with systemic lupus erythematosus. *J Thromb Haemost.* 2004; 2: 1436-1442.

- [148] 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: 920-927.
- [149] Sudic D, Razmara M, Forslund M, Ji Q, Hjendahl P, Li N. High glucose levels enhance platelet activation: involvement of multiple mechanisms. *Br J Haematol.* 2006; 133: 315-322.
- [150] 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: 1157-1163.
- [151] 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: 419-422.
- [152] 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; 3:949-957.
- [153] 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: 3377-3387.
- [154] 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: 415-423.
- [155] 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: 333-338.
- [156] Alfonso F, Pérez-Vizcayno MJ, Hernandez R, Fernandez C, Escaned J, Bañuelos C, Bethencourt A, López-Mínguez JR, Angel J, Cequier A, Sabaté M, Morís C, Zueco J, Seabra-Gomes R. Sirolimus-eluting stents versus bare-metal stents in patients with in-stent restenosis: results of a pooled analysis of two randomized studies. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2008; 72: 459-467.

- [157] Park KW, Lim WH, Ahn HS, Kang SH, Han JK, Lee SE, Cho JH, Gwon HC, Lee SY, Rhew JY, Kim W, Chae IH, Kim HS. Everolimus- versus sirolimus-eluting stents for the treatment of unprotected left main coronary artery stenosis (results from the EXCELLENT registry). *Int J Cardiol.* 2013; 168: 2738-2744.
- [158] Zocca P, Kok MM, Tandjung K, Danse PW, Jessurun GAJ, Hautvast RWM, van Houwelingen KG, Stoel MG, Schramm AR, Tjon Joe Gin RM, de Man FHAF, Hartmann M, Louwerenburg JHW, Linssen GCM, Löwik MM, Doggen CJM, von Birgelen C. 5-Year Outcome Following Randomized Treatment of All-Comers With Zotarolimus-Eluting Resolute Integrity and Everolimus-Eluting PROMUS Element Coronary Stents: Final Report of the DUTCH PEERS (TWENTE II) Trial. *JACC Cardiovasc Interv.* 2018; 11: 462-469.
- [159] Kim YH, Her AY, Jeong MH, Kim BK, Hong SJ, Shin DH, Kim JS, Ko YG, Choi D, Hong MK, Jang Y. Two-year clinical outcomes of zotarolimus- and everolimus-eluting durable-polymer-coated stents versus biolimus-eluting biodegradable-polymer-coated stent in patients with acute myocardial infarction with dyslipidemia after percutaneous coronary intervention: data from the KAMIR. *Heart Vessels.* 2018; doi: 10.1007/s00380-018-1251-0.
- [160] Kim WJ, Park DW, Yun SC, Lee JY, Lee SW, Kim YH, Lee CW, Park SW, Park SJ. Impact of diabetes mellitus on the treatment effect of percutaneous or surgical revascularization for patients with unprotected left main coronary artery disease: a subgroup analysis of the MAIN-COMPARE study. *JACC Cardiovasc Interv.* 2009; 2: 956-963.
- [161] Kim WJ, Lee SW, Park SW, Kim YH, Yun SC, Lee JY, Park DW, Kang SJ, Lee CW, Lee JH, Choi SW, Seong IW, Lee BK, Lee NH, Cho YH, Shin WY, Lee SJ, Lee SW, Hyon MS, Bang DW, Park WJ, Kim HS, Chae JK, Lee K, Park HK, Park CB, Lee SG, Kim MK, Park KH, Choi YJ, Cheong SS, Yang TH, Jang JS, Her SH, Park SJ. Randomized comparison of everolimus-eluting stent versus sirolimus-eluting stent implantation for de novo coronary artery disease in patients with diabetes mellitus (ESSENCE-DIABETES): results from the ESSENCE-DIABETES trial. *Circulation.* 2011; 124: 886-892.
- [162] Dangas GD, Serruys PW, Kereiakes DJ, Hermiller J, Rizvi A, Newman W, Sudhir K, Smith RS Jr, Cao S, Theodoropoulos K, Cutlip DE, Lansky AJ, Stone GW. Meta-

analysis of everolimus-eluting versus paclitaxel-eluting stents in coronary artery disease: final 3-year results of the SPIRIT clinical trials program. *JACC Cardiovasc Interv.* 2013; 6: 914-922.

[163] Galløe AM, Kelbæk H, Thuesen L, Hansen HS, Ravkilde J, Hansen PR, Christiansen EH, Abildgaard U, Stephansen G, Lassen JF, Engstrøm T, Jensen JS, Jeppesen JL, Bligaard N. 10-Year Clinical Outcome After Randomization to Treatment by Sirolimus- or Paclitaxel-Eluting Coronary Stents. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 69: 616-624.

[164] Claessen BE, Henriques JPS, Vendrik J, Boerlage-van Dijk K, van der Schaaf RJ, Meuwissen M, van Royen N, Gosselink ATM, van Wely MH, Dirkali A, Arkenbout EK, Piek JJ, Baan J Jr. Paclitaxel-eluting balloon versus everolimus-eluting stent in patients with diabetes mellitus and in-stent restenosis: Insights from the randomized DARE trial. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2018; doi: 10.1002/ccd.27814.

[165] Jensen CJ, Richardt G, Tölg R, Erglis A, Skurk C, Jung W, Neumann FJ, Stangl K, Brachmann J, Fischer D, Mehilli J, Rieber J, Wiemer M, Schofer J, Sack S, Naber CK. Angiographic and clinical performance of a paclitaxel coated balloon compared to a 2nd generation sirolimus eluting stent in patients with in-stent restenosis- the BIOLUX randomized controlled trial. *EuroIntervention.* 2018; doi: 10.4244/EIJ-D-17-01079.

[166] Urban P, Meredith IT, Abizaid A, Pocock SJ, Carrié D, Naber C, Lipiecki J, Richardt G, Iñiguez A, Brunel P, Valdes-Chavarri M, Garot P, Talwar S, Berland J, Abdellaoui M, Eberli F, Oldroyd K, Zambahari R, Gregson J, Greene S, Stoll HP, Morice MC. Polymer-free Drug-Coated Coronary Stents in Patients at High Bleeding Risk. *N Engl J Med.* 2015; 373: 2038-2047.

[167] Llano R, Winsor-Hines D, Patel DB, Seifert PS, Hamamdzic D, Wilson GJ, Wang H, Keane MG, Huibregtse BA, Wilensky RL. Vascular responses to drug-eluting and bare metal stents in diabetic/hypercholesterolemic and nonatherosclerotic porcine coronary arteries. *Circ Cardiovasc Intervention.* 2011; 4: 438-446.

[168] Wolberg AS, Aleman MM, Leiderman K, Machlus KR. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. *Anesth Analg.* 2012; 114: 275-285.

- [169] Mahemuti A, Meneveau N, Seronde MF, Schiele F, Descotes-Genon V, Ecarnot 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: 333-341.
- [170] De Luca G, Dirksen MT, Spaulding C, Kelbaek H, Schalij 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: 611-621.
- [171] Szük T, Nagy B Jr, Bereczky Z, Kőszegi Z, Édes I, Kappelmayer J. Effects of ad hoc clopidogrel loading versus pre-treatment on P-selectin expression after coronary stent implantation. *Platelets.* 2006; 17: 344-346.
- [172] Nagy B Jr, Szük 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: 147-151.
- [173] 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: 1986-1991.
- [174] 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 Thrombol.* 2011; 31: 92-98.
- [175] 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: 366-372.
- [176] Mohamed-Ali V, Armstrong L, Clarke D, Bolton CH, Pinkney JH. Evidence for the regulation of levels of plasma adhesion molecules by proinflammatory cytokines and their soluble receptors in type 1 diabetes. *J Int Med.* 2001; 250: 415-421.

- [177] 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: 83-87.
- [178] 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.
- [179] 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: 246-251.
- [180] 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: 1482-1491.
- [181] 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.
- [182] 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.
- [183] Li S, Chen H, Ren J, Geng Q, Song J, Lee C, Cao C, Zhang J, Xu N. MicroRNA-223 inhibits tissue factor expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2014; 237: 514-520.

9.2 Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/269/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Fejes Zsolt
Neptun kód: DTJ5X4
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10056989

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Fejes, Z.**, Czimmerer, Z., Szűk, 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. 13 (6), 1-20, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0197890>
IF: 2.766 (2017)
2. **Fejes, Z.**, Póliska, S., Czimmerer, Z., Káplár, M., Penyige, A., Gál Szabó, G., Bekéné Debreceni, I., Kunapuli, S. P., Kappelmayer, J., Nagy, B. Jr.: Hyperglycemia suppresses microRNA expression in platelets to increase P2RY12 and SELP levels in type 2 diabetes mellitus.
Thromb. Haemost. 117 (3), 529-542, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1160/TH16-04-0322>
IF: 4.952
3. Szűk, T., **Fejes, Z.**, Bekéné Debreceni, I., Kerényi, A., Édes, I. F., 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. 27 (5), 410-419, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/09537104.2015.1112368>
IF: 2.465





További közlemények

4. Becs, G., Hudák, R., **Fejes, Z.**, Bekéné Debreceni, I., Bhattoa, H. P., Balla, J., Kappelmayer, J.:
Haemodiafiltration elicits less platelet activation compared to haemodialysis.
BMC Nephrol. 17 (1), 147, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12882-016-0364-x>
IF: 2.289
5. Nagy, B. Jr., Nagy, B., Fila, L., Clarke, L. A., Gönczy, F., Bede, O., Nagy, D., Újhelyi, R., Szabó, Á., Anghelyi, A., Major, M., Bene, Z., **Fejes, Z.**, Antal-Szalmás, P., Bhattoa, H. P., Balla, G., Kappelmayer, J., Amaral, M. D., Macek, J. M., Balogh, I.: Human epididymis protein 4 (HE4): a novel serum inflammatory biomarker in cystic fibrosis.
Chest. 150 (3), 661-672, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chest.2016.04.006>
IF: 6.044
6. Kósa, Z., **Fejes, Z.**, Nagy, T., Csordás, M., Simics, E., Remenyik, É., Góth, L.: Catalase - 262C>T polymorphisms in Hungarian vitiligo patients and in controls: further acatalasemia mutations in Hungary.
Mol. Biol. Rep. 39 (4), 4787-4795, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-011-1272-6>
IF: 2.506
7. Góth, L., Nagy, T., Kósa, Z., **Fejes, Z.**, Bhattoa, H. P., Paragh, G., Káplár, M.: Effects of rs769217 and rs1001179 polymorphisms of catalase gene on blood catalase, carbohydrate and lipid biomarkers in diabetes mellitus.
Free Radic. Res. 46 (10), 1249-1257, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2012.702899>
IF: 3.279

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,301

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,183

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.08.28.



10. Tárgyszavak– keywords

Diabetes mellitus – diabetes mellitus

Dicer enzim – Dicer enzyme

Endothelsejt aktiváció – endothelial cell activation

Enhancer RNS – enhancer RNA

Everolimus – everolimus

Vaszkuláris gyulladás - vascular inflammation

Hyperglycaemia- hyperglycaemia

In-stent restenosis – In-stent restenosis

Koronária sztentelés – coronary stenting

Megakaryocytá – megakaryocyte

MikroRNS- microRNA

Vérlemezke aktiváció – platelet activation

11. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Nagy Béla** adjunktus Úrnak, hogy az elmúlt évek alatt a kísérletek megtervezésétől, a prezentációk elkészítésén át, a közlemények és az értekezés megírásáig mindenben készségesen segített és mindvégig ösztönözte tudományos tevékenységemet.

Hálásan köszönöm **Dr. Kappelmayer János** Professzor Úrnak, hogy a doktori képzés során biztosította a laboratóriumi munkám tárgyi és anyagi feltételeit. Köszönöm, hogy eredményeinket számos hazai és nemzetközi konferencián bemutathattam.

Köszönöm **Dr. Káplár Miklós** és **Dr. Szük Tibor** klinikus kollégáknak, hogy a betegminták gyűjtésében és a tanulmányok megtervezésében a segítségünkre voltak.

Nagyon köszönöm **Mátyás Erzsébetnek**, **Dr. Póliska Szilárdnak**, **Dr. Czimmerer Zsoltnak** és **Dr. Penyige Andrásnak** a metodikák kivitelezésében nyújtott segítségét.

Köszönöm **Bekéné Debreceni Ildikó**, **Gálné Szabó Gabriella** és **Sarudi Sára**, valamint a Laboratóriumi Medicina Intézet valamennyi munkatársa segítségét, amit a laboratóriumi és adminisztratív munkák során nyújtottak.

Köszönetemet fejezem ki a **Társszerzőknek**, akik az eredmények interpretálásával és a reagensek biztosításával nagyban hozzájárultak a közlemények elkészítéséhez.

Továbbá, köszönettel tartozom **Dr. Góth László** Professzor Úrnak, hogy TDK-s hallgató koromban bevezetett a kutatás rejtelmeibe és elindított ezen az úton.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm Feleségemnek és családomnak, hogy mellettem álltak és biztatásukkal folyamatosan támogatták a munkahelyi feladataimat.

A kutatómunka a GINOP-2.3.2-15-2016-00043 kódszámú „Szív- és érkutatási kiválóságközpont (IRONHEART)” című pályázat, valamint az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 kódszámú „Az orvos-, egészségtudományi- és gyógyszerészképzés tudományos műhelyeinek fejlesztése” című pályázat, továbbá a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar munkacsoport támogatásával készült. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg. A témavezetőt a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar által adományozott Szodoray Lajos Ösztöndíj támogatta.

12. Függelék

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények gyűjteménye:

1. **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): 529-542. doi: 10.1160/TH16-04-0322.
2. 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): 410-419. doi: 10.3109/09537104.2015.1112368.
3. **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. doi: 10.1371/journal.pone.0197890.