

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Fejes Zsolt

Témavezető: Dr. Nagy Béla



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2018

MikroRNS expressziók vizsgálata fokozott vérlemezke és endothelsejt aktivációval járó kórképekben

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Fejes Zsolt okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem, ÁOK, Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Trombózis, Hemosztázis és Vaszkuláris Biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Nagy Béla, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Nagy Bálint, az MTA doktora
Prof. Dr. Kolev Kraszimir, az MTA doktora

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet könyvtára
2018. december 05. (szerda) 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora
Dr. Pfliegler György, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora
Dr. Pfliegler György, PhD
Prof. Dr. Nagy Bálint, az MTA doktora
Prof. Dr. Kolev Kraszimir, az MTA doktora

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2018. december 05. (szerda) 13:30 óra

Bevezetés és irodalmi áttekintés

A mikroRNS-ek (miRNS) a nem kódoló RNS család tagjai, amelyek a posttranscriptiós szabályozás résztvevőiként, kulcsfontosságú szerepet játszanak a sejtek működéséhez szükséges gének expressziójának finomszabályozásában. Élettani körülmények között részt vesznek számos anyagcserefolyamat, a sejt differenciáció, proliferáció és apoptózis szabályozásában, ugyanakkor az utóbbi években kórosan megváltozott expressziójukat összefüggésbe hozták gyulladásos, tumoros, metabolikus és kardiovaszkuláris betegségek kialakulásával.

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

A vérlemezkék és az endothelsejtek fontos funkciót töltenek be a hemosztázis folyamatok kialakításában, mivel a vaszkuláris integritás fenntartását a normális működésük biztosítja. Súlyos metabolikus vagy gyulladásos környezetben ugyanakkor a thrombocyták és endothelsejtek kóros aktivációja figyelhető meg, ami vaszkuláris szövődmények kialakulásához vezethet. DM2-ben a vérlemezkék aktivációs szintje megemelkedik és ezért kisebb stimulus hatására könnyebben, akár nagyobb mértékben aktiválódhatnak. Koronária betegségekben számos klinikai adat vált ismertté a gyógyszer (pl. everolimus) eluáló koszorúér sztentek (DES) jobb klinikai alkalmazhatóságáról, mivel a gyógyszer hatásának köszönhetően csökken a korai komplikációk, pl. az in-stent restenosis (ISR) kialakulásának kockázata szemben a hagyományos koronária fémszent (BMS) használatával. Mindezek háttérében az aktiválódott endothelsejtek szerepe is felmerült.

A disszertáció témája a vérlemezke és endothelsejt miRNS-ek jellemzése és hatásmechanizmusának jobb megismerése volt fokozott celluláris aktivációval 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.

A miRNS-ek szerepe a génexpresszió szabályozásában

A miRNS-ek több lépésből álló érési folyamaton mennek keresztül, mielőtt beépülnének a RISC komplexbe (RNA-induced silencing complex). Érett formájukat a Dicer

enzim segítségével érik el, ami a pre-miRNS hajtű szerkezetét lehasítja, és két érett miRNS-ből álló duplex keletkezik, melyben a miRNS-ek általában 18-25 nukleotid hosszúságúak. Ezek közül a vezető szál az Ago2 fehérjével kialakítja a RISC komplexet, míg a másik szál lebomlik.

A miRNS-ek többsége posttranscriptiós módon gátolja a cél gének kifejeződését 2 fő mechanizmuson keresztül. Az egyik a transláció gátlása, a másik a messenger RNS-ek (mRNS) destabilizálása, ami degradációhoz vezethet. Részleges vagy teljes komplementaritás révén kötődhetnek az mRNS meghatározott régiójához. Minden miRNS akár több száz gént tud szabályozni, és egy gént egyszerre akár több miRNS is regulálhat. A kódoló gének kb. 60%-a áll a miRNS-ek szabályozása alatt, ezáltal számos fiziológiás és patológias folyamat regulációjában játszhatnak fontos szerepet.

Fokozott vérlemezke aktiváció kialakulása

A vérlemezkék a csontvelőben és egy új állatkísérletes tanulmány szerint a tüdőszövetben is elhelyezkedő megakaryocytákról (MK) lefűződve jutnak be a keringésbe. Fiziológiás körülmények között az érfal sérülése esetén felszabaduló molekulák (pl. kollagén, von Willebrand faktor) különböző receptorokon keresztül aktiválják a thrombocytákat, melyek egymással és más sejtekkel aggregálódva a sérült érfalhoz kitapadva beindítják a primer hemosztázist. Súlyos fertőzés esetén vagy gyulladásos, metabolikus betegségben a vérlemezkék fokozott aktivációját figyelhetjük meg, amely trombotikus/vaszkuláris komplikációk kialakulását okozhatja. Ilyen stimulus lehet DM2-ben a hyperglycaemia, szepszisben a Gram-pozitív vagy Gram-negatív baktériumokból származó sejtalkomponensek (pl. peptidoglycan és lipopolysaccharide), a lipidanyagcsere betegségekben a magas koleszterinszint, illetve maga az obezitás. A különböző kórképek miatt kialakuló emelkedett vérlemezke aktivációs állapot magas sejtfelszíni és szolubilis P-selectin expresszióval jellemezhető.

A thrombocyták RNS tartalma

A vérlemezkék nem rendelkeznek sejt-maggal, de tartalmazzak MK-eredetű mRNS-t, miRNS-t, sejtalkotókat (riboszóma, endoplazmatikus retikulum, stb.) és enzimeket (pl. Dicer), amelyek birtokában bizonyos stimulusok hatására akár *de novo* fehérjeszintézis is lejátszódhat bennük (pl. IL-1 β). Mivel a vérlemezkékben nincs transcriptió, úgy tűnik, hogy a pre-mRNS „splicing” mechanizmusának és a miRNS-ek működésének jóval nagyobb szerepe lehet, mint

más maggal rendelkező sejtekben. Jelenleg több, mint 500 miRNS-t azonosítottak, 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 kihathat a thrombocytá reaktivitás mértékére. A nyugvó vérlemezkékben a miRNS-t tartalmazó RISC komplex megakadályozhatja az aktiváció-függő fehérjék szintézisét az mRNS kifejeződésének gátlásán keresztül, a Dicer működése pedig az érett miRNS expresszió fenntartását biztosítja. Vérlemezke aktiváció (pl. thrombin által) hatására viszont az mRNS-ek leválhatnak az őket szabályozó RISC-ről és így végbe mehet a fehérjeszintézis (pl. Plasminogen activator inhibitor-1). DM2-ben a thrombocytá aktivációval együtt járó emelkedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció hatására a Ca^{2+} -függő calpainok aktiválódnak, melyek hasítva a Dicer-t, lecsökkentik az enzim aktivitását, ezáltal számos érett miRNS szintje alacsonyabb lesz.

A thrombocytá aktiváció szabályozásában részt vevő miRNS-ek és azok cél mRNS-ei

Néhány vérlemezke miRNS és cél mRNS közötti kapcsolat már igazolásra került. Elsőként Landry P és munkatársai mutatták ki, hogy a miR-223 szabályozza a P2Y₁₂ ADP-receptor expresszióját, amely receptor a vérlemezke reaktivitás szabályozásában vesz részt. A miR-223 emellett a thrombocytá β 1-integrin, kindlin-3 és FXIII véralvadási faktor A alegységének expressziójának regulációjáért is felelős. MiR-223 depletált egerekben fokozott vérlemezke aktivációt tapasztaltak, ami alátámasztja ezen miRNS központi szerepét. Reaktív thrombocytákban a lecsökkent miR-96 emelkedett VAMP8 (Vesicle-associated membrane protein 8) mRNS és fehérje szinthez vezetett, ami hozzájárult a vérlemezkék fokozott szekréciójához.

A thrombocytá miRNS expresszió változása 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. Az endothelsejt diszfunkció mellett ezek a reaktív thrombocyták is felelősek a cukorbetegségben gyakran megjelenő kardiovaszkuláris szövődmények kialakulásáért. Csökkent vérlemezke miR-223 és miR-146 expressziókat találtak, ami a stroke kialakulásának kockázatát növelte diabetesben. Emellett plazma mintákban is jelentősen csökkent a miR-223, miR-126, miR-24, miR-197, miR-191 és miR-21 szintje mind DM2-ben, mind súlyos atherosclerosisban. 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).

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

A koronária betegségek kezelésében - az intervenciós kardiológia nagy léptékű fejlődése révén - a különböző koronária sztenteket egyre szélesebb körben alkalmazzák. A klasszikus fémsztentek (BMS) helyett egyre gyakrabban a gyógyszer kibocsátó koronária sztenteket (DES) alkalmazzák trombotikus komplikációkra hajlamosító betegségben, pl. DM2-ben. Klinikai adatok alapján az everolimussal vagy más mTOR inhibitorral bevont DES megbízhatóbb acut myocardialis infarctust (AMI) követően, pitvar fibrillációban és stabil anginában, mint a BMS, mivel csökkenti az in-stent restenosis (ISR) kialakulását. A DES és BMS direkt sejtaktiváló tulajdonságainak összehasonlításakor ugyanakkor ellentmondó eredményeket kaptak, így kevés információ áll rendelkezésre a kétféle sztent ilyen típusú hatásairól.

Az everolimus sejtaktivációra kifejtett hatása

Az everolimus egy mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitor, amit leggyakrabban immunszuppresszív gyógyszerként alkalmaznak szervátültetésben részesült betegeknek, hogy megelőzzék a beültetett szerv kilökődését. Simaizomsejtekben a sejtciklus G1 fázisának gátlásán keresztüli antiproliferatív hatását igazolták. Neutrophil granulocytákban csökkentette az IL-8 (interleukin-8) termelését és a TNF- α indukálta adhéziónak is mérsékelte az endothelsejtekhez. 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. Az everolimus endothelsejt aktivációt csökkentő hatásának lehetséges transcriptiós és posttranscriptiós szabályozó mechanizmusait ugyanakkor még nem vizsgálták. Az endothelsejt aktivációs markerek (VCAM-1 és E-selectin) kifejeződésének szabályozásában a miR-181b szerepét részben kutatták már, amit mi tovább vizsgáltunk.

Célkitűzések

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

A thrombocytá és MK miRNS-ek vizsgálata DM2-ben

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

- Célunk volt olyan miRNS-ek szerepét megvizsgálni, amelyek nagy mennyiségben találhatóak meg a vérlemezkékben és szerepet játszhatnak a thrombocytá aktivációban. A miR-223, miR-26b és miR-140, valamint azok cél mRNS-einek (P2RY12 és SELP) expresszió változását szeparált thrombocytá 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.
- A DM2-ben megváltozott Dicer enzim funkcióját indirekt módon calpain inhibitor (calpeptin) használatával terveztük vizsgálni MEG-01 MK sejtekben.

A BMS és DES sejtaktiváló hatásának összehasonlítása stabil anginás betegekben

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

- Össze kívántuk hasonlítani a kétféle sztent használata mellett megmért aktiváció-specifikus 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 típusa, valamint az ISR kialakulása alapján a biomarker eredményeket több alcsoportban tovább értékeltük.

Az everolimus endothelsejt aktivációt csökkentő hatásának vizsgálata

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

- Célunk volt a vaszkuláris gyulladáscsökkentő hatásukat 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 TNF- α -val kezelt endothelsejtekben terveztük analizálni 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 célunk volt megvizsgálni a beavatkozást követően kialakult ISR jelenlétében és hiányában.

Anyagok és módszerek

Betegek és kontrollok

DM2 betegek, obez és egészséges kontroll személyek

DM2-ben, valamint obezitásban szenvedő betegek kiválasztásában és a minták eljuttatásában Dr. Káplár Miklós egyetemi docens (Debreceni Egyetem, 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 diabeteses, de obez személy mintáiban vizsgáltuk a vérlemezke aktiváció mértékét és az ezt befolyásoló miRNS szinteket. Kizárási kritériumok közé tartoztak a súlyos gyulladásos, daganatos, autoimmun és akut kardiovaszkuláris betegségek, valamint a terhesség és heveny trombotikus szövődmények.

BMS, illetve DES koronária 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 a myocardialis infarktus, hematológiai és szolid tumoros betegségek, korábbi koronária sztent beültetés, valamint krónikus gyulladásos vagy autoimmun betegségek. A két betegcsoport eredményeinek összehasonlíthatósága érdekében egy adott típusú BMS (Integrity®) vagy DES (Xience®) sztentet kapott betegeket válogattunk be. A DES minden esetben everolimus gyógyszerrel volt bevonva.

Mintavétel és mintafeldolgozás

A DM2, obez és egészséges kontrollok teljes vénás vérmintái az RNS expressziók vizsgálatára 0,105 M Na-citrátot tartalmazó Vacutainer csövekbe (Becton Dickinson) kerültek levételre, személyenként 2 db cső (10 mL). A fehérvérsejt és a vérlemezke számokat Advia 2120 hematológiai analizátorral (Bayer Diagnostics) határoztuk meg. A rutin laboratóriumi diagnosztikai vizsgálatok során lemérésre kerültek: i) a szérum éhomi glükóz, totál koleszterin, HDL, LDL, triglicerid, C-reaktív protein (CRP), valamint a vizelet albumin és

kreatinin koncentrációk (Cobas 6000 analizátor, Roche Diagnostics), ii) a szérumban inzulin szintek (Liaison XL készülék, DiaSorin) és iii) a HbA1c értékek (BioRad Laboratories).

A sztentelt betegektől 3 időpontban gyűjtöttünk 0,105 M Na-citráttal alvadásgátolt vérmintákat: i) a beavatkozás előtt, ii) a sztentelés után 24 óra múlva, és iii) 1 hónappal a sztentelést követően. Követtük a szérumban CRP és cTnT (cardialis troponin T) koncentrációkat (Cobas e411 készülék, Roche), a D-dimer, a fibrin monomer (FM), továbbá a fibrinogén szint (BCS XP, Siemens) alakulását a vizsgálati periódusban. Az endothelsejt aktiváció mértékét részben a von Willebrand faktor antigén (vWF-Ag) szintekkel (BCS XP, Siemens) monitoroztuk. Ezen laborparaméterek meghatározását a Laboratóriumi Medicina Intézet Hemosztázis és Integrált Kémia részlegein végezték el.

A fehérvérsejt mentesített vérlemezkék szeparálása

A vérlemezke miRNS és mRNS expressziókat fehérvérsejt depletált thrombocytákból mintákból analizáltuk. A teljes vérmintákat lecentrifugáltuk (170 g, 15 perc, szobahő) és thrombocytákból plazmát (PRP) nyertünk. A fehérvérsejtek eltávolításához Dynabeads CD45-ellenes antitesttel bevont mágneses gyöngyöket (Invitrogen) használtunk. A mágneses szeparálással nyert vérlemezke szuszpenziót lecentrifugáltuk (1500 g, 15 perc, szobahő) és a thrombocytákból pelletet 1 mL trizol reagenssel (TRI Reagent, Molecular Research Center) lizáltuk és RNS izolálásig -20 °C-on tároltuk.

A plazmaminták előkészítése a keringő miRNS-ek vizsgálatára

A diabeteses betegek vizsgálatokor a PRP mintákat tovább centrifugáltuk (1500 g, 15 perc, szobahő), így thrombocytákból szegény plazmát (PPP) kaptunk. A sztentelt betegektől származó, korábban lefagyasztott PPP mintákat felolvasztás után egyszer centrifugáltuk (10000 g, 1 perc, szobahő). Az extracelluláris miRNS-ek analíziséhez minden esetben 250 µL PPP-hez 750 µL TRI reagenst adtunk és az RNS izolálásig -20 °C-on tároltuk.

Sejtkultúrák fenntartása és kezelése

A megakaryocyták tenyésztése hyperglycaemiás környezetben

A diabeteses csontvelői körülményeket kétféle humán MK sejtvonalon modelleztük. A humán megakaryoblastos leukémiás MEG-01 sejteket (ECACC) 10% FBS-t (Sigma), 100 U/mL Penicillin + 100 µg/mL Streptomycin antibiotikumot (Sigma) és 2 mM L-glutamint tartalmazó RPMI-1640 médiumban (Sigma) tenyésztettük. A hyperglycaemiás körülmények kialakítására a kész médiumot kiegészítettük D-glükóz oldattal (33 mM, 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 (Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) felajánlásából kaptuk és a fent leírt médiumban tenyésztettük. Ezeket a sejteket első lépésben 7 nap alatt érett MK sejtekké differenciáltattuk PMA-val (phorbol-12-myristate-13-acetate) (20 ng/mL, Sigma). A differenciálódási folyamatot áramlási citometriával (FC-500, Beckman Coulter), a felszíni CD41 és CD61 expressziók mérésével követtük. Ezt követően, az érett K562-MK (K562 megakaryocytá) sejteket, a MEG-01 sejtekhez hasonlóan, magas glükóz vagy mannitol (kontroll) koncentrációjú médiumban tenyésztettük. A kezelési időt követően a MEG-01 és K562-MK sejteket steril PBS oldattal mostuk, majd 750 μ l TRI reagenssel lizáltuk és az RNS izolálásig -20°C-on tároltuk.

Az endothelsejtek tenyésztése gyulladáshoz vezető körülmények között

A humán koronária artériás endothelsejteket (HCAEC, Cell Applications) használatra kész MesoEndo Cell Growth médiumban (Cell Applications) tenyésztettük. Ezzel párhuzamosan HUVEC sejteket is fenntartottunk 15% FBS-t (Gibco), 5 U/mL heparint (Teva Gyógyszergyár), 7,5 μ g/mL endothelsejt növekedést segítő kiegészítőt (endothelial growth supplement, Sigma), 1% antibiotikumot és antimikotikumot (Sigma) tartalmazó M-199 médiumban (Gibco). A HUVEC sejteket és a médiumot Dr. Jeney Viktóriától és Dr. Balogh Enikőtől (Debreceni Egyetem, Belgyógyászati Intézet) kaptuk.

A sztent indukálta vaszkuláris gyulladáshoz vezető környezet modellezésére az endothelsejteket (3×10^5 sejt/well) 6-lyukú plate-ben rekombináns TNF- α -val (100 ng/mL, Gibco) kezeltük 1-24 órán keresztül. Az everolimust kibocsátó DES endothelsejt aktivációt mérséklő hatásának vizsgálatakor az endothelsejtekhez everolimust (0,5 μ M, Sigma) is adtunk. Kontroll mintaként a gyógyszer oldószerét (DMSO: dimethyl sulfoxide, Sigma) használtuk az előzőekhez hasonló kondíciókban.

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

Laboratóriumi vizsgálatok

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

A thrombocyta aktiváció vizsgálatát mindkét betegcsoportban a felszíni P-selectin (CD62P) expresszióon keresztül áramlási citometriai módszerrel végeztük. Ehhez 40 μ l teljes vért 1%-os PFA/PBS (paraformaldehyde/phosphate buffered saline) oldattal fixáltunk, majd a vérlemezkek azonosítására FITC-el (fluorescein isothiocyanate) konjugált anti-CD42a antitestet (Becton Dickinson) használtunk, míg a P-selectin detektálására PE-el (phycoerythrin) konjugált anti-CD62 antitesttel (Becton Dickinson) jelöltük (20 perc, szobahő) a thrombocytákat. Izotípus kontrollként PE-el konjugált IgG₁ antitesttel (Becton Dickinson) jelölt mintát használtunk. A vérlemezke aktiváció mértékét a dupla pozitív sejtek kiértékelésével határoztuk meg FC-500 áramlási citométerrel (Beckman Coulter).

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) határoztuk meg, majd a mintákat -70 °C-on tároltuk.

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

A miRNS expressziók meghatározását Czimmerer és munkatársai által kifejlesztett UPL-próba alapú RT-qPCR módszerrel végeztük. A cDNS készítéshez TaqMan MicroRNA reverz transzkripció kiteset (Applied Biosystems), miRNS specifikus „stem-loop” primert (500 nM, Sigma) és 10 ng totál RNS-t használtunk.

A kvantitatív PCR reakcióban miRNS specifikus forward primert (100 μ M, Sigma), univerzális reverse primert (100 μ M, Sigma), UPL próbát (10 μ M, Roche), Taq polimerázt (5 U/ μ L, Thermo Scientific) és dNTP-eket (2,5 mM, Thermo Scientific) használtunk. A méréseket QuantStudio 12 K Flex qPCR (Applied Biosystems) készülékkel triplikátumban végeztük és az eredmények normalizálására az RNU-43 referencia gént használtuk.

Az mRNS, a prekursor miRNS és az enhancer RNS szintek meghatározása

A cDNS szintézishez High Capacity cDNA RT kiteset (Applied Biosystems) használtunk a gyártói utasításoknak megfelelően. Az RNS-ek mennyiségét SYBR Green I Master mix (Roche) és az RNS-ekre specifikus primer párok (10 μ M, Integrated DNA Technologies)

felhasználásával határoztuk meg LC-480 qPCR készülékkel (Roche). Normalizáláshoz az RPLP0 (36B4) referencia gént alkalmaztuk.

Az enhancer RNS-ek azonosítása

Az enhancer RNS-ek (eRNS) aktivitását a SELE és VCAM1 gének közelében az NCBI GEO adatbázisban elérhető Chip-seq adatok (GSE53998) elemzésével azonosítottuk. 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 transkripció 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.

Az extracelluláris miRNS expressziók analízise plazma mintákban

A BMS és DES implantációt követő 1. hónapos plazma mintákban vizsgáltuk a keringő miRNS-ek mennyiségét figyelembe véve a BMS kezelésben részesült betegek 20%-ban kialakult korai ISR kialakulását. A betegeket 4 alcsoportra osztottuk: i) a teljes DES csoport, akik esetében nem alakult ki szövődmény, ii) a teljes BMS csoport, iii) a komplikáció mentes BMS személyek, és iv) azok a BMS betegek, akiknél kialakult az ISR.

Az extracelluláris miRNS profil meghatározásához random módon 3-3 RNS mintát választottunk ki csoportonként és TaqMan Open Array módszerrel 754-féle miRNS-t vizsgáltunk. 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, Applied Biosystems) felhasználásával. Ezt egy preamplifikációs reakció követett, amiben TaqMan PreAmp master mixet (Applied Biosystems) és Megaplex PreAmp primereket (Set v3.0, Applied Biosystems) használtunk. 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 panelre (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 normalizálására. Az Open Array mérések Dr. Pólska Szilárd (Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) vezetésével készültek el.

Irodalmi adatok alapján a miR-181b szabályozhatja a SELE és VCAM1 mRNS-ek expresszióját, ezért vizsgálatainkban ennek a miRNS-nek a vizsgálatát külön is elvégeztük, mert az Open Array lemezen található assay-k között ez a miRNS nem szerepelt.

A miRNS mimic és inhibitor transzfekciója megakaryocytákba 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 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 (Gibco). A miRVana miR-26b és miR-140 mimic-eket (20 pmol, Ambion) Lipofectamine RNAiMAX transzfekciós reagens (Invitrogen) segítségével juttattuk be a sejtekbe és alkalmaztuk 24 óráig. Ezzel párhuzamosan negatív kontrollként a sejteket NEG-01 mimic-el (20 pmol, Ambion) transzfektáltuk. 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 kontroll inhibitorral (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 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-kel (NEG-01, 25 pmol, Ambion) transzfektált mintákhoz hasonlítottuk.

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

A Dicer funkciót indirekt módon, calpain inhibitor (calpeptin) használva vizsgáltuk hyperglycaemiás és glükózzal nem kezelt (kontroll) MK sejtekben. A MEG-01 sejtekhez calpeptint (10 $\mu\text{mol/L}$, 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.

Szolubilis fehérjék koncentrációjának meghatározása ELISA módszerrel

A meghatározásokhoz ELISA kitéket (R&D Systems) 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 lizátum és plazma mintáiban is meghatároztuk. Az intracelluláris P-selectin analíziséhez a vérlemezkéket (egységesen $1,25 \times 10^8$ db sejt/minta) 1%-os TritonX-100 és proteáz gátló 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, CD40L és PDGF-BB koncentrációk mérésével, az endothelsejtek aktiválódását szolubilis VCAM-1, ICAM-1 és E-selectin plazma koncentrációjának analízisével értékeltük. Az ISR kialakulása alatt bekövetkező vaszkuláris gyulladási folyamatok súlyosságát az 1. hónapos *ex vivo* plazma minták TNF- α koncentráció mérésével is nyomon követtük.

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

Az NF- κ B útvonal aktiválódásának vizsgálata endothelsejtekben

A TNF- α kezelés hatására kialakuló gyulladási reakció az NF- κ B útvonal aktivációjához vezetett, amit a p65 alegység magtranszlokációján keresztül monitoroztunk fluoreszcens mikroszkóppal. A HCAEC sejteket 1 órán keresztül stimuláltuk TNF- α -val (100 ng/mL) everolimus (0,5 μM) vagy DMSO (kontroll) jelenlétében. Az NF- κ B p65 alegység elsődleges jelöléséhez nyúlban termeltetett anti-humán p65 antitestet (100 $\mu\text{g/mL}$, Santa Cruz Biotechnology) 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) vizsgáltuk, a képek analízisét és az NF- κ B p65 sejtmag/cytoplaszma 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.

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) és SPSS (version 19.0, IBM Corp.) szoftvereket használtunk.

Eredmények

A thrombocyta és MK miRNS-ek vizsgálata DM2-ben

A vizsgálati csoportok demográfiai és laboratóriumi jellemzői

A DM2 betegek és a két kontroll csoport a demográfiai paraméterek alapján összehasonlíthatók voltak, a nemek arányában és az átlagéletkorban nem voltak eltérések. A diabeteses betegekben jelentősen magasabbak ($P < 0,05$) voltak a BMI (body mass index) értékek, az éhomi glükóz és az inzulin koncentrációk, ugyanakkor a HDL-koleszterin szint szignifikánsan csökkent ($P < 0,05$) a kontrollokhöz képest. Az obez kontroll csoportba súlyosan elhízott (BMI: $35,8 [31,6-37,3] \text{ kg/m}^2$), de nem diabeteses személyeket vontunk be.

A felszíni P-selectin pozitívitas alapján fokozott vérlemezke aktivációt figyeltünk meg DM2-ben ($7,2 \pm 5,1 \%$, $P < 0,001$), ami már obezitásban is megmutatkozott ($3,5 \pm 1,5 \%$, $P = 0,003$) az egészséges kontrollokhöz ($1,8 \pm 0,9 \%$) képest. A statin kezelés mellett a betegek enyhe trigliceridszint emelkedést, és normál egyéb lipid paramétereket mutattak, így a hyperkoleszterinaemia hatását kizárhattuk.

Az intracelluláris P-selectin mellett szolubilis formában a plazma mintákban is meghatároztuk a fehérje koncentrációját, mert elsősorban a vérlemezke aktiváció során a sejtfelszínre kikerült P-selectin ún. „shedding” mechanizmussal lehasítható. Az egészséges kontrollokhöz hasonlítva, a DM2 betegek vérlemezke mintáiban szignifikánsan magasabb volt az intracelluláris fehérje koncentrációja (250 ± 33 vs. $304 \pm 39 \text{ ng/mL}$, $P = 0,045$). A plazma mintákban is emelkedett szolubilis P-selectin szinteket tapasztaltunk ($26,6 \pm 7,4$ vs. $35,4 \pm 5,6 \text{ ng/mL}$, $P = 0,050$).

A vérlemezkek 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 közül a miR-223 a P2Y₁₂ ADP-receptor, a miR-26b és miR-140 a P-selectin (SELP) receptor expresszióját befolyásolhatja, valamint a miR-126 is hatással lehet a vérlemezke aktivációra. 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. Ez az eltérés nagy mértékű volt ($P < 0,001$) a vizsgált miRNS-ek esetében a BMI-illesztett, nem diabeteses obez egyénekhez viszonyítva is.

Ezután megvizsgáltuk, hogy milyen abnormális folyamatok állhatnak a csökkent thrombocyta miRNS szintek hátterében DM2-ben. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy az érett miRNS előalakjából, a pre-miRNS-ből is kevesebb expresszálódik a thrombocytákban. Ezért RT-qPCR módszerrel vizsgáltuk a vérlemezkék 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.

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

Mivel az extracelluláris miRNS-ek többsége a vérlemezkékből származik, 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 az egészséges kontrollokhoz képest.

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, ami arra utalhat, hogy már a MK sejtekből kevesebb kerülhet a lefűződő vérlemezkékbe. Ennek érdekében az *in vitro* körülmények között kialakított hyperglycaemiás modellben vizsgáltuk a MK sejtek miRNS expresszióját.

A hyperglycaemia hatására mindkét MK sejt kultúrában egy csökkenő tendenciát láttunk a miRNS expressziókban, ami 24 óra elteltével már szignifikánsan alacsonyabb 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. 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. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az érett miRNS szintek csökkenéséért a MEG-01 MK sejtekben döntően a megváltozott Dicer aktivitás lehet a felelős.

A hyperglycaemia hatására lecsökkent miRNS expressziók miatt emelkedett a cél mRNS-ek szintje vérlemezkékben és MK sejtekben

A vérlemezkékben nagy mennyiségben megtalálható miRNS-ek közül a miR-223 a P2RY12, míg a miR-26b és a miR-140 a P-selectin (SELP) génjének mRNS-ét szabályozhatják a TargetScan humán predikciós program (Release 7.0, www.targetscan.org) alapján. Ezért megvizsgáltuk, hogy a csökkent miRNS szintek hatására hogyan változott a

vérelemezkekben 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 kontrollokhöz képest. A csökkent miR-26b és miR-140 szintek mellett a SELP mRNS expressziója szintén jelentősen magasabb ($P=0,005$) volt DM2-ben. Ezzel párhuzamosan a glükóz kezelt MEG-01 MK sejtekben is hasonló mértékű emelkedést ($P<0,05$) detektáltunk mindkét mRNS esetében 24 óra elteltével.

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 mimic-ek hatására a miR-26b és a miR-140 fokozottan expresszáldott, míg a specifikus miRNS inhibitor-ok jelentősen gátolták ezen miRNS-ek szintjét az MK sejtekben. A miRNS szintek megváltoztatása után megmértük a miR-26b és a miR-140 SELP mRNS-re kifejtett hatását. A SELP mRNS mennyisége jelentős mértékben csökkent mindkét miRNS mimic hatására. A negatív kontrol 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, $P<0,05$). Az anti-miR-26b és az anti-miR-140 a SELP mRNS szignifikáns emelkedéséhez ($P<0,05$) vezetett.

A miRNS expressziók Dicer függőségének vizsgálata calpain inhibitor használatával

A DM2-ben tapasztalt csökkent miRNS expressziók hátterében a kisebb pre-miRNS szintek mellett az alacsonyabb Dicer aktivitás is állhat, mivel az enzim működését jelentősen befolyásolják a calpainok. Ezért, ha a calpainokat specifikus inhibitorral, a calpeptinnel gátoljuk, megvédjük a Dicer 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.

A BMS és DES sejtaktiváló hatásának összehasonlítása stabil anginás betegekben

A betegek demográfiai és klinikai jellemzői

Jelen tanulmányban 28 BMS és 21 DES kezelésben részesült stabil anginás beteg vérmintáiban vizsgáltuk a vérelemezke és endothelsejt aktivációs markerek szintjét. A betegcsoportok korban és nemben azonosak voltak és nem volt különbség a társbetegségek (DM2, magas vérnyomás vagy hypercholesterinaemia) jelenlétében és a dohányzási

szokásokban sem. A beavatkozást követően a betegeket 6 hónapon keresztül követtük, amely során a klinikus nem tapasztalt szenttrombózist, azonban 6 BMS betegben ISR alakult ki.

A szent beültetést követő hemosztázis eltérések monitorozásakor 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. A medián FM értékek ugyanakkor a referencia tartományban (<10 mg/L) maradtak. A szent 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.

A vérlemezke aktivációs markerek változása a szent kezelést követően

A kettős thrombocytá funkció gátló terápia ellenére mindkét szent típus alkalmazása mellett fokozott vérlemezke aktivációt figyeltünk meg a szent 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] %; $P=0,574$). 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 ($P=0,048$). A szolubilis CD40L szintek a referencia tartományon (<100 pg/mL) belül maradtak a követés során mindkét csoportban.

A szentelés okozta vaszkuláris sérülést követően az aktiválódott vérlemezkékből nagy mennyiségű PDGF-BB is kikerülhet a keringésbe, ami a simaizomsejtek proliferációját stimulálhatja. Mindezek ismeretében meghatároztuk a plazma minták PDGF-BB szintjét is ELISA módszerrel. Azoknál a betegeknél, akiknél a BMS mellett kialakult az ISR, átlagosan magasabb PDGF-BB koncentrációkat mértünk a szentelés után 1 hónappal a komplikációt nem mutató BMS betegekhez és a DES csoporthoz képest. A DES csoportban ugyanakkor a PDGF-BB szintje önmaga kiindulási értékéhez képest jelentősen lecsökkent ($P=0,004$) 1 hónappal a beavatkozást követően, ami részben magyarázhatja, hogy miért nem alakult ki ISR ebben a csoportban.

Az endothelsejt aktivációs markerek koncentrációjának változása a két kohorszban

A szentelés 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. A DES csoportban nem

tapasztaltunk ilyen mértékű eltérést, a legtöbb esetben a referencia tartományon belül (50-160 %) voltak az értékek.

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, 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.

Az ISR-ben emelkedett sejtaktivációs markerek

A BMS kezelésben részesült betegek közül 6 esetben ISR alakult ki a követési idő alatt, szemben a DES csoporttal, ahol nem volt ilyen komplikáció, ezért a csoportbontás után is megvizsgáltuk a leukocytá és endothelsejt aktivációs markerek eredményeit.

A szolubilis CD40L és az ICAM-1 szintek elsősorban a fehérvérsejtek aktivációját jelzik. Habár a teljes BMS és DES csoport között nem tapasztaltunk különbséget, az ISR jóval magasabb szolubilis ICAM-1 ($P=0,046$) és CD40L ($P=0,032$) koncentrációk jelenlétében következett be, jelezve a nagyobb mértékű leukocytá aktivációt és gyulladást. Ehhez hasonlóan az endothelsejt aktivációs markerek az E-selectin, a VCAM-1 és a vWF szintek is jóval magasabbak voltak ISR-ben a DES csoporthoz képest. Ez a változás különösen a szolubilis E-selectin és a vWF esetében volt statisztikailag jelentős mértékű ($P=0,032$ és $P=0,011$), míg a VCAM-1 esetében egy hasonló irányú tendenciát tapasztaltunk ($P=0,160$).

Az everolimus endothelsejt aktivációt csökkentő hatásának vizsgálata *in vitro*

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

A sztentelés okozta 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 VCAM1 mRNS-ek szintje a TNF- α koncentrációjának (100 ng/mL) és az inkubálási idő (1-4 óra) függvényében markánsan növekedett, amit az everolimus (0,5 μ M) koncentráció függő módon szignifikánsan csökkenteni tudott HCAEC ($P<0,001$) és HUVEC ($P<0,001$) sejtekben. A gyógyszer önmagában nem volt jelentős hatással a sejtek működésére

és a DMSO sem befolyásolta a celluláris folyamatokat. A TNF- α kezelés hatására bekövetkező endothelsejt aktiváció következtében nagy mennyiségű E-selectin és VCAM-1 szabadult ki a HCAEC sejtekből. Az everolimus az mRNS szintek befolyásolásán keresztül a fehérjék koncentrációját (E-selectin, $P=0,001$ és VCAM-1, $P<0,001$) is képes volt szignifikánsan csökkenteni. Ezek az előzetes *in vitro* eredmények magyarázattal szolgálhatnak, hogy a DES csoportban miért lehetett kisebb mértékű az endothelsejt aktiváció és ezáltal alacsonyabbak az E-selectin/VCAM-1 szintek a plazma mintákban.

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 a TNF- α citokinnel kiváltott gyulladást az emelkedett IL-1 β és IL-6 mRNS szintek igazolták, amik már 1-4 órával a kezelés után jelentős mértékűek voltak. Ezt a nagyfokú gyulladással való válaszreakciót az everolimus már 1 óra alatt szignifikánsan redukálta, ami 4 órát követően még kifejezőbbé vált az IL-1 β ($P<0,002$) és az IL-6 ($P=0,004$) mRNS esetén is.

Az everolimus hatása az NF- κ B útvonal aktivációjára

Az NF- κ B útvonal aktivációja során a p65 transcriptiós faktor a citoplazmából bejut a sejtmagba, ahol gyulladással kapcsolatos gének transcriptióját serkenti, ezért a magtranszlokáció mérésével következtetni lehet a gyulladással való válaszreakció mértékére. Megvizsgáltuk, hogy az everolimus hatása a korai p65 transzlokáció gátlásán keresztül megy-e végbe. Ehhez a HCAEC sejteket rekombináns TNF- α -val (100 ng/mL) 1 órán keresztül kezeltünk everolimus (0,5 μ M) vagy 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. Ezekkel a kísérletekkel igazolni tudtuk, hogy az everolimus az NF- κ B útvonal gátlásán keresztül fejti ki gyulladáscsökkentő hatását.

A SELE és a VCAM1 gén transcriptiós szintű szabályozása és az everolimus hatása az enhancer RNS-ek kifejeződésére

HUVEC sejtekben az RNS polimeráz II, a p65 jelenlétében és az aktív gén promóter 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

TNF- α stimulus hatására a SELE__{-11Kb} (P=0,027) és VCAM1__{-10Kb} (P=0,017) eRNS-ek expressziója fokozódott, amit az everolimus 1 órás kezelést követően csökkenteni tudott (P<0,05) a HCAEC sejtekben. Mindezek alapján azt gondoljuk, hogy az everolimus a p65-höz kapcsolt eRNS-ek represszálásán keresztül gátolni tudja a SELE és VCAM1 gének fokozott transcriptióját, ezzel mérsékelve az endothelsejt aktiváció szintjét.

Az endothelsejt aktiváció posttranscriptiós szabályozása

Az E-selectin és VCAM-1 gének posttranscriptiós szabályozása miRNS-ek által is történhet. A komplementaritás alapján a miR-181b szerepét analizáltuk *in vitro* TNF- α stimulált HCAEC és HUVEC sejt kultúrákban, valamint megvizsgáltuk az everolimus potenciális szabályozó funkcióját is. A TNF- α -val kiváltott sejtaktivációs folyamatokat a gyulladás specifikus miRNS-ek expresszió változásán keresztül is követtük.

A miR-155, miR-146a és miR-185 szintek jelentősen megemelkedtek a nem kezelt mintákhoz képest (P<0,001) mindkét sejt típusban, ami az IL-1 β és IL-6 mRNS-ekhez hasonlóan jelezte a TNF- α által kiváltott gyulladásos válaszreakciót és az endothelsejt diszfunkciót. 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 hatására, ami hozzájárulhat a SELE és VCAM1 mRNS szintek további emelkedéséhez. A gyulladásos citokinnel 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 HCAEC (P=0,042), mind a HUVEC (P=0,049) sejtekben szignifikánsan magasabb miR-181b szinteket detektáltunk.

Ezt követően tanulmányoztuk, hogy a miR-155 és 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 miR-181b prekursor formáinál. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy ezen miRNS-ek expressziója a transcriptiójuk szintjén szabályozódik, amit a TNF- α és az everolimus regulálhat.

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

Az endothelsejtek érett miR-181b szintjét specifikus miRNS mimic-et használva „mesterségesen” fokoztuk, ami következtében a SELE (P=0,006) és VCAM1 (P<0,001) mRNS-ek expressziója jelentősen lecsökkent a negatív kontrol mimic-kel (NEG-01) transzfektált mintához képest. Az *in vitro* kísérletes modellünkben tehát igazolni tudtuk a miR-181b SELE és VCAM1 mRNS-ek szabályozásában betöltött direkt szerepét.

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

Az Open Array analízissel 66 miRNS-t detektáltunk a sztentelt betegek plazma mintáiban. ISR-ben 17 miRNS expressziója nagyobb, mint másfélszeres mértékben (fold change $\geq 1,5$) csökkent (pl. miR-126, miR-223, miR-424), míg 23 másik miRNS szintje ugyanilyen mértékben emelkedett (pl. miR-155 és miR-185) a komplikáció nélküli BMS és a teljes DES csoporthoz képest.

Az *ex vivo* plazma mintákban tapasztalt magasabb TNF- α koncentrációk mellett a markánsan emelkedett keringő miR-155 (P<0,01) és miR-185 (P<0,001) expressziók is alátámasztják az ISR-ben kialakult vaszkuláris gyulladós folyamatokat. Az E-selectin és VCAM-1 expressziókat szabályozó miR-181b szintje szignifikánsan kisebb volt ISR-ben a BMS (P=0,035) és DES (P=0,034) csoportokhoz képest. A miR-424 egy másik endothelsejt aktivációs marker, a vWF kifejeződését szabályozhatja. Az Open Array analízissel kapott eredményeket validálni tudtuk a teljes betegcsoportban a miR-424 esetében is, miszerint a miRNS szintje jelentős mértékben lecsökkent (P<0,010) a komplikáció nélküli csoportokhoz képest. 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, ezért mint „kontroll miRNS-ek” szolgáltak a méréseink során.

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.

Megbeszélés

A cukorbetegség okozta gyulladáshoz és trombotikus komplikációk gyakori kialakulása, továbbá a koronária betegségek miatt szükségessé váló sztent beültetésekhez esetlegesen társuló klinikai szövődmények 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 sejtaktivációt csökkentő hatását.

Az utóbbi években vált ismertté, hogy a vérlemezkek nagy számban és relatíve nagy mennyiségben miRNS-t és mRNS-t hordoznak. A miRNS-ek a gének egy jelentős részének a posttranscriptiós finomszabályozásában vesznek részt a cél mRNS-ek működésének gátlásán keresztül. 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 szerepét olyan betegségekben is, melyben a thrombocyták fokozott aktivációs állapotba kerülnek, pl. DM2-ben vagy septicus állapotban. 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 sejté és a keringésben thrombocytáké is. A megváltozott metabolikus környezetben a vérlemezkek 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 az obezításban is kimutatott vérlemezke aktiváció többek között emelkedett sejt felszíni és szolubilis P-selectin expresszióval jellemezhető.

Az eddig megjelent közlemények többsége a keringő, szérumban vagy plazmában megmért miRNS-ek expressziójának változását vizsgálta DM2-ben és obezításban, ezért kevés információ áll rendelkezésre a humán MK és vérlemezke miRNS-ek szintjének és

funkciójának változásáról ezekben a betegségekben. Mások vizsgálták, hogy a reaktív thrombocytákban csökkent a miR-96 és emelkedett a VAMP8 cél mRNS és fehérje szintje, ami hozzájárult a vérlemezkék fokozott szekréciójához. 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. Ezek az eredmények felvetik a thrombocyta miRNS-ek szerepének fontosságát az adott vérlemezke fehérje vagy receptor expressziójának 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. 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 MK sejt kultúrákban *in vitro* is modelleztük, illetve analizáltuk a miR-26b és a miR-140 kapcsolatát a SELP mRNS-sel.

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, és az emelkedett felszíni P-selectin értékek már obezításban is megmutatkoztak az egészséges személyekhez viszonyítva. Mind a vérlemezke, mind a plazma mintákban az intracelluláris/szolubilis forma jelentősen magasabb koncentrációit 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 termelődik a tartósan fennálló metabolikus stimulus hatására. Mindez fokozhatja a heterotipikus aggregátumok kialakulását, a gyulladós és atherotrombotikus szövődmények bekövetkezését.

A fenti eredmények alapján célunk volt a DM2-hoz társult vérlemezke aktiváció szabályozásában szerepet játszó miRNS expressziók analízise. A miR-223 szintje a kontroll csoportokhoz képest jelentős mértékben lecsökkent a DM2 betegek vérlemezkéiben. A vérlemezke mintákban megmértük a miR-223 által szabályozott P2RY12 mRNS expresszióját, ami jelentősen magasabb volt DM2-ben, mint az egészséges kontrollokban. A thrombocyta reaktivitásban jelentős szereppel bíró P2Y12 receptor mediált útvonal és a

fokozott receptor expresszió magas koleszterin koncentrációk és DM2-ben között szoros összefüggést találtak. Összességében elmondható, hogy a DM2-ben megváltozott miR-223 expresszió a P2RY12 szabályozásán keresztül befolyásolhatja a vérlemezke aktivációt.

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. A vérlemezkék miR-26b és miR-140 expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt DM2-ben az egészséges és az obez 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 expresszlódott, míg a miRNS inhibitor-ok jelentősen gátolták ezen miRNS-ek szintjét. A SELP mRNS mennyisége jelentős mértékben csökkent mindkét miRNS mimic hatására, míg az anti-miR-26b és az anti-miR-140 a SELP mRNS szignifikáns emelkedéséhez vezetett. A vérlemezkékben megtalálható több száz miRNS közül azonban más miRNS-ek is részt vehetnek a P-selectin expresszió szabályozásában.

A thrombocyták csökkent miRNS tartalma arra utalhat, hogy már a MK sejtekből kevesebb miRNS kerülhet a lefűződő vérlemezkékbe. Ennek érdekében magas glükóz koncentráció mellett fenntartott MEG-01 és K562-MK sejtek érett miRNS expresszióját vizsgáltuk. 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. Eredményeink összhangban vannak egy korábbi feltételezéssel, miszerint a MK sejtek hyperglycaemia hatására abnormális vérlemezkéket produkálnak, melyek a megnövekedett sejtfelszíni glikoprotein receptorok miatt könnyebben aktiválódhatnak a keringésben.

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.

A DM2-ben tapasztalt csökkent miRNS expressziók hátterében a kisebb pre-miRNS szintek mellett az alacsonyabb Dicer aktivitás is állhat. A hyperglycaemiás MK sejtekhez

adott calpain inhibitor (calpeptin) korrigálta a glükóz által lecsökkentett Dicer aktivitást, ami javította a thrombocytá miR-223 és miR-26b expressziókat.

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

Az utóbbi években számos klinikai közlemény jelent meg a DES kedvező hatásairól szemben a hagyományos fémsztentekkel. A DES gyulladáscsökkentő és sejtproliferációt gátló hatással bíró mTOR inhibitor típusú gyógyszerét (pl. everolimus, sirolimus és ezek analógjai) két fázisban bocsátja ki az érintett érszakaszba a beültetést követő kb. 2-3 hónap alatt, és ezáltal lassabb endothelizáció és simaizomsejt proliferáció alakul ki, ami az ISR kockázatát jelentősen csökkenti. A DES és BMS különböző típusainak hatékonyságát bár jónéhány klinikai tanulmányban vizsgálták, kevés információ áll rendelkezésre a kétféle sztent különböző sejt típusok aktivációját érintő direkt hatásáról.

Ebben a tanulmányban 28 BMS és 21 DES kezelésben részesült stabil anginás betegtől származó vérmintákban hasonlítottuk össze a vérlemezke, a fehérvérsejt és az endothelsejt aktivációs markereket. A betegtől egységesen három időpontban gyűjtöttünk mintákat. A sztentek beültetését követően a D-dimer és a fibrinogén szintekben nem voltak különbségek, azonban 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. A beavatkozást követően a betegeket fél éven keresztül követtük, amely során nem tapasztaltunk sztent trombózist, azonban 6 BMS betegnél (21,4 %) ISR alakult ki, ami az irodalomban leírt arányhoz (20,1%) nagyon hasonló volt, viszont a DES csoportban nem volt komplikáció.

Korábbi tanulmányokhoz hasonlóan mindkét sztent típus alkalmazása mellett – a posztimplantációs kettős vérlemezke gátló kezelés ellenére is - emelkedett vérlemezke aktivációt figyeltünk meg, ahol magasabb P-selectin expressziót és megnőtt thrombocytá eredetű mikropartikula szinteket detektáltak. 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. A szolubilis CD40L és PDGF-BB szintek azoknál a BMS betegekben voltak magasabbak, akiknél ISR alakult ki a beavatkozást követően.

Előző közleményekben emelkedett vWF szinteket mértek BMS kezelés után 24-96 óra elteltével. 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 BMS csoportban a sztent kezelés után vett plazma mintákban szignifikánsan magasabb szolubilis VCAM-1 koncentrációkat mértünk szemben a DES csoporttal. Hasonló eredményekről számoltak be más tanulmányok a BMS kezelést követően 3 nappal, valamint ISR kialakulása után is.

A BMS betegek egy részénél kialakult ISR magasabb E-selectin és VCAM-1 plazma szintekkel járt együtt, ezen gének expressziójának transcriptiós és posttranscriptiós szabályozásáról, valamint a DES által kibocsátott everolimus sejtaktivációt csökkentő hatásáról kevés információ áll rendelkezésre. A vaszkuláris gyulladós folyamatokat Palmieri és munkatársaihoz hasonlóan TNF- α aktivációval modelleztük koronária (artériás) és vénás endothelsejteken everolimus jelenlétében és hiányában. A HCAEC alkalmas sejt kultúrának bizonyult az artériás endothelsejtek vizsgálatára, míg a széles körben használt HUVEC sejtekben megerősítettük az eredményeinket.

A SELE és a VCAM1 mRNS szintje a TNF- α hatására az inkubálási idő függvényében markánsan növekedett, amit az everolimus szignifikánsan csökkenteni tudott mindkét endothelsejt tenyészetben. Az everolimus az mRNS szintek befolyásolásán keresztül a fehérjék koncentrációját is képes volt szignifikánsan csökkenteni. Ezek az *in vitro* eredmények magyarázattal szolgálhatnak, hogy a DES csoportban miért volt kisebb az endothelsejt aktiváció és az E-selectin/VCAM-1 szintek a plazma mintákban.

A HCAEC sejtekben TNF- α -val kiváltott általános gyulladós folyamatokat az emelkedett IL-1 β és IL-6 mRNS szintek igazolták. Ezt a nagyfokú gyulladós válaszreakciót az everolimus már 1 óra alatt szignifikánsan redukálta, ami 4 órát követően még kifejezőbbé vált. Az NF- κ B útvonal aktivációja során a p65 a citoplazmából bejut a sejtmagba, ahol gyulladós gének transcriptióját serkenti. Ezért megvizsgáltuk, hogy az everolimus hatása a korai p65 transzlokáció gátlásán keresztül megy-e végbe. A HCAEC sejteket 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. Ezekkel a kísérletekkel igazolni tudtuk, hogy az everolimus képes az NF- κ B útvonalat gátolni és csökkenteni az endothelsejtek gyulladós folyamatait.

Az E-selectin és VCAM-1 expressziók transcriptiós szabályozásában részt vevő gyulladási jelátviteli folyamatokat eddig LPS-el kezelt endothelsejtben vizsgálták. 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 közelmúltban megjelent közleményekben bemutatták, hogy az enhancer aktivitásra jól lehet következtetni az eRNS expresszió változásának mérésével. Ebből adódóan egy-egy kiválasztott eRNS expresszióját határoztuk meg mindkét gén esetén. A TNF- α stimulus hatására a SELE_{-11Kb} és VCAM1_{-10Kb} eRNS-ek expressziója fokozódik, amit az everolimus 1 órás kezelést követően csökkentett a HCAEC sejtekben. Mindezek alapján azt gondoljuk, hogy az everolimus a p65 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, mint ahogy azt HUVEC sejtekben már korábban vizsgálták. Jelen vizsgálatunkban a miR-181b szerepét *in vitro* analizáltuk TNF- α stimulált endothelsejt kultúrákban, valamint megvizsgáltuk az everolimus lehetséges befolyásoló szerepét is. A TNF- α -val kiváltott sejtaktivációs folyamatokat a gyulladás specifikus miRNS-ek expresszió változásán keresztül követtük. Az irodalmi adatokkal egyezően a miR-155, miR-146a és miR-185 szint jelentősen megemelkedett a nem kezelt mintákhoz képest mindkét sejttypusban, ami jelezte a TNF- α által kiváltott gyulladási válaszreakciót és egyben a bekövetkező endothelsejt diszfunkciót. Ezen miRNS-ek fokozott expressziója az everolimus jelenlétében viszont nem következett be.

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

A korábban megjelent HUVEC sejtekkel végzett kísérletek 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 endothelsejték érett miR-181b szintjét specifikus miRNS mimic-vel jelentősen fokoztuk, ami következtében a SELE és VCAM1 mRNS-ek expressziója jelentősen lecsökkent a negatív kontrol mimic-vel (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 direkt szerepét.

Az ISR kialakulásának hátterében a keringő miRNS-ek mennyiségének alakulását is megvizsgáltuk, 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 gyulladásos folyamatokat. 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 markernek, a vWF-nak az expresszióját szabályozhatja, a miR-424 szintje is jelentős mértékben csökkent a komplikáció nélküli csoportokhoz képest.

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

Összefoglalás

A miRNS-ek jelentős szerepet játszanak számos betegség patomechanizmusában a gének expressziójának szabályozásán keresztül. A vérlemezkék és az endothelsejtek abnormális metabolikus és gyulladásos környezetben aktiválódhatnak, ami trombotikus és vaszkuláris szövődmények kialakulásához vezethet. A kísérletes munkánk célja vérlemezke, MK és endothelsejt 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 obez 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 gyógyszert eluáló koronária sztentek eltérő mértékben befolyásolták a thrombocyta 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 represszálásán 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.

Az értekezés új tudományos eredményei

1. DM2-ben alacsonyabb vérlemezke és keringő miR-223, miR-26b és miR-140 expressziók detektálhatók, melyek hátterében a csökkent Dicer funkció és az 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 vérlemezékben 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 az everolimust eluáló sztentek (DES) eltérő mértékben befolyásolták a thrombocyta és endothelsejt aktivációt 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 represszálsán 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 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.



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 tudánymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.



Debrecen, 2018.08.28.

Köszönetnyilvánítás

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** Professor 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 segítségükre voltak.

Nagyon köszönöm **Mátyás Erzsébetnek**, **Dr. Póliska Szilárdnak**, **Dr. Czimmerer Zsoltnak** és **Dr. Penyige Andrásnak** a metodikák beállításában 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 **Társ szerzőknek**, akik az eredmények interpretálásával és a reagensek biztosításával nagyban hozzájárultak a közlemények elkészítéséhez.

Továbbá, köszönettel tartozom **Dr. Góth László** Professor Úrnak, hogy TDK-s hallgató koromban bevezetett a kutatás rejtelseibe 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 érkeletési 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.