

Vér-eredetű extracelluláris vezikulák hatásának vizsgálata a humán *in vitro* oszteoklasztogenezisre

Doktori értekezés

Dr. Marton Nikolett

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Nagy György, DSc., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Kovács László, Ph.D., egyetemi tanár

Dr. Nagy Zsolt, Ph.D., egyetemi docens

A szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Vásárhelyi Barna, DSc., egyetemi tanár

A szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Bácsi Attila, DSc., egyetemi docens

Dr. Szalay Balázs, Ph.D., szakorvos

Budapest, 2017.

TARTALOMJEGYZÉK

1.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
2.	BEVEZETÉS.....	14
2.1.	Extracelluláris vezikulák.....	15
2.1.1.	Az extracelluláris vezikulák típusai, keletkezésük módja	15
2.1.2.	Intercelluláris kommunikáció extracelluláris vezikulákkal	20
2.1.3.	Az extracelluláris vezikulák szerepe a diagnosztikában.....	23
2.1.4.	Az extracelluláris vezikulák terápiás felhasználási lehetőségei	24
2.1.5.	Az extracelluláris vezikulák izolálásának, tárolásának és vizsgálatának kihívásai	24
2.2.	Oszteoklasztok	27
2.2.1.	A csontszövet és a csontsejtek általános jellemzése.....	28
2.2.2.	A csontfaló sejtek fejlődése	29
2.2.3.	A csontbontás folyamata	34
2.2.4.	Oszteoimmunológia.....	35
2.2.5.	A csontfaló sejtek kóros működésével társuló kórképek.....	39
2.2.6.	Csontsejtek és extracelluláris vezikulák	45
2.3.	A reumatoid arthritisz és az arthritisz pszoriátika	46
2.3.1.	Reumatoid arthritisz	46
2.3.2.	Arthritisz pszoriátika	52
2.3.3.	A reumatoid arthritisz és az arthritisz pszoriátika összehasonlítása.....	56
3.	CÉLKITŰZÉSEK	61
4.	MÓDSZEREK.....	62
4.1.	Donorok.....	62
4.2.	Kísérleti állatok.....	64

4.3.	Sejtvonal	64
4.4.	Extracelluláris vezikula izolálás vérmintákból és sejtfelülűszóból	65
4.5.	Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM).....	67
4.6.	Dinamikus fényszórásmérés (DLS= dynamic light scattering)	67
4.7.	A vezikulák méreteloszlásának és koncentrációjának mérése „rezisztív pulzus érzékelő módszerrel”	67
4.8.	Western blot.....	68
4.9.	Áramlási citometria.....	70
4.10.	Immunkomplexek előállítása	72
4.11.	<i>In vitro</i> oszteoklaszt differenciáltatás	72
4.12.	Viabilitás mérés	75
4.13.	Génexpresszió vizsgálata kvantitatív valós idejű RT PCR módszerrel	76
4.14.	Statisztika.....	76
5.	EREDMÉNYEK	78
5.1.	Extracelluláris vezikula izolálási és tárolási protokoll beállítása, a preparátumok jellemzői.	78
5.1.1.	A centrifugálás optimális időtartamának meghatározása	78
5.1.2.	A tárolási hőmérséklet hatása a preparátumok eltarthatóságára.....	81
5.1.3.	Sejtkezelésekhez használt EV preparátumok paraméterei	83
5.2.	A plazma eredetű exoszómák és mikrovezikulák hatásának vizsgálata a humán <i>in vitro</i> oszteoklasztogenezisre egészséges egyének mintáin.	87
5.3.	Reumatoid arthritisben és perifériás típusú arthritisz pszoriaticában szenvedő donorok vérében jelenlévő exoszómák és mikrovezikulák hatása a csontfaló sejtek <i>in vitro</i> differenciálódására.	93
5.4.	Az extracelluláris vezikulák <i>in vitro</i> oszteoklasztogenezisre gyakorolt hatásmechanizmusának feltérképezése.....	96
6.	MEGBESZÉLÉS.....	101

7.	KÖVETKEZTETÉSEK	109
8.	ÖSSZEFOGLALÁS	110
9.	SUMMARY	111
10.	IRODALOMJEGYZÉK	112
11.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	141
11.1.	Az értekezéshez felhasznált közlemények listája	141
11.2.	Az értekezéshez fel nem használt cikkek listája	142
12.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	144

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

$\alpha_v\beta_3$	integrinek	integrins
ABP	annexin-kötő puffer	annexin binding buffer
ACD-A	citromsavas, dextróz, adenines alvadásgátló anyag	acid citrate dextrose - adenine
ACPA	ciklikus citrullinált peptid ellenes antitest	anti- cyclic citrullinated peptide antibody
ACR	Amerikai Reumatológus Kollégium	American College of Rheumatology
ADAPT	adaptív dialízis-szerű affinitáson alapuló technológia	adaptive dialysis-like affinity platform technology
Akt	protein kináz B	protein kinase B
α -MEM	oszteoklaszt tenyészetéhez ajánlott táp	minimal essential medium α
ANOVA	varianciaanalízis	analysis of variance
anti-CARP	karbamilált peptid ellenes antitest	anti- carbamylated protein antibody
AP	arthritis pszoriatika	psoriatic arthritis (PsA)
AP-1	aktivátor protein-1	activator protein-1
APC	antigén prezentáló sejt	antigen presenting cell
APO	apoptotikus test	apoptotic body
A-SAA	akut fázis szérumban amyloid A	acute phase serum amyloid A
ATCC	Amerikai Sejtgyűjtemény Bank	American Type Culture Collection

ATP	adenozin-5'-trifoszfát	adenosine-5'-triphosphate
AV	annexin V	annexin V
BAL	bronchoalveolaris mosófolyadék	bronchoalveolar lavage
BMP	csont morfogenetikus fehérje	bone morphogenetic protein
CALCR	kalcitonin receptor	calcitonin receptor
CAM	sejtdhéziós molekula	cell adhesion molecule
CASPAR	arthritis pszoriatika klasszifikációs rendszere	Classification Criteria for Psoriatic Arthritis
c-Cbl	Casitas B-sejtes limfóma sejtvonal ubiquitin ligáz	Casitas B cell lymphoma ubiquitin ligase
CCL, CXC	kemokin ligandok	chemokine ligands
CD	sejtfelszíni molekulák gyűjtőneve	cluster of differentiation
cDNS	komplementer DNS	complementer DNA
c-Fms	makrofág kolónia stimuláló faktor receptora	colony-stimulating factor 1 receptor
c-Fos	retrovirális onkogén v-fos homológja	human homology of retroviral oncogene v-fos
c-Jun	AP-1 transzkripció faktor egység	AP-1 transcription factor subunit
Cl-	kloridion	chloride ion
CO ₂	szén-dioxid	carbon dioxide
CPC	kalibráló partikula	calibration particules
CRP	C-reaktív protein	C reactive protein

CT	komputertomográfia	computer tomography
CTLA-4	citotoxikus T-limfocita-asszociált antigén-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4
CTSK	katepszin K	cathepsin K
DAS	betegségaktivitási index	disease activity score
DC-STAMP	dendritikus sejt-asszociált transzmembrán fehérje	dendrocyte expressed seven transmembrane protein
$\Delta\Delta C_t$	ciklus küszöb (kvantitatív PCR analízis során)	cycle threshold (during the analysis of qPCR)
DIP	disztális interfalangeális ízület	distal interphalangeal joint
DLS	dinamikus fényszórás	dynamic light scattering
DMARD	betegségmódosító antireumatikus szerek	disease modifying antirheumatic drugs
DNS	dezoxiribonukleinsav	deoxyribonucleic acid
dUTP	dezoxiuridin-trifoszfát	deoxyuridine triphosphate
ECL	erősített kemilumineszcencia	enhanced chemiluminescence
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav	ethylenediaminetetraacetic acid
ERK	extracelluláris szignál-regulálta kináz	extracellular signal-regulated kinase
ESCRT	transzporthoz szükséges endoszómális válogató komplexek	endosomal sorting complexes required for transport
EULAR	Európai Reuma Ellenes Liga	European League Against Rheumatism
EV	extracelluláris vezikula	extracellular vesicle

EXO	exoszóma	exosome
FACS	fluoreszcencia-aktiválta sejtválogatás/ citometria	fluorescence-activated sorting / flow cytometry cell
Fas	apoptózis antigén 1	apoptosis antigen 1
FasL	Fas ligand	Fas ligand
FBS	fötális borjúsavó	fetal bovine serum
FCM	áramlási citometria	flow cytometry
FITC	fluoreszcein izotiocianát	fluorescein isothiocyanate
FL	fluoreszcens tengely áramlási citometria során	fluorescence (axis during flow cytometry analysis)
FSC	előreszórás	forward scatter
FSH	follikulus stimuláló hormon	follicle stimulating hormone
GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát	glyceraldehyde 3-phosphate
GM130	Golgi mátrix protein 130	Golgi matrix protein 130
GpIIb/IIIa	glikoprotein IIb/IIIa	glycoprotein IIb/IIIa
Grb2	növekedési faktor receptor kötött protein 2	growth factor receptor binding protein 2
H ⁺	hidrogénion	hydrogen ion
HCO ₃ ⁻	hidrogén-karbonát	hydrogen carbonate
HIV	humán immundeficiencia vírus	human immunodeficiency virus
HLA	humán leukocita antigén	human leukocyte antigen
HSC	humán őssejt	human stem cell
HSP	hő sokk protein	heatshock protein

IFN	interferon	interferon
IL	interleukin	interleukin
ITG	integrin	integrin
JIA	juvenilis idiopátiás artritisz	juvenile idiopathic arthritis
LAMP	lizoszóma-asszociált membrán protein	lysosome-associated membrane protein
LIF	leukémia inhibitoros faktor	leukaemia inhibitory factor
LTB4	leukotrién B4	leukotriene B4
MAPK	mitogén aktiválta protein kináz	mitogene activated protein kinase
MCP	metakarpofalangeális ízület	metacarpo-phalangeal joint
M-CSF	makrofág kolónia stimuláló faktor	macrophage colony stimulating factor
Mf	makrofág	macrophage
MFGE8	tejzsír globulin - EGF faktor 8 protein	milk fat globule- EGF factor 8 protein
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex	main histocompatibility complex
MIF	migráció inhibitoros faktor	migration inhibitory factor
mikro BCA	fehérjekoncentráció mérésnél alkalmazott sav	micro bichinchoninic acid
mikro RNS/ miR	mikro ribonukleinsav	micro ribonucleic acid
MMP	mátrix metalloproteáz	matrix metalloprotease

MRI	mágnesesrezonancia-képalkotás	magnetic resonance imaging
mRNS	hírvivő ribonukleinsav	messenger ribonucleic acid
MTP	metatarzofalangeális ízület	metatarsophalangeal joint
MV	mikrovezikula	microvesicle
MVB	multivezikuláris test	multivesicular body
NC	sejtmag	nucleus
NFATc1	aktivált T-sejt nukleáris faktor 1	activated T cell nucleic factor 1
NF-κB	nukleáris faktor κ könnyűlánc enhancer B-sejtekben	nuclear factor κ light-chain enhancer in B cells
NK	természetes ölósejt	natural killer cell
NKG2D	természetes ölósejt receptor 2 csoport D tag	natural killer group 2 D
NO	nitrogén-monoxid	nitrogen monoxide
NP	nanopartikula (qNano készüléknél a membrán jelölése)	nanoparticule
NTA	nanopartikula „lekövető” analízis	nanoparticle tracking analysis
Oc	oszteoklaszt	osteoclast
Oct4	oktamer-kötő transzkripciósfaktor 4	octamer-binding transcription factor 4
OPG	oszteoprotegerin	osteoprotegerin
OSCAR	oszteoklaszt-asszociált immunglobulin-szerű receptor	osteoclast-associated immunglobulin-like receptor
P2X7	purinoreceptor 7	purinoreceptor 7

PAMP	patogén-asszociált molekuláris mintázat	pathogen-associated molecular pattern
PBMC	perifériális mononukleáris vérsejt	peripheral blood mononuclear cell
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat	phosphate-buffered saline
PDGF	vérlemezke-növekedési faktor	platelet-derived growth factor
PE	fikoeritrin	phycoerythrin
PerCP	peridinin-klorofill protein komplex	peridinin-chlorophyll protein complex
PFA	paraformaldehid	paraformaldehyde
PFP	vérlemezke-mentes plazma	platelet-free plasma
PGE2	prostaglandin E2	prostaglandin E2
pH	hidrogén kitevő	potentia hydrogeni
PIP	proximális interphalangeális ízület	proximal interphalangeal joint
PPAR	peroxiszóma proliferátor aktiválta receptor	peroxisome proliferator activated receptor
preOc	preoszteoklaszt	preosteoclast
PTH	parathormon	parathormone
PTHrP	parathormon-rokon protein	parathormone-related protein
PTPN22	nem receptoriális protein tirozin foszfatáz	non-receptorial protein tyrosine phosphatase
PU.1	PU boxot-kötő transzkripció faktor	PU box-binding transcription factor
PVDF	polivinildien difluorid	polyvinylidene difluoride

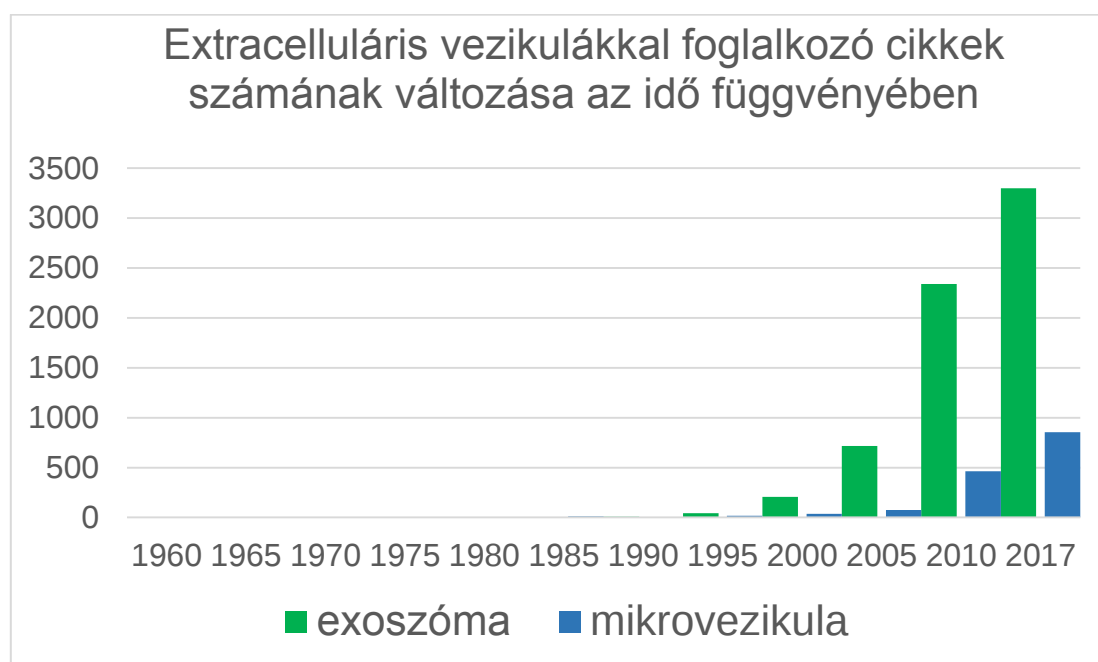
qPCR	kvantitatív láncreakció	polimeráz	quantitative chainreaction	polymerase
RA	reumatoid arthritisz		rheumatoid arthritis	
Rab	Ras-rokon protein		Ras-related protein	
Rac	Ras-sal kapcsolódó botulinum toxin szubsztrát 1		Ras-binding botulinum substrate 1	toxin
Raf	RAF gén által kódolt protoonkogén enzim		RAF gene-coded protooncogene enzyme	
RANK	nukleáris faktor κ B receptor aktivátora		receptor activator of nuclear factor κ B	
RANKL	RANK ligand		RANK ligand	
Ras	RAS gén által kódolt kis GTPáz fehérje		RAS gene coded small GTPase protein	
RF	reumatoid faktor		rheumatoid factor	
RGD	arginin-glicin-aszpartát szekvencia		arginine-glycine-aspartic sequence	acid
RISC	RNS indukálta némító komplex		RNA induced silencing complex	
RNS	ribonukleinsav		ribonucleic acid	
RPMI			Roswell Park Memorial Institute	
SEC	méretkizárásos kromatográfia		size exclusion chromatography	
shRNS	rövid hajtúszerű RNS		short hairpin RNA	
SIC	szolubilis immunkomplex		soluble immune complex	
siRNS	rövid interferáló ribonukleinsav		short interfering ribonucleic acid	
SLAP	Src-szerű adaptor protein		Src-like adaptor protein	

SLE	szisztémás lupus eritematózus	systemic lupus erythematosus
SMnase	Serratia marescens endonukleáz	Serratia marescens endonuclease
Src	nem-receptor protein tirozin kináz	non- receptorial protein tyrosine kinase
SSC	oldalszórás	side scatter
Syk	lép tirozin kináz	spleen tyrosine kinase
TfR	transzferrin receptor	transferrin receptor
TGF	tumor növekedési faktor	tumor growth factor
Th	helper T-limfocita	helper T cell
TLR	Toll-szerű receptor	Toll-like receptor
TNF	tumor nekrosis faktor	tumor necrosis factor
TNFR1	TNF receptor-1	TNF receptor-1
TRAF6	TNF asszociált faktor 6	TNF associated factor 6
TRAP	tartaráz rezisztens acidotikus foszfátáz	tartrate resistant acidotic phosphatase
Treg	regulatórikus T-limfocita	regulatory T cell
TSG101	tumor szuszceptibilitási gén 101	tumor susceptibility gene 101
TUKEB	Tudományos és Kutatásetikai Bizottság	
TUNEL	terminális deoxinukleotidil transzferáz jelölés	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

Ub	ubiquitin	ubiquitin
UH	ultrahang	ultrasound
VEGF	vaszkuláris növekedési faktor	endoteliális vascular endothelial growth factor
WB	western blot	western blot
YKT6	szinaptobrevin homológ protein	synaptobrevin homolog protein

2. BEVEZETÉS

Az extracelluláris vezikulák (EV-k, vagy az értekezésben a szóismétlés elkerülése miatt szinonimaként használt vezikulák) sejt-eredetű foszfolipid kettősréteggel határolt struktúrák, az intercelluláris kommunikáció résztvevői, amelyek mind fiziológiás, mint patológias folyamatokban szerepet játszhatnak. [1] Az extracelluláris vezikulákkal (exoszómákkal, mikrovezikulákkal) kapcsolatos tudásunk rendkívül gyorsan gyarapszik, jelenleg még friss és dinamikus fejlődő tudományterület révén sok vezikulához köthető alapvető kérdés vár tisztázásra, mint például standardizált, megbízható izolálási protokollok kidolgozása -melyek segítségével rövid idő alatt, nagy tisztaságban lehet extracelluláris vezikula preparátumokat előállítani-, képződésüknek és biológiai hatásaiknak részletes feltérképezése. (1. Ábra)



1. Ábra: Az extracelluláris vezikulákról (exoszómákról, mikrovezikulákról) szóló közlemények számának alakulása 1950-2017. között.

A vezikulákkal foglalkozó tanulmányok száma (ordináta) az ezredforulóhoz közel (abszcissza) jelentős növekedésnek indult. (Az utolsó adatpont a 2017. első félév végéig megjelent cikkek száma.)

Forrás: PubMed (pubmed.com) alapján

Az immunmediált ízületi gyulladások (arthritiszek) a népesség 0,5-1 százalékát érintik. Ezen kórképekre jelenleg még nem áll rendelkezésre teljes gyógyulással kecsegtető oki kezelés. Az arthritiszek patomechanizmusában számos immun- és kötőszöveti sejt vesz részt. [2, 3] A csontfaló sejtek (vagy másnéven oszteoklasztok) mieloid előalakból differenciálódó multinukleáris sejtek, melyek a szervezetben egyedülként képesek csontszövetet bontani. [4] Az arthritiszek patomechanizmusa során gyulladásos környezetben az oszteoklasztok képződése és aktiválódása zavart szenvedhet, mely fokálisan a csontszerkezet megváltozását eredményezheti. [5-7] A kórfolyamat pontosabb megismerése révén közelebb kerülhetünk a preklinikai diagnosztika és az oki terápia lehetőségéhez.

Dolgozatomban főként a keringésben jelenlévő extracelluláris vezikulák humán *in vitro* oszteoklasztogenezisre gyakorolt hatásával foglalkozom.

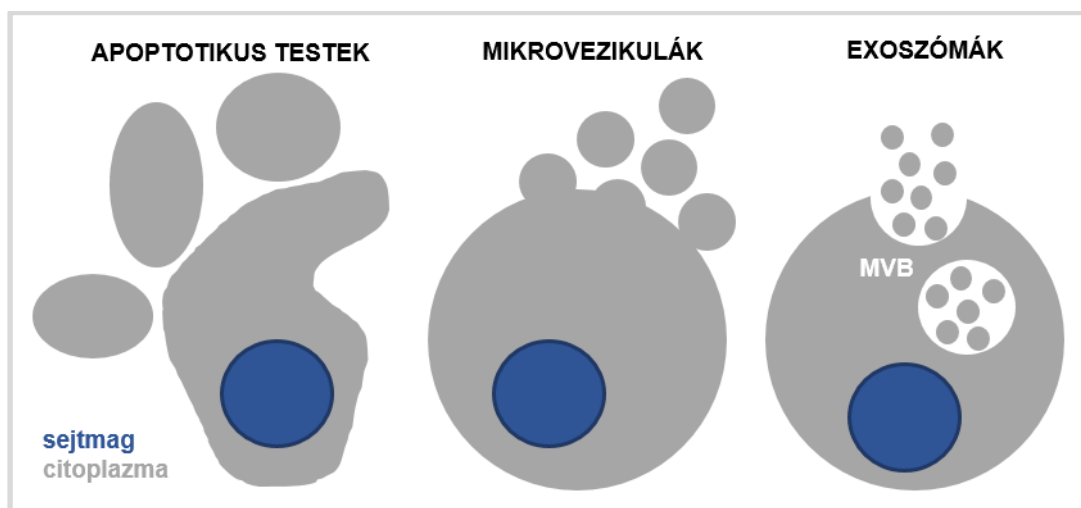
2.1. Extracelluláris vezikulák

2.1.1. Az extracelluláris vezikulák típusai, keletkezésük módja

Az extracelluláris vezikulák membránnal határolt képletek, melyeket mind az eukarióta, mind a prokarióta sejtek termelnek. [8-11] Az extracelluláris vezikulák kutatása a 20. század közepéig nyúlik vissza. Először egy 1946-ban íródott közleményben említenek egy a vérlemezke-mentes plazmában megtalálható prokoaguláns hatású precipitálható faktort, melyet 1967-ben elektronmikroszkópos felvételek alapján „vérlemezke porként” azonosítottak. [12, 13] **(1. Ábra)** Az először műterméknek véleményezett vezikulák tanulmányozása során kiderült, hogy ezek a struktúrák az intercelluláris kommunikáció új módját jelentik, mivel a donorsejtből származó molekulák segítségével eljuthatnak a recipiens sejtekhez és módosíthatják azok működését, így a vezikulák szerepet játszhatnak mind fiziológiás, mind patológias folyamatokban. [14, 15]

Az extracelluláris vezikulák szubcelluláris képletek heterogén csoportját alkotják. Az eukarióta sejtek által fiziológiásan is termelt vezikulák legjelentősebb részét a Nemzetközi Extracelluláris Vezikula Társaság (International Society for Extracellular Vesicles – ISEV, weboldal: isev.org) aktuális álláspontja szerint keletkezésük módja és átmérőjük alapján három nagyobb csoportba (apoptotikus testek,

mikrovezikulák, exoszómák) soroljuk. [1, 16] Ezen a beosztáson kívül léteznek más típusú vezikulák is, például a tumorsejtek által termelt amőboid mozgásra képes onkoszómák, illetve a baktériumok által kibocsátott vezikulák is különböznek paramétereikben. Munkám során az említett EV típusok közül az exoszómákkal és mikrovezikulákkal foglalkoztam. [17]



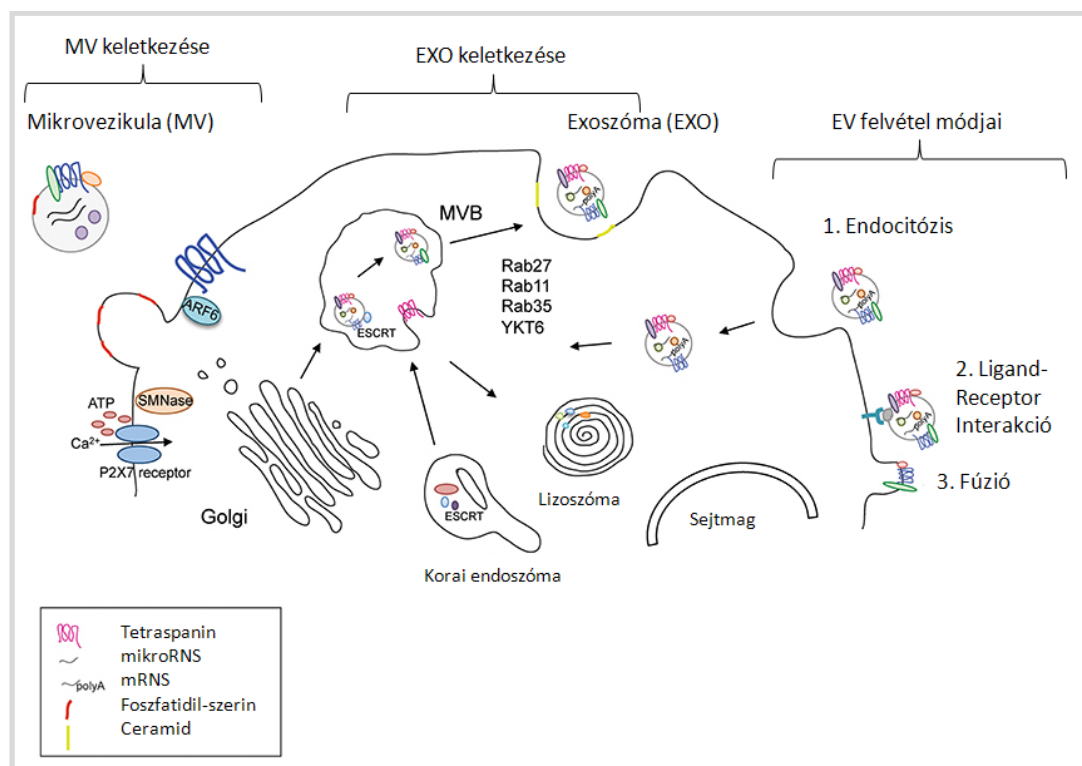
2. Ábra: Az extracelluláris vezikulák főbb fajtái és keletkezésük módja.

Az extracelluláris vezikulák jelentős része három nagyobb csoportba sorolható be méretük és képződésük alapján. Néhány μm nagyságúak a programozott sejthalál során keletkező apoptotikus testek (APO). A mikrovezikulák (MV) a plazmamembrán lefűződése révén létrejövő 100-1000 nm átmérőjű képletek, míg az exoszómák (EXO) 150 nm átmérőt meg nem haladó, multivezikuláris testek (MVB) tartalmának exocitózisa során keletkező, endoszómális markereket hordozó struktúrák.

Forrás: György B et al. (2011) Cell Mol Life Sci [18] alapján

A beosztás szerint a legnagyobbak az 1-5 μm nagyságú apoptotikus testek (APO), melyek programozott sejthalál során jönnek létre a fragmentálódó sejtekből és jelentős mennyiségű sejtmagkomponenst, így DNS-t tartalmazhatnak. [19, 20] **(2. Ábra)**

100-1000 nm átmérőjűek a plazmamembrán-eredetű ektocitózis révén kialakuló mikrovezikulák (MV, egyes közleményekben ektoszómaként vagy mikropartikulaként kerülnek említésre, dolgozatomban ezeket a megnevezéseket nem használom), melyek keletkezését intracelluláris kalcium-ion koncentráció emelkedés előzi meg. Az extracelluláris adenosin-5'-trifoszfát (ATP) szint növekedése purinerg vagy trombin csatornákat aktivál, melyen keresztül kalcium-ionok áramlanak a sejtbe, triggerelve a mikrovezikula képzést. [21, 22] **(2., 3. Ábra)**



3. Ábra: A sejtek EV felvételének módjai és a mikrovezikulák, exoszómák keletkezésének részletesebb mechanizmusa.

Az ATP-függő P2X7 vagy trombin receptorok aktiválódása révén megnő az intracelluláris kalcium-ion koncentráció, ami a foszfátidil-szerin tartalmú membránképletek lefűződését váltja ki, így keletkeznek a mikrovezikulák. Az exoszómák képződéséhez nélkülözhetetlen ESCRT fehérjék már a korai endoszómában jelen vannak. A kései endoszóma membránján megtalálható molekulák is bekerülhetnek az exoszómákba, ezt követően Rab fehérjék segítségével exocitálódnak ceramidban gazdag membránrészek környezetében. Az extracelluláris vezikulákat a sejtek mind endocitózis, mind receptor-ligand kapcsolódás és internalizáció, mind vezikula-sejtmembrán fúzió révén fel tudják venni. ATP= adenosin trifoszfát, ESCRT= eszkort fehérjék, MVB= multivezikuláris test, P2X7= purinoreceptor 7, Rab= Ras-függő protein, SMnase= Serratia marcescens endonukleáz, YKT6= szinaptobrevin homológ protein

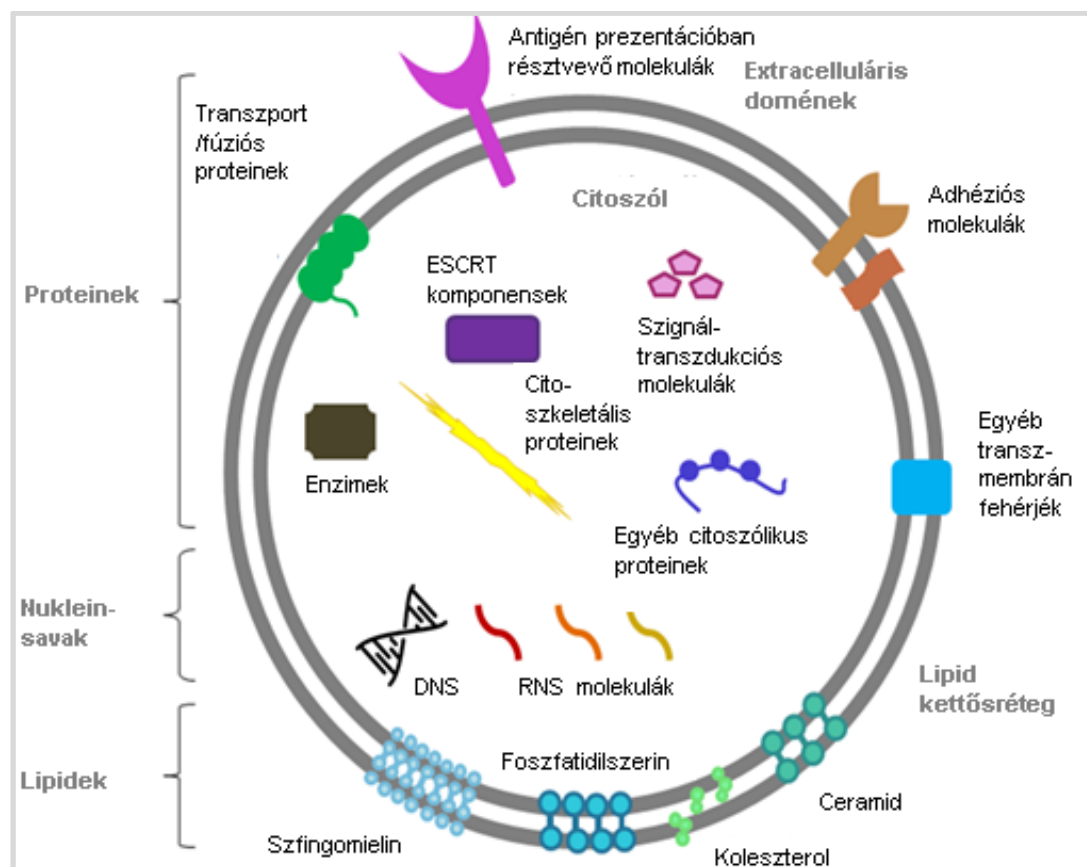
Forrás: Basso M et al. (2016) Front Neurosci [23] alapján

Az extracelluláris vezikulák legkisebb képviselői a 30-150 nm-es exoszómák (EXO), melyek a késői endoszómából létrejövő multivezikuláris testek (MVB) exocitózisa során keletkező endoszomális markereket tartalmazó képletek. [1, 24] (2., 3. Ábra) Az exoszómák kialakulása a három csoportból az eddig legrészletesebben feltérképezett folyamat. Keletkezésük során a vezikuláris komponensek koncentrációja tetraspanin fehérjék (pl. CD63, CD81) segítségével jön létre, a Rab27a és Rab27b proteinek az MVB-k plazmamembránhoz kapcsolódását segítik elő, a membránról történő leválásában pedig fontos szerep jut az ESCRT fehérjéknek. [25-29] (2., 3.

Ábra) Az extracelluláris vezikulákat a recipiens sejtek mind a struktúrák felszínén hordozott receptor/ligand molekulák megkötésén, mind endocitózis és membránfúzió révén felvehetik. [14] **(3. Ábra)**

Az extracelluláris vezikulák tartalma rendkívül széles palettán mozog: szállíthatnak intravezikulárisan mind proteineket, mind nukleinsavakat, valamint különböző lipid-természetű molekulák alkotják burkukat, amihez kötötten a donorsejtre jellemző receptorokat, ligandokat, adhéziós és fúziós proteineket tartalmazhatnak. **(4. Ábra)** Az extracelluláris vezikulákkal asszociált molekulák folyamatosan bővülő adatbázisa elérhető az interneten pl. *evpedia.info*; *exocarta.org*; *microvesicles.org* oldalakon. Korábbi kutatások során még azt feltételezték, hogy csak a feleslegessé vált molekulák csomagolódnak vezikulákba, ám későbbi eredmények rávilágítottak, hogy nem csupán diszpozibilis anyagok kerülnek beléjük a donorsejtekből. [30]

Az EV-k molekuláris összetétele meghatározza lehetséges biológiai funkcióikat. Az extracelluláris vezikulák által szállított anyagok, akár biológiailag aktívabbak is lehetnek, mint szolubilis formában, erre példa a proapoptotikus hatású FasL vezikuláris kifejeződése és erőteljes kötődése receptorához. [31] A vezikulák felszínén expresszált molekulák, mint pl. az MHC-I, MHC-II, CD9, CD63, CD81, transferrin a recipiens sejtekkel ligand-receptor kapcsolatba lépve befolyásolhatják az intracelluláris jelátviteli útvonalakat. [25, 26, 32, 33] **(4. Ábra)** Emellett a vezikulák foszfolipázokat is szállíthatnak, amelyek biológiailag aktív lipid metabolitok segítségével stimulálhatnak G-fehérje-kötött és nukleáris receptorokat. [34] A vezikulák lipidtartalma nem csupán struktúrelemként van jelen: biológiailag aktív eikozanoidokat, koleszterolt és zsírsavakat is szállíthatnak. A malignus sejt-eredetű extracelluláris vezikulák szfingomielin tartalma neoangiogenetikus hatással bír. [35] A vezikuláris lizofoszfatidilkolin limfocitákra kifejtett kemotaktikus hatása is ismert, valamint a dendritikus sejtek érését is elősegíti. [36]



4. Ábra: Az extracelluláris vezikulák molekuláris összetétele.

Az extracelluláris vezikulák biomolekulák rendkívül széles spektrumát tartalmazhatják. Membránjuk lipidekből (szfingomielin, ceramid, foszfátidilszerin, koleszterin) és fehérjékből épül fel. Membránkötötten hordozhatnak többek között adhéziós molekulákat (tetraspaninok, integrinek), receptorokat (LAMP, TfR), az anyasejtre jellemző CD markereket, antigén prezentációban szerepet játszó (MHC I, MHC II) vagy fúzióhoz szükséges fehérjéket (annexin, flotilin) is. Intraluminálisan szállíthatnak enzimeket (elongációs faktorok, GAPDH), citoszkeletális (aktin, tubulin), citoszolikus fehérjéket (hisztionok, riboszómális proteinek, proteaszóma), szignáltranszdukciós útvonalakban kitüntetett szereppel bíró molekulákat (heterotrimer G fehérjék, syntenin) és nukleinsavakat (DNS, mRNS, miRNS, egyéb nem-kódoló RNS molekulák) is. LAMP= lizoszóma asszociált membrán glikoprotein, MHC= fő hisztokompatibilitási antigén, TfR= transzferrin receptor

Forrás: Colombo M et al. (2014) Annu Rev Cell Dev Biol [1] nyomán

Az extracelluláris vezikulák által kivitelezett horizontális RNS-transzfert először egér csontvelői sejtek embrionális összejt-eredetű vezikuláris kezelése során írták le, ahol az Oct4 mRNS-tartalmú vezikulák a csontvelői sejtek Oct4 fehérje expresszióját váltották ki. [37] Az extracelluláris vezikulák DNS tartalma az RNS-nél kevésbé feltérképezett, mitokondriális és tumor-eredetű DNS előfordulását figyelték meg vezikula mintákban, melyek révén az EV-k a horizontális géntranszfer eszközei lehetnek. [38-41] Emellett sokféle fehérje természetű anyagot szállíthatnak a vezikulák

pl. enzimeket, citokineket, struktúrfehérjéket, szignáltranszdukciós molekulákat, melyek befolyásolhatják a recipiens sejtek aktivációs állapotát, módosíthatják működésüket. [1] **(4. Ábra)** A vezikulák glikolizációs mintázata eltér az anyasejtjétől. [42] Különböző patológias folyamatokban pl. petefészekrákban, policisztás vese betegségben és galaktozémiában specifikus mannóz és szialsav tartalmú glikoproteinekkal rendelkező vezikulákat írtak le. [22, 43-45]

2.1.2. Intercelluláris kommunikáció extracelluláris vezikulákkal

Ahhoz, hogy az extracelluláris vezikulák vektoriális szignalszómaként funkcionálhassanak szükséges, hogy a donorsejt vezikulákat bocsásson ki, ezek a képletek mobilisak legyenek, féléletidejük kellőképp hosszú legyen és elérjék a recipiens sejteket.

Extracelluláris vezikulák jelenlétét már számos testnedvmintában kimutatták (pl. cerebrospinális folyadék, orrváladék, nyál, bronchoalveoláris átmosó folyadék (BAL), anyatej, vér, szinoviális folyadék, epe, amnionális fluidum, ondó, méh folyadék, vizelet, széklet) ez az információ azt sugallja, hogy a vezikulák termelődése egy általános folyamat, szerepet játszhatnak a szervezet fiziológias működésének fenntartásában, emellett patológias viszonyok között megváltozhat termelődésük, funkciójuk is. [14] Napjainkban rengeteg új adat lát napvilágot az extracelluláris vezikulák biológiai hatását illetően. [14] Az értekezés limitált hossza miatt csak néhány, a dolgozat témájához illeszkedő példát emelek ki.

A vérplazmában található extracelluláris vezikulák jelentős része trombocitáktól ered, de mind a fehérvérsejtek, mind a vörösvértestek, endotélsejtek bocsátanak ki extracelluláris vezikulákat. A vérlemezkéktől származó vezikulák a véralvadást foszfatidil-szerin és glikoprotein receptor (GpIIb/IIIa) tartalmuk révén képesek befolyásolni, emellett mononukleáris vérsejtek stimulálására is képesek. [46, 47] Reumatoid artritiszben (RA) és szisztémás lupus eritematózusban (SLE) az érpályában képződő trombocita-eredetű mikrovezikulák autoantigéneket hordozhatnak, ami elősegítheti az immuntolerancia gátlását, emellett a vezikulák kapillárisokon keresztül bejuthatnak az ízületbe és ott stimulálhatják a fibroblasztokat, azok proinflammatorikus működését. [48, 49] A vérpályában található vezikulák élettartama irodalmi adatok alapján 0,5-5,5 óra között változik. [50, 51] Az EV-eket a keringésből a célszervek

veszik fel, melyek Willekens és mtsai szerint a következőképp alakulnak: máj (44,9%), csont (22,5%), bőr (9,7%), izom (5,8%), lép (3,4%), vese (2,7%), tüdő (1,8%). [52] Ezzel szemben a melanoma-eredetű extracelluláris vezikulák legnagyobb hányada a tüdőben kerül felvételre, ami azt sugallja, hogy a vezikulák biodisztribúciója nem véletlenszerű. [50] Az EV-k felszínén expresszálandó molekulák limitálják, hogy milyen sejtféleségek képesek interakcióba lépni velük pl. a B-sejt-eredetű szialosavat kifejező extracelluláris vezikulákat CD169-et (szialoadhezin) expresszáló makrofágok képesek felvenni. [53] A cirkulációban jelenlévő vezikulák fehérje és RNS tartalma megváltozhat malignus folyamatokban, mint pl. glioblasztómában és melanomában. [54] Terhességben is módosul a plazma vezikulaprofilja: növekszik az EV-k száma, illetve placenta-eredetű exoszómák is megjelennek a szisztémás keringésben. [55, 56]

Az extracelluláris vezikulák befolyásolhatják az immunrendszer működését. Szállíthatnak proinflammatorikus hatású anyagokat (pl. citokineket, antigéneket, enzimeket), amik az immunválasz propagációjában vesznek részt, illetve akár modulálhatják is a citokinek hatását. [57-59] Vírus (pl. citomegalovírus) vagy mikobaktérium fertőzött endotélsejtek és makrofágok képesek olyan vezikulákat kibocsátani, amik antigéneket transzferálnak a dendritikus sejteknek, ezzel támogatván a T-sejt dependens immunválaszt kialakulását. [60, 61] Emellett az extracelluláris vezikulák érett dendritikus sejtekről (DC) más korábbi differenciálódási stádiumban lévő dendritikus sejteknek MHC molekulákat szállíthatnak, így fokozva a tumorelles immunválaszt. [62, 63] Emellett a vezikulák közvetlenül is részt vehetnek az antigénprezentációban, mivel professzionális antigénbemutató sejt (APC pl. B-limfocita, dendritikus sejt) -eredetű vezikulák mind MHC-I, MHC-II, mind pozitív kostimulátoros molekulákat (pl. CD28) tartalmazhatnak, melyek segítségével peptid természetű antigéneket mutathatnak be a T-sejteknek. [64-66] Az APC-k és a limfociták között létrejövő immunológiai szinapszisban szintén transzferálódhatnak extracelluláris vezikulák. [67] A hízósejtek által kibocsátott vezikulák aktiválhatják a DC-ket, valamint a T-, B- limfocitákat és elősegíthetik a kereszt-prezentációt is. [68, 69] BAL folyadékból izolált extracelluláris vezikulákon is leírtak MHC expressziót, melynek szerepe lehet a mukóza asszociált nyirokszövet által közvetített immunválaszban. [70] A veleszületett immunrendszer működését is befolyásolhatják az EV-k, mivel szállíthatnak „*toll like receptorokat*” (TLR), patogén-asszociált molekuláris mintázatot

(pathogen associated molecular pattern -PAMP) pl. lipoarabinomannánt; de emellett a citokin, mRNS, miRNS tartalmú vezikulák is hatással lehetnek a veleszületett immunrendszer sejtjeire. [71-74] Neutrofil granulocita-eredetű extracelluláris vezikulák reaktív oxigén metabolit és opszonizáció független antibakteriális hatással rendelkeznek. [75] Makrofág-eredetű vezikulák naiv monociták aktiválódását válthatják ki miRNS dependens úton. [76] A vizeletben jelenlévő EV-k védő hatásúak lehetnek a fertőzésekkel szemben, mivel antimikrobiális peptideket, bakteriális és virális receptorokat hordozhatnak. [77]

Emellett az extracelluláris vezikulák nem csak immunstimuláns, hanem immunválaszt gátló hatással is rendelkezhetnek. TGF- β tartalmú exoszómák szuppresszálnak a CD8⁺ T-sejteket és elősegíthetik a regulatórikus T-limfociták (Treg) differenciálódását. A vezikulák membránkötött NKGD2 receptort is hordozhatnak, ami gátló hatással van a természetes ölő (natural killer - NK) sejtekre, így az antitumor immunválaszra is. [78, 79]

A szinoviális folyadék vezikulaprofilját leginkább autoimmun betegségekben vizsgálták. [80-82] A reumatoid arthritisz patomechanizmusa során autoantigénként funkcionáló poszttranszlációs módosulással létrejövő citrullinált peptidek eloszlásában szerepet játszanak az ízületben jelenlévő extracelluláris vezikulák. Emellett a vezikulák immunglobulinokkal is komplexet alkothatnak, citokineket, integrineket, egyéb adhéziós és sejtmag-eredetű molekulákat szállíthatnak, melyek hozzájárulhatnak a gyulladás propagációjához. [83] Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján, artrózis, reumatoid arthritiszes és juvenilis idiopátiás arthritiszes (JIA) betegek szinoviális folyadék vezikulaprofilja jelentősen eltér: RA-ban több CD41⁺ (trombocita marker), és CD3⁺ CD8⁺ (citotoxikus T-limfocitákra jellemző molekulák), valamint CD19⁺ (B-limfocita marker) mikrovezikula van jelen, mint JIA-ban és artrózisban. A vezikulaszám a sejtek mennyiségével nem mutatott korrelációt, ami arra enged következtetni, hogy a sejtek aktivációs állapotával és nem a számával áll összefüggésben a termelt vezikulák mennyisége. [80]

2.1.3. Az extracelluláris vezikulák szerepe a diagnosztikában

A sejtek által kibocsátott vezikulák száma, illetve molekuláris összetétele különböző betegségekben megváltozhat; ezek alapján az extracelluláris vezikulák diagnosztikus, prognosztikus és prediktív biomarkerként is funkcionálhatnak.

Az EV-k számát „rezisztív pulzus érzékelő eljárással” („resistive pulse sensing method”, qNano, IZON), fényszóráson alapuló technikákkal (dynamic light scattering= DLS, nanoparticle tracking analysis= NTA) és áramlási citometriával (flow cytometry= FCM) határozhatjuk meg. Szisztémás gyulladásal járó autoimmun kórképekben, mint pl. reumatoid artritiszben, Sjögren vagy antifoszfolipid szindrómában, vaszkulitiszekben, szisztémás szklerózisban és szervspecifikus autoimmun megbetegedésekben pl. szklerózis multiplex és I. típusú diabétesz mellitusz esetében a vérlemezke markerekre pozitív extracelluláris vezikulák számának növekedését írtak le. [84-86] Polimióztisben, dermatomióztisben munkacsoportunk eredményei alapján a szérumban található limfocita és monocita markereket hordozó EV-k magasabb számban fordulnak elő, mint az egészséges donorokból származó mintákban. [87] Kardiovaszkuláris betegségekben pl. szívelégtelenségben, generalizált ateroszklerózis és trombózis esetében megnövekedett mennyiségű endotél- és trombocita-eredetű extracelluláris vezikulát írtak le. [88-91] A vezikulaszám korrelálhat a kardiális történések valószínűségével, a szívelégtelenség súlyosságával, így a különböző kardiovaszkuláris események bekövetkezésének esélye megbecsülhető a vezikulák vizsgálatával. [88-94]

Emellett az extracelluláris vezikulák szállíthatnak autoantigéneket, proinflammatorikus citokineket vagy tumorantigéneket, melyek mérése informatív lehet diagnosztikai szempontból. [64, 81, 83] De nemcsak a tumorsejtektől származó EV-k módosíthatnak a donorsejttől eltérő sejttípusok működésén, azok vezikuláris fehérje expressziós mintázatán pl. prosztatata karcinóma esetén a vérlemezkek által kibocsátott vezikulákban is előfordul tumorsejt eredetű mRNS. [95] Emellett a daganatsejtekből származó, vagy malignus hatásra más sejtekben képződött vezikulák tartalmazhatnak prokoaguláns faktorokat, így hozzájárulva a daganatos betegségekben gyakori tromboembóliás szövődmények kialakulásához. [96, 97]

2.1.4. Az extracelluláris vezikulák terápiás felhasználási lehetőségei

Mivel a daganatsejt-eredetű extracelluláris vezikulák elősegíthetik a malignus transzformációt, a kórfolyamat fenntartását, valamint citokineket, autoantigéneket, miRNS-eket hordozó vezikulák részt vehetnek autoimmun reakciók indukálásában, gyulladásos válasz kiváltásában, így eltávolításuk terápiás értékkel bírhat. [54, 98] A keringésből történő kiszűrésükre kínál lehetőséget az ADAPT (adaptive dialysis-like affinity platform technology), melyet eddig az exoszómákkal megegyező mérettartományú képletek (hepatitisz C, humán immundeficiencia vírus) eltávolítására már sikeresen alkalmaztak. [96, 97, 99, 100]

Az extracelluláris vezikuláknak a sejtek közötti kommunikációban alapvető szerepe van. Azt az előnyös tulajdonságot alapul véve, hogy az EV-k különböző fehérje és nukleinsav (hírvivő, mikro, rövid hajtúszzerű, rövid interferáló RNS) természetű anyagok targetálására lehetnek alkalmasak, akár génterápiás eszközként is kiaknázhatóak. [101, 102] A vezikulákba csomagolt molekulák féléletideje megnőhet, illetve a megtervezett összetételű extracelluláris vezikulák nem testidegenek, így az immunválasz is elmarad ellenük. Az exoszómák a vér-agy gáton is képesek átjutni, mely tulajdonság különösen izgalmas terápiás felhasználási lehetőséget vet fel gyógyszer-molekulák, biológiai terápiás készítmények központi idegrendszeri bevitelével kapcsolatban. [103-105]

2.1.5. Az extracelluláris vezikulák izolálásának, tárolásának és vizsgálatának kihívásai

Az extracelluláris vezikulákkal kapcsolatos publikációk száma az elmúlt években jelentős növekedésnek indult (**1. Ábra**), ezzel párhuzamosan folyamatosan fejlődnek a vezikula izolálási, tárolási protokollok is. Jelen fejezetben összefoglalom az extracelluláris vezikulák szeparálásával kapcsolatban felmerülő gyakorlati kérdéseket.

A mintagyűjtés és tárolás módja alapvetően befolyásolhatja a kinyert vezikulák számát és minőségét. Sejtvonal-eredetű vezikula szeparálás esetén a sejteket főtális borjúsavó (FBS)-mentes, vagy extracelluláris vezikula depletált (16 óra ultracentrifugálás 100 000 g-n és 0,2 µm-es filtráció) tápoldatban kell tartani, különben az állati-eredetű vezikulák is kiülepednek az izolálás során. Testnedvek (pl. vér, ízületi

foliadék) gyűjtése esetén befolyásolhatja a preparátum minőségét a minta levételéhez használt tű átmérője, a leszorítás mértéke, a tárolási hőmérséklet és idő. [106, 107] Emellett a vérvételi csövekben használt antikoaguláns természetű anyagok is jelentős hatással vannak a preparátumokban jelenlévő vezikulaszámra. Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján az *ex vivo* vezikulaképződés a citromsavas-dextrózos (ACD-A) csőben a legalacsonyabb. [108, 109]

Mivel a vezikulák szubcelluláris részecskék, az átfedő mérettartományba eső és hasonló sűrűségű fehérjeaggregátumok, immunkomplexek, kalcium-foszfát mikroprecipitátumok, lipoproteinek, baktériumok és vírusok szennyezhetik a mintákat. [18, 110, 111] Emiatt nagyon fontos a megfelelően steril mintavétel és izolálási technika, valamint kontrollok alkalmazása a biológiai hatás detektálásához. A mikrovezikulák proteinaggregátumoktól való elkülönítésére munkacsoportunk korábban kidolgozott egy módszert, - a differenciál detergens lízist- mely a vezikulák és a szennyező proteinek eltérő detergens-érzékenységén alapul. [108] A differenciál detergens lízis lényege, hogy az áramlási citometriával lemerített szubcelluláris méretű képletek azon része mikrovezikula, amely a detergens hozzáadása után már nem detektálható. [112, 113] Az exoszómák detergens szenzitivitása munkacsoportunk eredményei alapján jelentősen elmarad a mikrovezikulákétól. [113] Az EV preparátumokról transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeket (TEM) is lehet készíteni, ahol a vezikulák kerek, vagy ovális képletekként ábrázolódnak, körülöttük az esetleges szennyező fehérjeaggregátumok leginkább szálcsás megjelenésűek. [112]

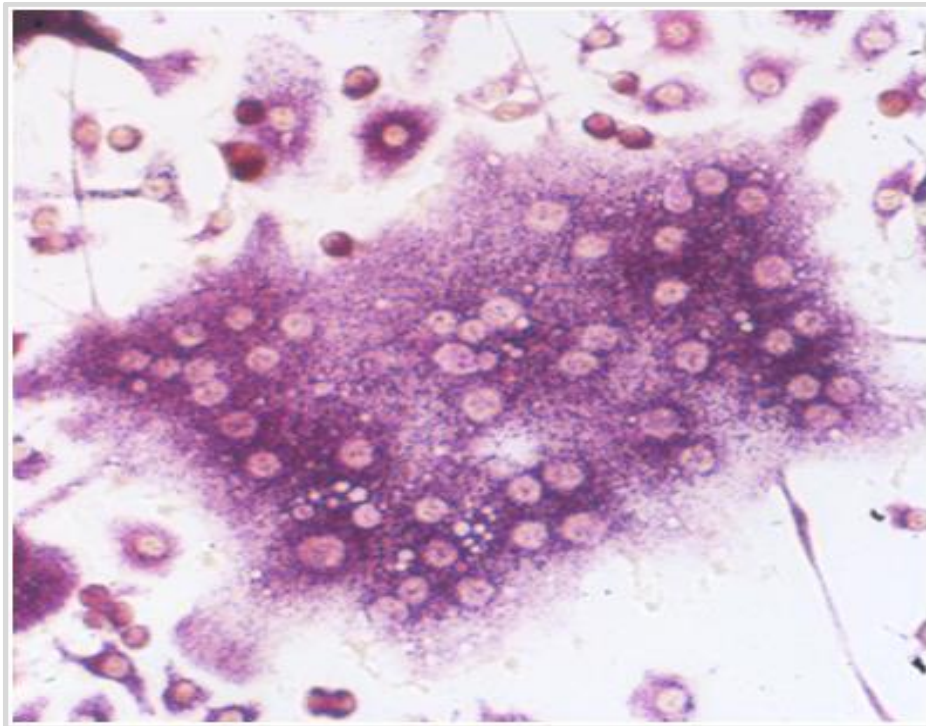
Az extracelluláris vezikulák elkülönítésére gyakorta alkalmazott módszer a differenciál centrifugálás, gravitációs szűréssel kiegészítve. [114] Ezen protokoll során először a sejtes elemeket üleptjük ki, majd egyre növekvő fordulatszámmal centrifugáljuk a mintát, közben a kontamináló elemeket (pl. vérlemezkék, szétesett sejtek, fehérjeaggregátumok) gravitációs filtrációval különítjük el. A plazma-eredetű mikrovezikulák és exoszómák vizsgálatához a perifériás vérmintákat 2500 g-n centrifugáljuk 15 percig, ami először egy vérlemezkében gazdag plazmát eredményez, ezt követően 2500 g 15 perc centrifugálással a vérlemezkék nagy részét is kiüleptjük, majd a vérlemezke-mentes plazmát 0,8 µm-es filteren szűrjük át (ráadott nyomás nélkül, a képletek diszpergálódását megelőzően). [115] Tapasztalataink alapján a mikrovezikulák 12500-20000 g, az exoszómák 100000 g nehézségi gyorsulással

ülepíthetőek ki legnagyobb effektivitással a mintából. A centrifugálást szukróz denzitás grádienssel is lehet ötvözni, ahol 1,13-1,19 g/ml sűrűségű frakcióban helyezkednek el az exoszómák és az mikrovezikulák is. [114] Minden egyes centrifugálási és filtrációs lépéssel veszítünk az izolálni kívánt vezikulapopulációból is. [109] Például a 0,8 µm-es szűrővel eltávolítjuk a nagyobb átmérőjű mikrovezikulák (800-1000 nm) egy részét. Az exoszómákat méretkizárásos kromatográfiával (size exclusion chromatography - SEC), és CD marker alapján (pl. CD63 tetraspanin molekula) történő pozitív mágneses szeparációval is el lehet különíteni. [116-119] A SEC során a fehérjeaggregátumok és az exoszómák különböző fázisban folynak át az oszlopon, de ezután egy ultracentrifugálási lépés szükséges a minta koncentrálásához. [120] A vezikulák felszínén expresszált molekula alapján történő elkülönítésnél figyelembe kell venni, hogy az extracelluláris vezikuláknak jelen tudásunk szerint nincsen egy darab jól definiált markerük, hanem marker kombinációk detekciója ad megbízhatóbb eredményt. Így az adott membránköthető molekulát nem expresszáló, de mégis az exoszóma kategóriának megfelelő vezikulákat elveszítjük a mintából. A mikrovezikuláknak az exoszómáknál is nehezebben definiálhatóak a jellemző markereik. [24, 121] Nagyrészükre jellemző a foszfatidil-szerin externalizáció, ami miatt annexin V pozitív eseményként azonosíthatóak áramlási citometria segítségével. [122] Az alkalmazott EV szeparációs eljárás a vezikulák méreteloszlását is befolyásolhatja. A vezikulák akár fuzionálhatnak is a protokoll során, így a fiziológiásnál nagyobb méretű képleteket detektálhatunk. Az előző fejezetben említett vezikulákra vonatkozó mérethatárok konszenzus protokollok eredményei, ugyanakkor vannak méretbeli átfedések a csoportok között. Egy-egy méret alapján történő elkülönítő eljárás segítségével csak bizonyos jól behatárolt átmérőjű képleteket tudunk szeparálni. [114]

A minták tárolása is kitüntetett szereppel bír. A sorozatos fagyasztás-felolvasztás a vezikuláris képleteket degradálhatja, így azok morfológiája nem lesz teljes hitelességgel vizsgálható. Valamint a vérelemzke-tartalmú plazma hűtése során a trombociták az *in vivo* vezikulakibocsátást meghaladó mennyiségű extracelluláris vezikulát generálhatnak, így nem a mintában eredetileg ténylegesen jelenlévő vezikulaszámot detektálhatjuk. Emellett idővel a képletek degradálódhatnak is a nem megfelelő hőmérsékleten tárolt mintákban. [109]

2.2. Oszteoklasztok

Az oszteoklasztok, vagy más néven csontfaló sejtek sokmagvú hematopoietikus-eredetű specializált makrofágok, melyek átmérője akár több száz μm is lehet. **(5. Ábra)** Legfőbb feladatuk a csont és az elmeszesedett porcszövet lebontása. Működésüket számos hormon, szolubilis faktor és sejt-sejt interakció is befolyásolhatja. Fokozott/megváltozott működésük megfigyelhető például csontritkulásban és immunmediált gyulladásos ízületi betegségekben, mely kórképek patomechanizmusának teljesebb megértéséhez, újszerű diagnosztikus és terápiás lehetőségek alkalmazásához járulhat hozzá a csontfaló sejtek képződésének és aktiválódásának pontos megismerése. [7, 123]



5. Ábra: A csontfaló sejt.

Az egér csontvelői sejtekből differenciáltatott kb. 200 μm átmérőjű, sokmagvú oszteoklaszt tartarát rezisztens savanyú foszfatázt (TRAP) expresszál, mely lila színreakciót ad a leukocita acidotikus foszfatáz citológiai festék komponenseivel reagálva. A fixált óriássejt körül több egymagvú TRAP pozitív csontfaló sejt előalak is megfigyelhető.

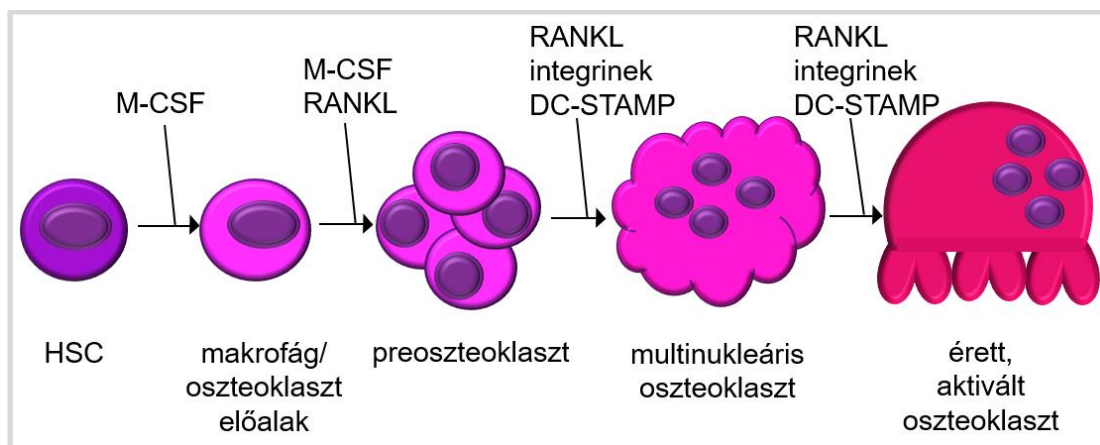
2.2.1. A csontszövet és a csontsejtek általános jellemzése

A csontszövet funkciói szerteágazóak: testünk vázát alkotja, a mozgás passzív eleme, ásványianyag- és zsírraktár, továbbá a csontvelőben zajlik a vér alakos elemeinek képzése. Emellett csontsejteink folyamatos kapcsolatban állnak immunsejtjeinkkel, így az immunhomeosztázisra is jelentős hatást gyakorolnak. [124] A csontok az egyedfejlődés és növekedés során kétféle módon képződnek: a lapos csontok dezmalis úton jönnek létre, melynek során a mezenhimából alakul át a csontszövet; a csöves csontok és a csigolyák pedig enchondrális csontosodással képződnek, mely során először porcsejtek jönnek létre, majd a benövő erek mentén alakulnak ki a porc- és a csontsejtek. [125, 126]

A csontok állományát extracelluláris mátrix és csontsejtek alkotják. A mátrix jelentős részt hidroxipatit kristályokból, kollagénekből, proteoglikánokból és egyéb nem-kollagén fehérjékből áll. A csontsejtek közé tartoznak a csontszövet felépítéséért felelős oszteoblasztok, a mátrixba beépülő, mechanoszenzoros oszteociták és a csontbontást végző oszteoklasztok. [127] Emellett a csontokban egyéb sejtfeleségek is előfordulnak, mint például a mezenhimális előalakokból fejlődő adipociták, kötőszöveti sztrómasejtek, valamint a vérképzésért felelős sejtek és a vaszkulátúra sejtjei. A csontsejtek nemcsak a csontszövet kialakulása (*modeling*) alatt aktívak, hanem egész életünk során, mivel a *remodeling*nek nevezett jelenség révén csontszövetünk folyamatos, dinamikus változáson megy keresztül, évente hozzávetőlegesen csontállományunk 5-25%-a újul meg ilyen módon. [128, 129] A remodeling folyamán a hematopoietikus eredetű csontfaló sejt előalakok fúzionálnak, létrehozva a multinukleált specializált makrofágokat, melyek felsorakoznak a bontani kívánt csontfelület mentén, majd aktiválódnak és üregeket vájnak a csontba, ezután apoptotizálnak. [129] Helyüket a mezenhimális prekursorból differenciálódó csontépítő sejtek veszik át, amelyek szintetizálják az új kollagénben gazdag szerves mátrixot (oszteoid) és előkészítik a mineralizációt. A mineralizált állomány nemcsak az alkalikus pH-n keletkező hidroxipatit-kristályokból áll, hanem ionok (pl. foszfát, bikarbonát) és nyomelemek (magnézium, cink, fluor) is beépülnek a csontba. [130] Ez az anabolikus folyamat, akár hónapokat is igénybe vehet. Inaktiválódásuk után az oszteoblasztok oszteocitákká alakulnak, mely sejteknek mechanoszenzoros receptoraik révén fontos szerepük van a remodeling helyének kijelölésében. [131]

2.2.2. A csontfaló sejtek fejlődése

Az oszteoklasztok hemopoietikus eredetű mieloid előalakokból differenciálódnak, mely folyamathoz makrofág kolónia stimuláló faktor (M-CSF), valamint RANKL (nukleáris faktor κ B receptor aktivátorának ligandja) jelenléte és sejtdhézió is szükséges. **(6. Ábra)** Ezen információk ismeretében laboratóriumi körülmények között csontvelői sejtek hiányában, perifériás vérmintákból szeparált monocitákból is lehetséges érett csontfaló sejteket differenciáltatni citokinek és megfelelő letapadási felület (pl. adhézios sejtkultúrához ajánlott lemez, csontlapocska) biztosítása révén. [132]

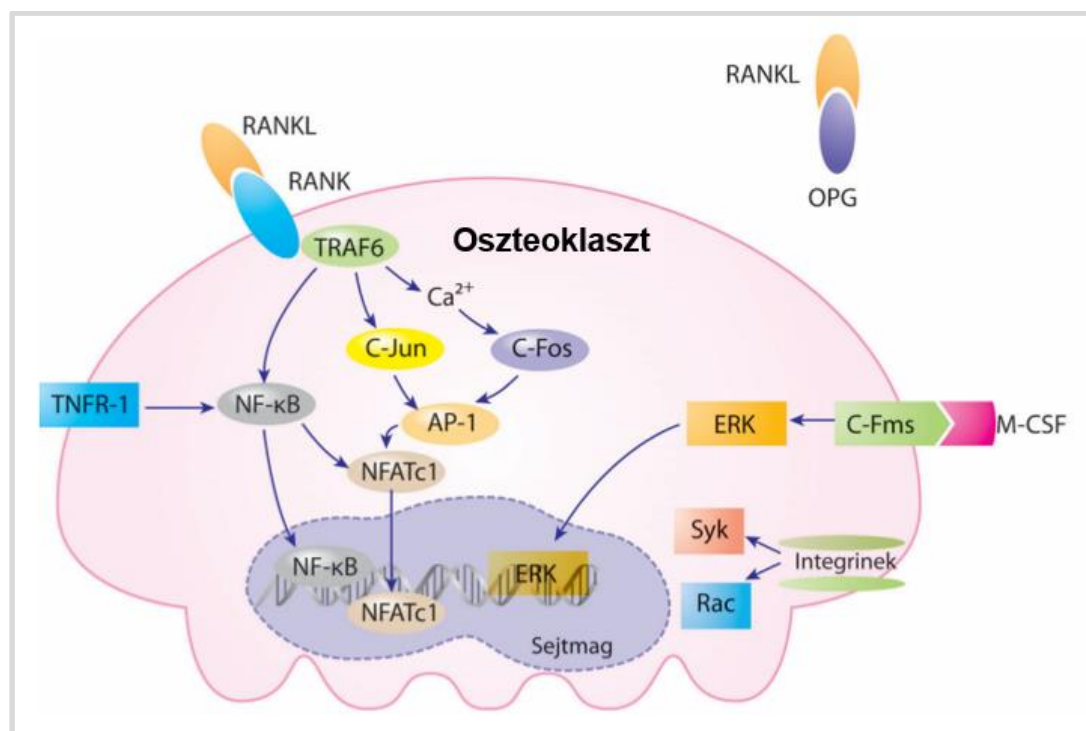


6. Ábra: Az oszteoklasztok differenciálódása.

A hematopoietikus előalakok M-CSF hatására makrofág irányba kezdenek fejlődni, mely differenciálódási útvonalról a RANKL stimulus tereli el őket, minek hatására csontfaló sejtekre jellemző géneket fejeznek ki (pl. tartarát rezisztens savanyú foszfatáz-TRAP, katepszin K), majd integrinek és DC-STAMP molekulák segítségével sokmagvú preoszteoklasztokká fuzionálnak, melyek aktivációs szignálok hatására érett, polarizált csontfaló sejtekké válnak. DC-STAMP= dendritikus sejt-asszociált transzmembrán fehérje, HSC= hematopoietikus őssejt, M-CSF= makrofág kolónia stimuláló faktor, RANKL= nukleáris faktor κ B receptor aktivátorának ligandja

Forrás: <https://www.geneverlab.info/resources> alapján

Az M-CSF egy főként az oszteoblasztok által szekretált citokin, mely a csontvelői őssejtek makrofág irányba való fejlődését indítja meg. [133, 134] Az M-CSF transzmembrán receptorához, a tirozin kináz aktivitású c-Fms-hez kötődve fejti ki hatását. **(7., 8. Ábra)**



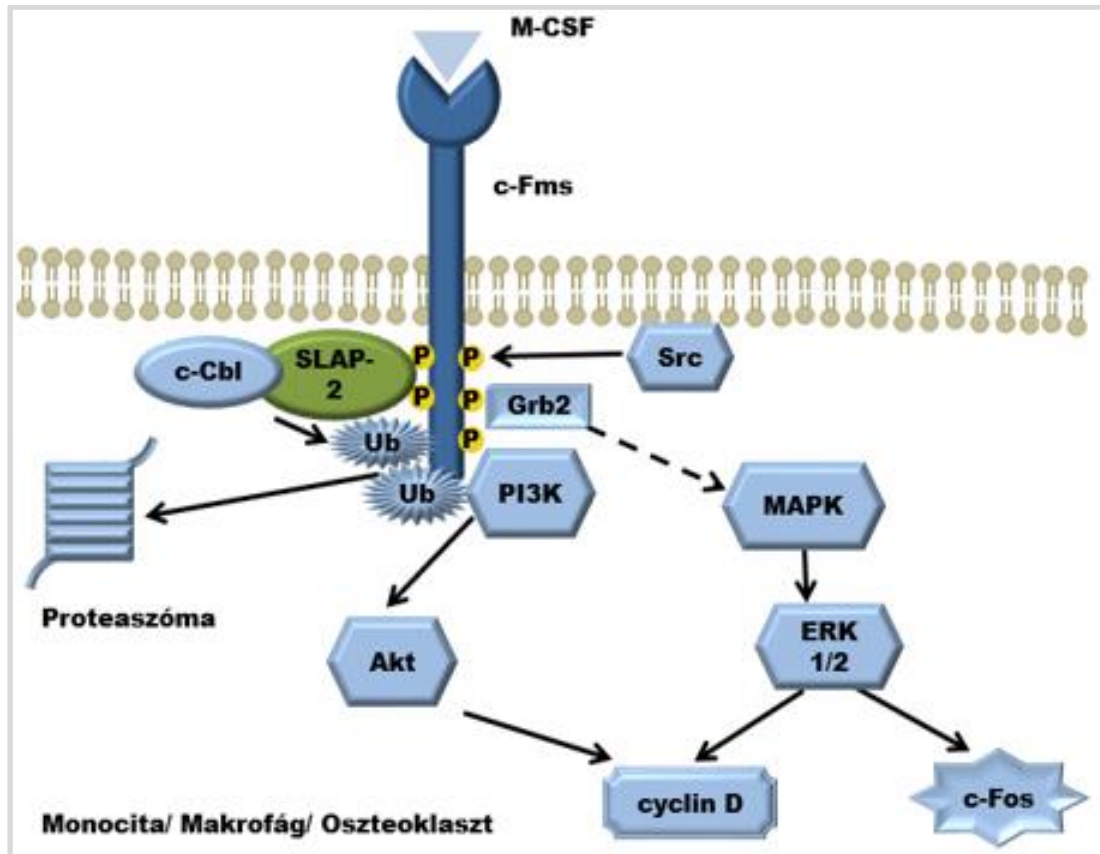
7. Ábra: Az oszteoklasztok főbb jelátviteli útvonalai.

Az oszteoblaszt-eredetű M-CSF sejtfelszíni receptorához -a tirozinkináz aktivitású c-Fms-hez- kötődve az ERK fehérjék sejtmagba történő transzlokációját váltja ki. A szolubilis vagy membránkötött RANKL transzmembrán receptorával, a RANK-kal kapcsolódva az NF-κB, NFATc1 transzkripciós faktorok aktiválódását segíti elő, melynek következtében az oszteoklasztokra jellemző gének expressziója növekszik. A RANKL kötődését OPG molekulák gátolhatják. A TNF transzmembrán receptorának stimulációja a RANK útvonalhoz hasonlitosan NF-κB aktivációval jár. A csontfaló sejt előalakok a környező csontfelszínnel $\alpha_v\beta_3$ integrineken keresztül létesítenek kapcsolatot, mely interakció többek között a Syk és Rac proteinek aktiválódását és a citoszkeleton következményes átrendeződését vonja maga után. AP-1= aktivátor protein-1, c-Fms= M-CSF receptor, c-Fos= protoonkogén, a retrovirális onkogén v-fos homológja, c-Jun= AP-1 transzkripciós faktor egység, protoonkogén, ERK= extracelluláris szignál redukálta kináz, M-CSF= makrofág kolónia stimuláló faktor, NFATc1= aktivált T-sejt nukleáris faktor 1, NF-κB = nukleáris faktor κ könnyű-lánc enhancer B-sejtekben, OPG= oszteoprotegerin, Rac= Ras-sal kapcsolódó botulinum toxin szubsztrát 1, RANK= nukleáris faktor κ B receptor aktivátora, RANKL= nukleáris faktor κ B receptor aktivátorának ligandja, Syk= lép tirozin kináz, TNFR-1= tumor nekrosis faktor receptor 1, TRAF6= TNF receptor asszociált faktor

Forrás: Marton N et al. (2012) Immunológiai Szemle [135] alapján

Az útvonal negatív regulátorai a SLAP fehérjék (SLAP-1 és SLAP-2), melyek a c-Fms c-Cbl függő proteasomális degradációját eredményezik. [136] **(8. Ábra)** A PU.1 transzkripciós faktornak a SLAP-pal szemben c-Fms expressziót fokozó hatása van, valamint kifejeződése fontos szerepet játszik az őssejtek monocita irányba történő differenciálódásában. A c-Fms receptoron keresztüli stimulus Ras G-protein és Raf-

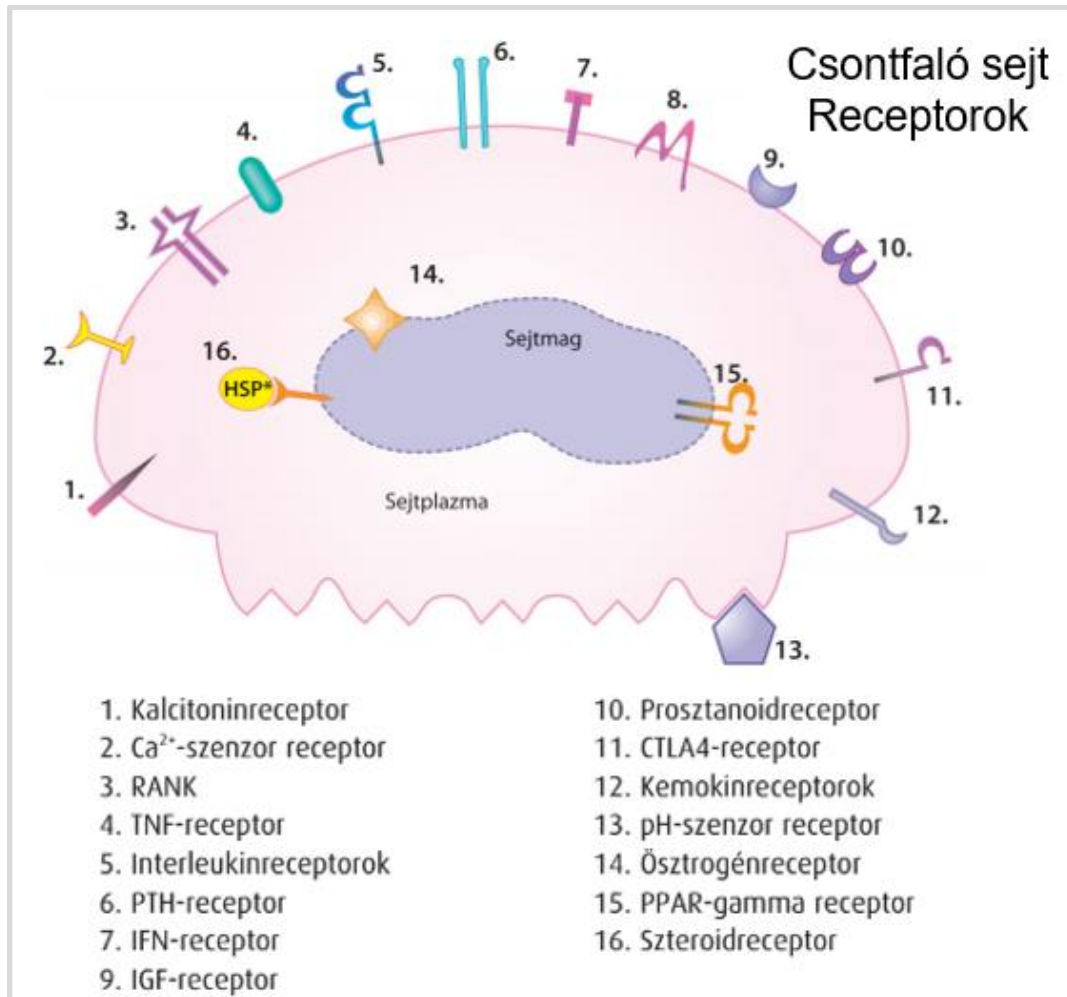
kináz aktiváción közvetítve ERK fehérjék foszforilációját eredményezi, melyek a nukleuszba transzlokálódva sejtsztódáshoz szükséges (pl. ciklin dependens kináz) fehérjék expresszióját váltják ki. [137] (7., 8. Ábra)



8. Ábra: A c-Fms receptoron keresztüli szignáltranszdukciós útvonal. A csontvelői hematopoietikus őssejteken, monocitákon, makrofágokon és oszteoklaszt prekurzorokon kifejeződő M-CSF receptor saját tirozin kináz aktivitással bír. PI3- és MAP kinázok segítségével beindítja az Akt és Erk útvonalakat, melyek a sejtsztódáshoz szükséges fehérjék expresszióját váltják ki. A c-Fms proteasomális lebomlását váltják ki a SLAP fehérjék (SLAP-1 és SLAP-2), melyek c-Cbl-függő ubiquitinizációt segítenek elő, így fontos szerepet játszanak a negatív feedbackben. Akt= protein kináz B, c-Cbl= Casitas B-sejtes limfóma sejtvonal ubiquitin ligáz, cyclin-D= sejt ciklusban szerepet játszó fehérje, c-Fms= M-CSF receptor, c-Fos= protoonkogén, a retrovirális onkogén v-fos homológja, ERK= extracelluláris szignál redukálta kináz, Grb2= növekedési faktor receptor kötött protein 2, MAPK= mitogén aktiválta protein kináz, P= foszfát csoport, SLAP-2= Src-szerű adaptor protein-2, Src= nem-receptor tirozin kináz, Ub= ubiquitin
 Forrás: Marton N et al. (2015) Mediators of Inflammation [136] alapján

Ahhoz, hogy a makrofág-oszteoklaszt közös prekursorok fejlődése csontfaló sejt irányba induljon meg, elengedhetetlen az oszteoblasztok vagy kötőszöveti- és immunsejtek által kifejezett membránkötött vagy szolubilis formában is kifejeződő, TNF szupercsaládba tartozó RANKL molekula. **(6., 7. Ábra)** Transzmembrán receptora a RANK a c-Fms-el szemben nem rendelkezik saját enzimaktivitással, de citoplazmatikus szegmentumához TRAF adaptor fehérjék csatlakoznak, melyek AP-1, NF- κ B, NFATc1 transzkripció faktorok aktiválásában vesznek részt, ezzel csontfaló sejtekre jellemző fehérjék, mint például a katepszin K, tartarát rezisztens savas foszfátáz vagy a kalcitonin receptor expresszióját eredményezve. [138-140] **(7. Ábra)** A RANKL kapcsolódását receptorához a főképp az oszteoblasztok által szecernált oszteoprotegerin (OPG) molekula képes megakadályozni. [141] Tehát az oszteoblasztok RANKL és OPG termelésének aránya alapvető fontosságú az oszteoklasztok aktiválódásában. Mint említésre került, a RANKL a TNF szupercsaládba tartozó molekula, a család többi eleme is triggerelheti az oszteoklasztogenezist, mint pl. a tumor nekrosis faktor α (TNF- α). [142] **(7. Ábra)** Erről bővebben lásd a „2.2.4. Csontimmunológia” fejezetet.

A RANKL által megindított szignáltranszdukciós útvonalak eredményeképp preoszteoklasztok jönnek létre, melyek kemokinek által vezérelve megközelítik egymást, majd membránkötött DC-STAMP molekulák segítségével fúzionálva létrehozzák a sokmagvú óriássejteket. **(6. Ábra)** Ehhez az interakcióhoz elengedhetetlenek az $\alpha_v\beta_3$ integrinek is, melyek a csontmátrix RGD-szekvenciáit (pl. oszteopontin) ismerik fel. [143-145] Az integrinek által megindított szignáltranszdukcióban szerepe van az Src és fokális adhézis kinázoknak is. A differenciálódás során a sejtváz átrendeződik, valamint a fokális adhézis komplex és az aktin gyűrű is kialakul. [146, 147]



9. Ábra: A csontfaló sejtek receptorai.

Az oszteoklasztok számos hormon, növekedési faktor, citokin, kostimulációs vagy pH szenzoros receptort fejeznek ki. CTLA-4= citotoxikus T-limfocita-asszociált antigén-4, HSP= hő sokk protein, IFN= interferon, IGF= inzulinszerű növekedési faktor, pH= hidrogén kitevő, PPAR= peroxiszóma proliferátor aktiválta receptor, PTH= parathormon, TNF= tumor nekrosis faktor

Forrás: Marton N et al. (2012) Immunológiai Szemle [135] alapján

A csontfaló sejt fejlődéshez szükséges M-CSF, RANKL, adhézións molekulák mellett más stimulusok is szabályozzák az oszteoklasztogenezist. Ezt a csontfaló sejteken kifejeződő számos citokin és hormonreceptor jelenléte is jelzi (bővebben lásd 2.2.4. Csontimmunológia és 2.2.5. A csontfaló sejtek kóros működésével társuló kórképek c. fejezetek). [135] (9. Ábra, 1., 2. Táblázat)

2.2.3. A csontbontás folyamata

Az érett sokmagvú csontfaló sejtek aktivációs szignálok hatására reszorpciós működésbe kezdenek. **(1. és 2. Táblázat)** A csontmátrix bontása az úgynevezett Howship-lakúnákban jön létre, melyek az oszteoklasztok csontfelszínhez történő szoros kitapadása révén képződő üregek. A csontfaló sejtek integrinek segítségével rögzülnek a mátrixhoz, melyben a citoszkeleton átrendeződése révén fibrilláris aktin molekulákból kialakuló gyűrű is fontos szerepet játszik. [4]

1.Táblázat: A csontfaló sejtek képződését és aktivitását befolyásoló hormonok.

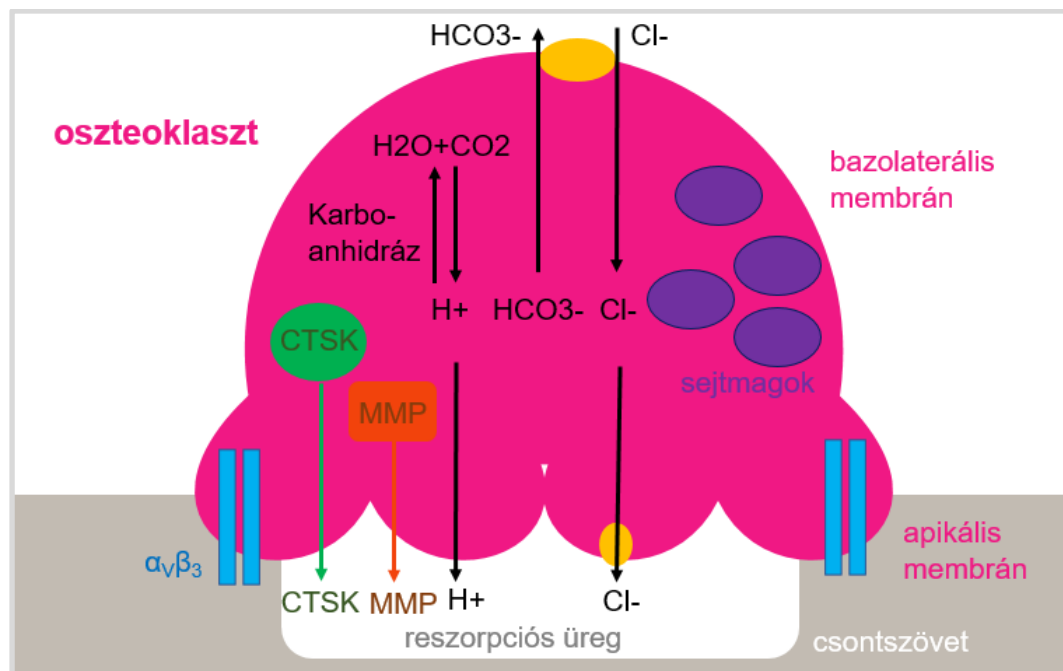
Serkent	Gátol
follikulus stimuláló hormon (FSH)	kalcitonin
glükokortikoidok	szexuáliszteroidok
kalcitriol [1,25-(OH) ₂ -D ₃ vitamin]	
parathormon (PTH)	
parathormon rokon protein (PTHrP)	

Forrás: Das Subhajit CJC et al. (2013) Drug Des Devel Ther; Liu P et al. (2017) Nature [148, 149] nyomán

A kitapadt sejtek polarizáltak, mivel két funkciójában jól elkülönülő membránrésszel rendelkeznek: az üreg fele tekintő hullámos felszínű (ún. ruffled border) apikális, valamint az interstitiummal határos bazolaterális membránnal. **(10. Ábra)** [4] Az intracelluláris karboanhidráz enzim működése révén H⁺ ionok jönnek létre, melyek az apikális oldalon vakuoláris típusú H⁺-ATP-ázok segítségével szekretálódnak a lakúna felé. Emellett a reszorpciós üregbe Cl⁻ csatornákon keresztül kloridionok is ürülnek, így kialakítva az egyik legalacsonyabb pH-jú környezetet a szervezetben. A kloridionok a bazolaterális membránon elhelyezkedő bikarbonát-klorid antiporter segítségével jutnak be az oszteoklasztokba, illetve a 2-es típusú karboanhidráz által termelt HCO₃⁻ ionok itt távoznak el a sejtől. [150] Az apikális oldalon nem csak ionok, hanem proteolitikus enzimek is (mint például a lizoszomális cisztein proteáz katepszin K, tartarát rezisztens savas foszfataáz, mátrix metalloproteázok) ürülnek a reszorpciós üreg felé. [4] **(10. Ábra)**

A sósav és az enzimek együttes hatása révén a csontmátrix részlegesen lebomlik. A hidroxipatit kristályokból oldott állapotba kerülnek a kalcium- és foszfátionok, a

proteolitikus enzimek pedig a proteoglikánokat és a mátrixfehérjéket bontják. A degradáció során mikroszkopikus fragmentumok keletkeznek, amelyeket az oszteoklasztok az apikális membrán mentén fagocitálnak, majd az ellentétes oldalon a bazolaterális membrán funkcionális szekretoros doménnek nevezett területén exocitálnak. Ezt a jelenséget nevezzük transzcitózisnak. [151] Az interstitium fele ürülő sók, ásványi anyagok később a keringésbe jutnak. Feladatuk végeztével a csontfaló sejtek inaktiválódnak, majd apoptotizálnak. [4]



10. Ábra: A csontbontás folyamata.

A multinukleáris aktivált csontfaló sejt a csontfelszínhez kitapadva polarizálódik, sósavat és emésztőenzimeket ürít az apikális membránon keresztül a reszorpciós üregbe, majd transzcitózissal a bazolaterális membránon keresztül az interstitium felé továbbítja a lebontott mátrix elemeket. $\alpha_v\beta_3$ = integrin, Ctsk = katepszin K, MMP = mátrix metalloproteáz

Forrás: <http://www.bioscience.org/2012/v4e/af/543/fig6.jpg> alapján

2.2.4. Oszteoimmunológia

A csontsejtek és az immunsejtek kapcsolatát vizsgáló interdiszciplináris tudományterület a csontimmunológia (vagy oszteoimmunológia), melynek kutatási eredményei segítenek megérteni a népbetegségnek számító csontritkulás és a gyulladásos ízületi kórképek patomechanizmusát, így hozzájárulva ahhoz, hogy újszerű kezelési lehetőségek bevezetésével a fokozott csontvesztéssel, csontátépüléssel,

immunregulációs zavarral járó betegségek hatékonyabb terápiája lehetővé váljon. [130, 152, 153] Az oszteoimmunológia kifejezést japán és amerikai kutatók használták először a kétezres évek elején. [154-156] Ebben a fejezetben röviden áttekintjük az immunrendszer és a csontsejtek kapcsolódási pontjait, különös tekintettel az oszteoklasztokra.

A csontfaló sejtek az immunsejtekhez hasonlóan hematopoietikus előalakokból fejlődnek. Emellett a csontszövet és a vérsejtek (és így az immunsejtek) képzése fizikailag és funkcionálisan is kapcsolódik, mivel a hematopoézis helyszíne a csontvelő, ahol az oszteoblasztok dajkasejteként támogatják a mieloid előalakok érését, illetve a differenciálódás előrehaladtával az oszteoklasztok segítik a csontépítő sejtek és az érésben lévő vérsejtek szeparációját. [123, 157] Ennek a folyamatnak a fontosságát mutatja, hogy nagyfokú vérvesztés hatására az oszteoblasztok és az oszteoklasztok száma növekszik, ami elősegíti az új vérsejtek képződését. [123] Parathormon (PTH) hatására az oszteoblasztok IL-7 expressziója fokozódik, ami támogatja a limfogenezist. Emellett PTH stimulusra a T-limfociták serkentik a csontsejtek érését is. [157]

Az oszteoklasztogenezishez elengedhetetlen TNF-családba tartozó RANKL molekula génjének aktivációját (ld. 2.2.2. Csontfaló sejtek fejlődése, **6., 7. Ábra**) először T-sejtekben írták le, majd csak később derült ki, hogy esszenciális szerepet játszik a csontbontásban. A RANKL-ot nem csak a csontépítő sejtek expresszálják, hanem az ízületekben jelenlévő fibroblasztok, valamint a B- és T-limfociták is, ráadásul a csontvelői RANKL legnagyobb része (kb. 65%) nem oszteoblaszt, hanem B-sejt-eredetű. [123, 158, 159] Emellett a B-limfociták OPG-t is termelnek, így az általuk expresszált RANKL-OPG arány jelentősen befolyásolja az oszteoklasztogenezist. [7, 123]

1999-ben publikálták, hogy a T-limfociták direkt és indirekt úton is befolyásolhatják a csontfaló sejtek képződését. [160] Azóta számos citokinről bebizonyosodott, hogy hatással van az oszteoklasztogenezisre, illetve a csontfaló sejtek aktivációjára. Ezeket a molekulákat és feltételezett hatásmechanizmusukat a **2. Táblázat** foglalja össze.

A csontfaló sejtek hatékony antigén-prezentáló sejtek, erre utal, hogy MHC I mellett MHC II, illetve CD80, CD86, CD40 molekulákat is kifejeznek a felszínükön.

Az oszteoklasztok a limfociták aktivitását membránkötött molekulákkal és lipopoliszacharid stimulusra bekövetkező citokin termeléssel is módosíthatják (TNF- α , IL-1, 6, 10). [161, 162] A limfociták sem csak szolubilis molekulák termelésével képesek hatni a csontfaló sejtek keletkezésére, aktivitására, erre példa, hogy a regulatórikus T-sejtek CTLA-4 membrán integráns koinhibitoros molekuláikkal direkt kontaktussal is gátolhatják az oszteoklasztogenezist. [163, 164] Ezen, a csont- és immunsejtek szoros együttműködésére utaló adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a csontsejtek és az immunrendszer szabályozása számos ponton összefonódik.

2. Táblázat: Az oszteoklasztok képződését és aktivációját befolyásoló citokinek, kemokinek és biológiailag aktív kismolekulák összefoglalása.

ACPA= ciklikus citrullinált peptid ellenes antitest, BMP= csont morfogenetikus protein, CCL, CXCL= kemokin receptor ligandok, c-Fms= M-CSF receptor, c-Fos= protoonkogén, IL= interleukin, LIF=leukémia inhibitoros faktor, LTB4= leukotrién B4, M-CSF= makrofág kolónia-stimuláló faktor, MIF=makrofág migráció inhibitoros faktor, NFATc1= aktivált T-sejt nukleáris faktor 1, NO= nitrogén-monoxid, OPG= oszteoprotegerin, PDGF= vérlemezke eredetű növekedési faktor, PGE2= proszttaglandin E2, PH= parathormon, TNF- α = tumor nekrozis faktor α , TGF- β = tumor növekedési faktor β

Serkent (+) / gátol (-)	Citokin neve	Lehetséges hatásmechanizmus
+	BMP-2, 4	A RANKL függő oszteoklasztogenezist támogatják.[165, 166]
+	CCL-2,3,9; CXCL-12	Kemotaktikus hatásúak, elősegítik az előalakok migrációját, fúzióját, oszteoklaszt specifikus gének expresszióját. [145, 167-170]
-	IFN- β	A c-Fos dependens intracelluláris szignáltranszdukció blokkolása révén gátolja az oszteoklasztogenezist. [171]
-/+	IFN- γ	Főként gátló hatású, mivel az IL-1, RANK, PTH, kalcitriol szignalizációs útvonalakat blokkolhatja, de lehet serkentő is T-sejtek RANKL és TNF- α expressziójának stimulálása révén. [172, 173]

Serkent (+) / gátol (-)	Citokin neve	Lehetséges hatásmechanizmus
+	IL-2	Oszteoklasztok sósav szekrécióját növeli. [174]
-	IL-4, IL-13	Az IL-1 mediálta oszteoklasztogenezist gátolják, mivel blokkolják a ciklooxygenáz-2 enzim működését és így a prosztaglandinok képződését. [175]
+	IL-6	RANKL, PGE2 dependensen stimulál. [176]
-/+	IL-7	Szupprimálja a RANKL és az M-CSF szintet, de a limfociták aktiválása révén hozzájárulhat a csontvesztéshez. [157, 177, 178]
+	IL-8	Autokrin módon serkenti az oszteoklasztogenezist, ACPA elősegíti ezt a folyamatot, oszteoblasztokat is stimulál. [179-182]
-	IL-10	Az OPG szintet növeli, NFATc1 és c-fos expressziót csökkenti. [183, 184]
+	IL-11	Érést és aktiválódást is növel. [185]
-	IL-12	Csökkenti a RANKL indukálta oszteoklasztogenezist és növeli az INF- γ elválasztást, valamint IL-18-cal együttműködve gátolja az oszteoklasztogenezist. [186]
+	IL-15	T-sejt és RANKL dependens útvonalon serkenti az oszteoklasztok képződését. [187]
+	IL-17A	RANKL és prosztaglandin szintézist indukálva segíti elő az oszteoklasztogenezist. [188, 189]
-	IL-18	OPG és INF- γ képződést serkent. [190, 191]

Serkent (+) / gátol (-)	Citokin neve	Lehetséges hatásmechanizmus
+	IL-23	T-helper 17 sejtek érését váltja ki, ami IL-17 és RANKL expresszióval stimulálja a csontfaló sejtek képződését. [192]
+	LTB4	RANKL independens módon segíti elő az oszteoklasztok képződését. [193]
+/-	MIF	Oszteoblasztok termelik, ösztrogének csökkentik a szintjét, <i>in vitro</i> a RANKL dependens oszteoklasztogenezis inhibitora. [194, 195]
+/-	NO	Alacsony koncentrációban IL-1 függő módon stimuláló, magas koncentrációban proapoptotikus hatású. [196-198]
+/-	Oncostatin M	Oszteoblasztok RANKL produkcióját növeli, valamint a csontépítő sejtek képződését váltja ki.[176, 199]
-	PDGF	Az oszteoblasztokat aktiválja, a csontképzést segíti elő. [176]
-	TGF- β	TNF- α és RANKL dependens útvonalat gátol, proapoptotikus hatású a csontfaló sejtekre. [200]
+	TNF- α	RANK, c-Fms expressziót növeli, így oszteoklasztogenetikus hatású. [201]

Forrás: 3. cellákban jelölve, illetve Marton N et al. (2012) Immunológiai Szemle [135] alapján

2.2.5. A csontfaló sejtek kóros működésével társuló kórképek

A csontszövetet érintő betegségek lehetnek primerek (pl. márványcsont betegség, Paget-kór), amikor a csontsejtek meghibásodása váltja ki a patológiás

folyamatot, vagy szekunderek, amikor szisztémás metabolikus, inflammatorikus mechanizmus okozza a sejtek működésének diszregulációját (pl. szteroid kezelés hatására bekövetkezett oszteoporózis). Az oszteoklasztok hibás működése kapcsán kialakuló betegségeket az alábbi táblázat foglalja össze. **(3. Táblázat)**

3. Táblázat: A csontfaló sejtek hibás működése következtében kialakuló betegségek.

Túlzott oszteoklaszt aktivitás	Csökkenő oszteoklaszt működés
-csonttritkulás -gyulladásos reumatológiai betegségek -oszteopénia -Paget-kór -primer vagy szekunder malignus folyamat oszteolitikus komponenssel	-oszteopetrózis -piknodizosztózis -primer vagy szekunder malignus folyamat szklerotikus komponenssel

Forrás: Das Subhagit CJC et al. (2013) Drug Des Devel Ther; Hu WV et al. (2012) Bonekey Rep; Nagy Gy, Szekanecz Z (szerk.) Reumatológia: egyetemi jegyzet. (2011) [148, 202, 203] nyomán

A leggyakoribb csontozatot érintő kórkép az oszteoklasztok fokozott működésével járó csonttritkulás (vagy oszteoporózis), mely lehet generalizált, vagy fokális. Ez utóbbi során jellemzően gyulladásos környezetben vagy malignus folyamat hatására épül át a csontállomány (pl. artritiszben, extrakraniális tumorok csontáttéteinél). A lokális oszteoklaszt aktiválódást a gyulladás során felszabaduló proinflammatorikus citokinek (pl. TNF- α , IL-1, 6, 17, 23), és a limfociták, fibroblasztok által termelt RANKL, illetve direkt sejt-sejt kontaktus segíti elő (ld. 2.2.4. Oszteoimmunológia **2. Táblázat**). [7] Generalizált formájában a csontszövet mikroszerkezete károsodik, a csonttömeg jelentősen fogy, így a törések rizikója nő (típusosan csigolya, csípőtáji, proximális felkarcsont), ami hozzájárul a tartós életminőség-romláshoz, keresőképtelenséghez, illetve az immobilizáció miatt a hospitalizációhoz, és a következményes halálesetekhez (tüdőgyulladás, pulmonális embólia) is, melyek nem elhanyagolható gyakoriságúak, mivel például csípőtáji töréseknél az egy éven belüli mortalitási arány 15-30% körül mozog. [204]

Az oszteoporózis primer, vagy másnéven involúciós formáját az ösztrogén hiánya miatt létrejövő posztmenopauzális és az időskori csonttritkulás alkotják, míg

másodlagos típusát gyakorta terápiás céllal adagolt készítmények (glükokortikoidok, heparin, lítium, antiepileptikumok stb.), gyulladásos kórképek (pl. reumatoid arthritisz), metabolikus elégtelenség (máj- és veseműködés inszufficienciája stb.), vagy malignus folyamatok (pl. tüdő-, prosztata-, mellrák áttétek) váltják ki. [205] A csonttritkulás kezelésére használatos készítményeket az **4. Táblázat** foglalja össze. A legújabb eredmények alapján a follikulus stimuláló hormon (FSH) receptorához kötődve MAP kinázokon és NF- κ B aktiválásán keresztül stimulálja az oszteoklasztogenezist, így antitestekkel történő blokkolása antioszteoporotikus hatással bírhat. [149]

4. Táblázat: Az oszteoporózis farmakoterápiája.

Hatóanyag	Oszteoklaszt funkciót gátló hatás mértéke	Oszteoblaszt működést elősegítő hatás
Anabolikus szteroidok	kis	van
Biszfoszfonátok	kifejezett	nincs
Blosozumab, Romosozumab	kis (?)	van (?)
D-vitamin	kis	van
Denosumab	kifejezett	nincs
Kalcitonin	közepes	nincs
Kalcium	kis	nincs
Női szexuálisztteroidok	közepes	van
Odanacatib	kis (?)	nincs
Stroncium ranelát	kis	van
Szelektív ösztrogén receptor modulátorok	közepes	van
Teriparatid (PTH analóg)	kis	van
Tiazid	kis	nincs
Tibolon	közepes	van

Forrás: Das Subhagit, CJC et al. (2013) Drug Des Devel Ther; de Villiers TJ et al (2017) Climacteric [148, 206] nyomán

Oszteopetrózisban, azaz márványcsont betegségben az oszteoklasztok alulműködnek, így a megszokottnál denzebb szerkezetű csontállomány jön létre. Az

oszteoklasztok funkciója több okból károsodhat: nem kielégítő adhézio az integrin molekulák defektusa miatt; sósav szekréció hibája; membránpolarizáció elmaradása. A kórkép ritka, a gyermekkori formák incidenciája 1/200 000, míg a felnőttkori típusé 5,5/100 000. Az infantilis típusban a velőűr beszűkül, aminek következtében sérül a hematopoiezis, ezért anémia, immundefektus alakul ki. [207-209] Emellett az elkeskenyedett csontos csatornáknak az erek, idegek komprimálódnak, emiatt idegsorvadás alakulhat ki (pl. látóideg esetében ez vaksághoz is vezethet). A kórkép enyhébb formájában a velőűr csak mérsékelten beszűkül, de veseelégtelenséggel és agyi meszesedésekkel társulhat, ami mentális retardációhoz vezethet. A felnőttkorban kezdődő oszteopetrozisos csontfájdalommal, visszatérő patológiás törésekkel és az agyidegek nyomási tünetivel járnak. [207-209]



11. Ábra: Piknodizosztózisban szenvedő egyén csontjai. Mint az a konvencionális röntgenfelvételeken megfigyelhető, az agykoponya aránytalanul nagy az arckoponyához képest és a kutacsok felnőtt korban sem záródnak, valamint a disztális ujjpercek a normálisnál lényegesen rövidebbek.

Forrás: <http://www.sajr.org.za/index.php/sajr/article/view/313/419> alapján

Piknodizosztózisban az oszteoklasztok száma emelkedett, de a fehérjét nem képesek kellőképpen degradálni, amit a katepszin K enzim autoszomális recesszív módon öröklődő funkcióvesztéses mutációja okoz. A fenotípusra jellemző az alacsony testmagasság (kb. 140-150 cm), az aránytalanul nagy agykoponya nem záródó kutacsokkal, a fogak részleges hiánya, alulfejlett áll- és kulcscsont, végtagi deformitások és fokozottan törékeny csontok. Eddig hozzávetőlegesen 150 piknodizosztózisos esetről számol be a szakirodalom, tehát a kórkép ritkának számít. Patomechanizmusának megismerése hozzásegített a katepszin K csontbontásban betöltött szerepének felismerésére. Terápiás vonatkozása is van az enzim blokkolásának (*odanacatib*), ami az oszteoporózis és a litikus csontáttétek gyógykezelésében játszhat szerepet. **(4. Táblázat)** [210, 211]



12. Ábra: Paget-kóros személy koponyája.

A sagittális síkú, csontablakos koponya CT felvételen az ún. „skótsapka” jel látható, melynek során a Paget-kóros koponya rostrális része kifejezettebben vastagodik meg, mint az occipitalis területek, a diploe kiszélesedett, a csontállomány inhomogén, benne szklerotikus foltok és felritkulások egyszerre figyelhetők meg.

Forrás: <https://radiopaedia.org/articles/tam-o-shanter-sign-skull> alapján

Az oszteitisz deformanszra, avagy a csontok Paget-kórjára jellemző az emelkedett oszteoklasztok szám megnövekedett oszteolitikus aktivitással, amivel az oszteoblasztok nem kielégítő anabolikus tevékenysége társul, így törékeny, eltorzult csontok jönnek létre. [212] 1876-ban Sir James Paget írta le ezt az általában középkorúakban kezdődő, csontfájdalommal, a koponya megvastagodásával, hosszú csöves csontok elgörbülésével, ízületek deformálódásával járó betegséget. A Paget-kór a második leggyakoribb csontbetegség a csonttritkulás után, előfordulása Nyugat-Európában 40 éves kor felett 1% körül van. Juvenilis formája súlyosabb lefolyású és oka az oszteoklasztok RANK szignalizációs útvonalának károsodása. A defektus autoszomális recesszíven öröklődik és extrém ritka. **(12. Ábra)** [209, 213, 214]

A csontokra ható hormonok szintjének változása is patológias csontszerkezetet idézhet elő. **(1. Táblázat)** A parathormon a kalcium-anyagcsere fő szabályozója; hatására az oszteoklasztok aktiválódnak, fokozódik a csontlebontás és a kalcium mobilizálódik a csontokból a vérbe. A mellékpajzsmirigy túlműködése hatására létrejövő tartósan magas PTH elválasztás fokozott oszteoklaszt aktivációval és következményes oszteolízissel, emelkedett plazma kalciumszinttel jár. Az intermittáló PTH analóg *teriparatid* adagolásnak anabolikus hatása is van a csontanyagcserére. **(4. Táblázat)** [215] A PTHrP a PTH-hoz szerkezetében és funkciójában hasonló molekula, melyet főképp daganatsejtek termelnek, így a csontmetasztázisok létrejöttében játszik szerepet. Hatására a csontépítő sejtek RANKL expressziója nő, ami az oszteoklasztogenezist támogatja. [216] A kalcitriol [vagy másnéven 1,25-(OH)₂-kalciferol, D₃-vitamin származék] egyik fő hatása a plazma kalcium szintjének emelése, melyhez hypocalcaemia esetén a csontokból mobilizálódik a kalcium, illetve a bélben fokozódik a kalcium felszívódása, a vesében csökken az ürítése. Hiányában, gyermekkorban angolkór jön létre, felnőttkori formájában, az oszteomaláciában demineralizálódnak a csontok. [217] *(ld. D-vitamin, 4. Táblázat)* A pajzsmirigy C-sejtjeiben termelődő kalcitonin hatása a plazma kalcium-szintjének csökkentése, ennek a hatásnak az eléréséhez receptorához kötődve közvetlenül gátolja az oszteoklasztok funkcióját, melynek terápiás konzekvenciája is ismert. [218] **(4. Táblázat)**

2.2.6. Csontsejtek és extracelluláris vezikulák

Mint minden eukarióta sejt, a csontsejtek is bocsátanak ki és vesznek fel extracelluláris vezikulákat. [219, 220]

Lipopoliszacchariddal kezelt monociták olyan exoszómákat termelnek, amelyek a mezenhimális őssejtekben oszteoblasztokra jellemző gének expresszióját fokozzák, így iniciálva a csontépítő sejtek képződését, ami sérülést vagy gyulladást követően támogathatja a csontregenerációt. [221-223] Az oszteoblaszt és oszteocita eredetű lizoszomális membrán protein-1 (LAMP-1) -t tartalmazó exoszómák hordozhatnak TRAP, RANKL vagy OPG fehérjéket, amik befolyásolhatják a csontfaló sejtek képződését, emelett a PTH-val stimulált oszteoblasztok jelentős mennyiségben szekretálnak RANKL tartalmú vezikulákat.[224]

Az oszteoblasztok-oszteoklasztok közti kommunikáció vezikulákkal nem egyirányú, ezt bizonyítja, hogy az oszteoklasztok *ephrin A2* tartalmú exoszómákat termelnek, amiket az oszteoblasztok receptoraikkal megkötnek, valamint oszteoklasztok által termelt miR-214-et szállító exoszómák blokkolhatják a csontépítő sejtek differenciálódását. [219, 225, 226]

Az oszteoklaszt prekursorok által termelt vezikulák oszteoklasztogenetikus hatással rendelkeznek, tovább serkentve az érési folyamatot, valamint az csontfaló sejt-eredetű RANK tartalmú exoszómák a RANKL blokkolásával az OPG-hez hasonlóan kompetitíven gátolják az oszteoklasztogenezist. [219, 220] Ez arra enged következtetni, hogy az exoszómák autokrin és parakrin módon is befolyásolhatják a csontbontó sejtek képződését.

Oszteolitikus komponenssel rendelkező malignus daganatok, mint a prosztata karcinóma- és mielóma multiplex- eredetű sejtvonalak felülúszóiban található exoszómák stimuláló hatásúak az oszteoklasztokra. [227-229] Ez az adat arra utal, hogy rosszindulatú folyamatok exoszómák közreműködésével hozhatnak létre litikus csontléziókat. [228, 229]

Az csontsejtek nem csak a helyileg képződő extracelluláris vezikulákkal kerülnek interakcióba. Irodalmi adatok alapján a máj után a csontszövet veszi fel a legtöbb keringésben jelenlévő vezikulát (ld. 2.1.2. Intercelluláris kommunikáció extracelluláris vezikulákkal). [52] Gyulladás során (pl. artritiszek esetében) a vaszkuláris permeabilitás megnő és a vérben található EV-k bejuthatnak a szinoviális

résbe, ahol interakcióba léphetnek a csont- és porcsejtekkel, valamint a fibroblasztokkal. [230, 231]

2.3. A reumatoid artritisz és az artritisz pszoriatika

Vizsgálódásunk tárgyául két immunmediált krónikus ízületi gyulladásal járó kórképet, a reumatoid artritiszt (RA-t) és az artritisz pszoriatikát (AP-t) választottuk, melyek patomechanizmusában szerepet játszik az oszteoklasztok fokozott működése.

2.3.1. Reumatoid artritisz

A reumatoid artritisz (RA) a leggyakoribb krónikus lefolyású szisztémás autoimmun kórkép. Incidenciája 0,25-0,5% között van, ami az északi féltekén észak-dél irányban csökkenést mutat, valamint városi környezetben élőkben is gyakrabban fordul elő, mint vidéki életformát folytatókban. [232]

Az RA kialakulásának oka nem teljesen feltérképezett, hajlamosító tényező lehet a női nem, genetikai faktorok (HLA-DR4 allél hordozása, peptidil arginin deimináz és a PTPN22/nem receptoriális protein tirozin foszfatáz mutációja), a dohányzás, a stressz, fertőzések (pl. periodontitis) és a mikrobiom összetételének megváltozása. [233, 234] A betegség többnyire lassan, prodromális tünetekkel (gyengeség, fogyás, és ízületi fájdalmak), ritkábban akut kezdettel, gyorsan progrediálva (láz, nyirokcsomó- és lépmeagnagyobbodással) indul. A klasszifikációs kritériumokat az **5. Táblázat** foglalja össze. [235]

5. Táblázat: A reumatoid artritisz klasszifikációs kritériumai.

ACPA= ciklikus citrullinált peptid ellenes antitest, ACR= Amerikai Reumatológiai Kollégium (America College of Rheumatology), CRP= C-reaktív protein, EULAR= Európai Reuma Ellenes Liga (European League Against Rheumatism), RA= reumatoid artritisz, RF= reumatoid faktor

2010-es ACR és EULAR kritériumok
A) Ízületi érintettség 1 nagyízület (0 pont) 2-10 nagyízület (1 pont) 1-3 kisízület - nagyízületi érintettséggel vagy anélkül (2 pont) 4-10 kisízület - nagyízületi érintettséggel vagy anélkül (3 pont) >10 ízület - legalább 1 kisízület (5 pont)
B) Szerológia: autoantitestek jelenléte (legalább 1 teszt kivitelezése szükséges) Negatív RF és negatív ACPA (0 pont) Alacsony pozitív RF vagy ACPA (2 pont) Magas pozitív ACPA (3 pont)
C) Akutfázis-reakció Normális CRP és süllyedés (0 pont) emelkedett CRP vagy süllyedés (1 pont)
D) A tünetek fennállásának tartama <6 hét (0 pont) ≥6 hét (1 pont) 6- 10 pont = RA

Forrás: Aletaha D et al. (2010) Arthritis Rheum [235]

A reumatoid artritisz (RA) a leggyakoribb krónikus lefolyású szisztémás autoimmun kórkép. Incidenciája 0,25-0,5% között van, ami az északi féltekén észak-dél irányban csökkenést mutat, valamint városi környezetben élőkben is gyakrabban fordul elő, mint vidéki életformát folytatókban. [232]

Az RA kialakulásának oka nem teljesen feltérképezett, hajlamosító tényező lehet a női nem, genetikai faktorok (HLA-DR4 allél hordozása, peptidil arginin deimináz és a

PTPN22/nem receptoriális protein tirozin foszfatáz mutációja), a dohányzás, a stressz, fertőzések (pl. periodontitis) és a mikrobiom összetételének megváltozása. [233, 234] A betegség többnyire lassan, prodromális tünetekkel (gyengeség, fogyás, és ízületi fájdalmak), ritkábban akut kezdettel, gyorsan progrediálva (láz, nyirokcsomó- és lépmegegyesítéssel) indul. A klasszifikációs kritériumokat az **5. Táblázat** foglalja össze. [235]



13. Ábra: Deformitások a nyaki gerincszakaszon reumatoid artritiszben. Laterális irányú röntgen képek reumatoid artritiszben szenvedő betegek cervikális gerincéről. A dinamikus felvételeken mind **A**, hiperextenzióban, mind **B**, hiperflexióban megfigyelhető az atlantoaxiális instabilitás. RA talaján kialakulhat **C**, a fognyúlvány kraniális irányú elmozdulása és a **D**, szubaxiális szubluxáció is.

Forrás: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S141378522005000100010&script=sci_arttext&lng=en alapján

Az RA elsősorban az ízületeket érinti, azok erozív gyulladását, illetve periartikuláris oszteoporózist eredményezve, de az extraartikuláris manifesztációk is gyakoriak. Az artritisz eloszlására jellemző, hogy szimmetrikusan érinti a kéz és a láb kisízületeit [metakarpo- (MCP), metatarzofalangeális (MTP), proximális interfalangeális (PIP) ízületek], ritkábban a szubkarpális és tarzális ízületeket, csuklót, bokát, könyököt, térdet, a krikaritenoid és az atlantoaxiális ízületet. Ezutóbbi ízület deformációja szubluxációhoz vezethet, ami a gerincvelő kompressziója révén hirtelen halált okozhat. **(13. Ábra)**

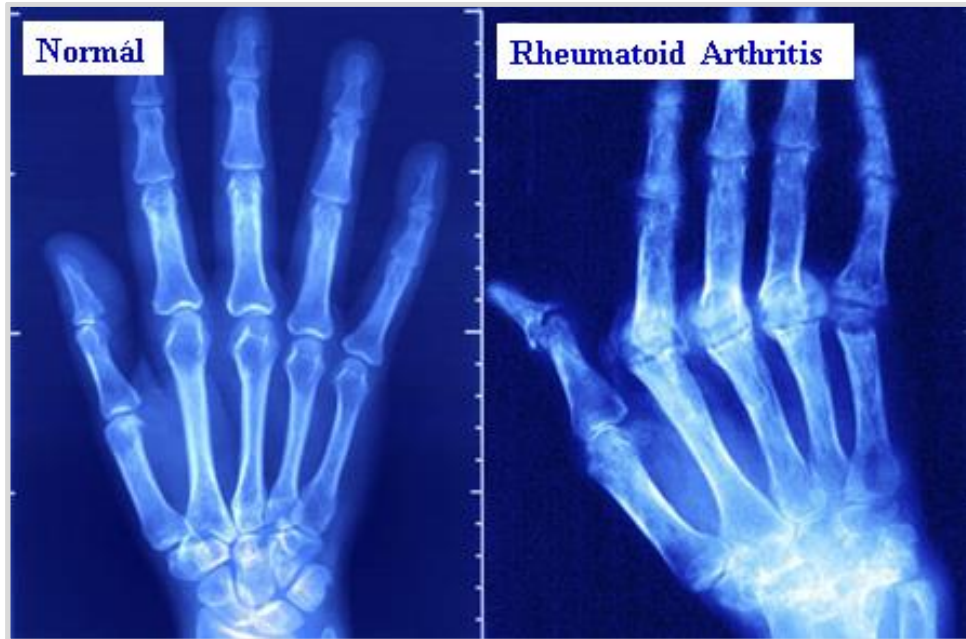
A gyulladás tartós fájdalommal jár, hosszútávon az ízületek deformitásához, funkcióvesztéséhez vezet, ami az életminőséget jelentősen rontja és hozzájárul az érintett személy munkaképtelenné válásához, ami mind az egyént, mind a társadalmat érintő súlyos probléma. [236, 237] A kezeken jelentkező ízületi elváltozások az ujjak ulnáris, a csukló radiális deviációja, a Z (metakarpofalangeális ízület palmaris luxációja), a hattyúnyak [PIP extenzióban, disztális interfalangeális ízület (DIP) flexióban] és a gomblyuk -deformitás (PIP flexióban, DIP extenzióban), a lábakra jellemző eltérések a szubtaláris ízületek everziója, a metatarzusz fej plantáris szubluxációja, abdukált hallux és a lábujjak laterális deviációja. **(14., 15. Ábra)**



14. Ábra: A gomblyuk -deformitás.

A PIP flexiója a DIP ízület hiperextenziója, valamint a PIP ízületek szinovitisze az aponeurosis dorsalis extrém meggyulladásához és perforációjához vezethet, ami gomblyuk-deformitást eredményez.

Forrás: http://www.weborvos.hu/rheumatologia_klub/ alapján



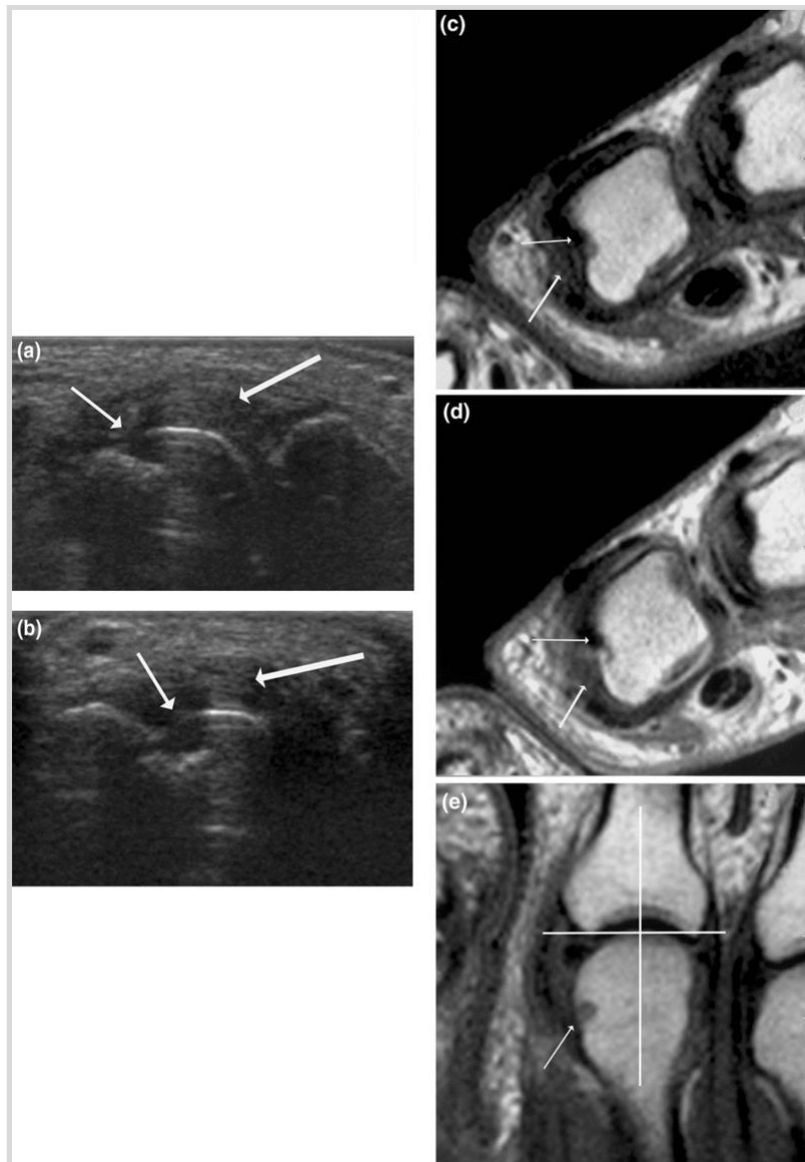
15. Ábra: Periartikuláris fokális oszteoporózis és ízületi deformáció reumatoid artritiszben.

Egészséges és reumatoid artritiszben szenvedő egyén kezének röntgen felvétele. RA-ra jellemző eltérés az MCP és a PIP ízületek gyulladása, ami lokális oszteoporózissal társulhat. Az artritiszes felvételen továbbá megfigyelhető a jellegzetes kéztartás, melynek hátterében az ízületek hiperextenziója és ulnaris deviációja áll.

Forrás: <http://www.webmd.com/rheumatoid-arthritis/ss/slideshow-ra-overview> alapján

Extraartikuláris manifesztációk közé tartozik a fájdalommentes reumatoid csomók, a tüdőfibrózis, az amiloidózis, vaszkulitisz, illetve a fokozott érlemeszesedés talaján kialakuló isémiás szívbetegség, mely magas gyakorisága miatt az RA-ban szenvedő betegek várható élettartama átlagosan 5–10 évvel rövidül meg, az átlagpopulációéhoz viszonyítva. [203, 238]

Az RA-ban kialakuló ízületi gyulladás jellemzője az ízületi belhártya jelentős megvastagodása krónikus inflammatórikus reakció miatt, ami pannusképződéssel jár, végső soron pedig fibrózishoz, az ízületek deformitásához vezet. **(14-16. Ábra.)**



16. Ábra: Erózió és szinovitisz reumatoid artritiszben.

Reumatoid artritiszben szenvedő beteg MCP ízületeiről készült ultrahang (a, b) és T1 súlyozott mágneses magrezonanciás képalkotó vizsgálattal készült felvételek (c, d, e). A vékony nyilak az eróziót, a vastagok a szinovitiszt jelölik.

Forrás: *radiopaedia.org* képanyagából

A gyulladás jellemző sejtjes elemei a fibroblasztok, leukociták, endotélsejtek, melyek inflammatorikus mediátorokat (citokineket, kemokineket, nitrogén-monoxidot, prosztaglandinokat), angiogenetikus faktorokat, enzimeket (mátrix metalloproteázok) termelnek. Az érújdonképződés és a fokozott sejtfelszíni adhézis molekula expresszió révén még több limfocita és makrofág vándorol az ízületbe. A fehérvérsejtek közül a B-, és T-limfocitáknak, valamint a makrofágoknak van kitüntetett szerepe a folyamatban. A B-sejtek autoantitesteket szecernálnak (RF, ACPA), míg a T-limfociták aránya

megváltozik. A Th1-sejt-eredetű citokinek (TNF- α , IL-1, IL-6) kerülnek túlsúlyba, a regulatórikus T-sejtek funkciója károsodik, valamint az IL-23 által stimulált Th17-sejtek és az általuk kibocsátott IL-17 jelentős mennyiségben van jelen. A gyulladás előrehaladtával a proteolitikus enzimeknek, a komplementrendszer aktiválódásának, az autoantitesteknek és a szolubilis gyulladásos faktoroknak köszönhetően a porc- és csontszövet is károsodik. [2, 211, 239] A peptidil-arginil-deimináz (PAD) enzimek működése révén létrejövő poszttranszlációsán módosult citrullinált fehérjék ellen termelődő antitestek (ACPA) az oszteoklasztokhoz kötődve és IL-8 függő útvonalon serkentik a csontfaló sejtek aktivációját, emellett a gyulladásos citokinek direkt és indirekt útvonalon is befolyásolhatják a csont és porcsejtek működését (**2. Táblázat**). [5, 181, 240]

Az RA kezelése során alkalmazandó készítmények a kortikoszteroidok és a betegségmódosító szerek (disease modifying antirheumatic drugs - DMARD), melyek közül megkülönböztetünk konvencionális szintetikus készítményeket (csDMARD: *methotrexat, azathioprim, leflunomid, sulfasalazin stb.*), célzott szintetikus (tsDMARD: *tofacitinib*) és proinflammatorikus citokineket, receptorokat blokkoló biológikumokat (bDMARD pl. *infliximab, etanercept stb.*). [241-244]

2.3.2. Arthritis pszoriatika

Az arthritis pszoriatika (AP, vagy angol nyelvterületen psoriatic arthritis - PsA) a szeronegatív (RF, ACPA többnyire nincs jelen) krónikus ízületi gyulladások közé tartozó kórkép, mely pikkelysömörrel (más néven pszoriázissal) társul.

A HLA-B27 és a HLA-DR4 allélok hajlamosítanak AP-re. A környezeti rizikófaktorok között vannak a fertőzések (pl. Chlamydia, E. coli, Streptococcus), trauma, gyógyszerek (pl. béta-blokkolók, chloroquin). A pszoriázis a népesség kb. 1-2%-ban fordul elő és megközelíthetőleg 10%-ban társul arthritisszel. A kórkép férfiakat és nőket egyaránt érint, többnyire felnőtteknél jelentkezik (kb. 30-40 évesen), de leírtak már gyermekkorban kezdődő formát is. [3] A diagnózis felállításához szükséges kritériumokat a **6. Táblázat** foglalja össze. [245, 246]

6. Táblázat: Az artritisz pszoriatika klasszifikációs kritériumai.

CASPAR= artritisz pszoriatika klasszifikációs kritériumrendszer (Classification Criteria for Psoriatic Arthritis), RF= reumatoid faktor

Moll-Wright kritériumok (diagnózis valószínű a 3 pont teljesülése mellett)
- gyulladásos artritisz (perifériás artritisz, szakroileitisz és spondilitisz) - pszoriázis - szeronegativitás (többnyire nincs RF) <i>a kritériumrendszer specificitása: 1; szenzitivitása: 0,858</i>
CASPAR kritériumok (az ízületi gyulladás mellett még legalább 3 pont jelenléte szükséges)
- pszoriázis (2 pont) - pszoriázis korábbi előfordulása (1 pont) - pszoriázis a családi anamnézisben (1 pont) - daktilitisz (1 pont) - juxtaartikuláris újcsont képződés (1 pont) - körömatrófia (1 pont) - RF negativitás (1 pont) <i>a kritériumrendszer specificitása: 0,992; és szenzitivitása: 0,917</i>

Forrás: Taylor W et al. (2006) Arthritis Rheum; Zlatkovic-Svenda M et al. (2013) Acta Reumatol Port [245, 246] alapján

Az AP-ben fellépő krónikus artritisz fájdalommal, az életminőség hanyatlásával, a munkaképesség beszűkülésével jár. A mozgásszervi tünetek többnyire éjszaka legkifejezettebb ízületi fájdalommal kezdődnek. Klinikailag a bőrt és a körmöket érintő pszoriázis mellett jellemző lehet a perifériás artritisz, mely lehet szimmetrikus (az RA-hoz hasonló módon), de aszimmetrikus is, emellett az axiális ízületek érintettsége is gyakori (Bechterew-kórhoz hasonlító forma). A kisízületek közül elsősorban a DIP, a PIP, a MCP és a MTP involvált. **(17., 18. Ábra)**



17. Ábra: Perifériás típusú artritisz pszoriaticában szenvedő egyén kezei.

A fotón jól megfigyelhető az ízületi gyulladás okozta deformitás és a pszoriázisos plakkok.

Forrás: <http://emedicine.medscape.com/article/2196539-overview> alapján



18. Ábra: Deformitást okozó ízületi gyulladás artritisz pszoriaticában.

A röntgenfelvételen a MCP, a PIP, a DIP ízületek destruktív léziója ábrázolódik helyenként szubluxációval. Az ízületeket alkotó csontvégeken litikus felritkulások és szklerózis is egyaránt megfigyelhető. A kéztőcsontok ízületein szubkondrális szklerózis is látható.

Forrás: <http://www.gentili.net/Hand/psoriasis.htm> alapján

Az AP radiológiai képére az oszteoklasztok és az oszteoblasztok fokozott működésére utaló eróziók és csontproliferáció is egyszerre lehet jellemző, emellett jellegzetes a periosztitisz, a disztális ujjpercek mutilációja, ceruzahegy (vagy „pencil-in-cup”) deformitás, szakroileitisz is. [247] **(18. Ábra)** Súlyos destruktív formáját artritisz mutilánsznak nevezzük. Extraartikuláris manifesztációja lehet pericarditisz, amiloidózis, uveitisz, iridociklitisz és társuló gyulladásos bélbetegség is.

Patomechanizmusában sejtes és szolubilis elemek is szerepet játszanak. A fehérvérsejtek közül a makrofágok, granulociták, T-sejtek megváltozott működése járul hozzá a kórkép kialakulásához. A citokinek közül jelentős szerep jut a főként makrofágok, NK és T-sejtek által termelt IL-23-nak, melynek receptora a T-limfocitákon található és hatására Th17 irányba indul meg a sejtek differenciálódása. Ezt a folyamatot támogatja a Treg-sejtek alulműködése is. A Th17-limfociták IL-17-et termelnek, mely az IL-1-gyel és a TNF- α -val szinergisztikus hatású, illetve az NF- κ B útvonalat aktiválja, valamint az IL-6 génjének expresszióját segíti elő, így az ízületben a oszteoklasztokat és a szinoviális fibroblasztokat képes aktiválni, a bőrben az epidermális sejtek fokozott reciklizációját váltja ki, keratinociták citokin termelését triggereli. [6] A Th17-sejtek mellett a veleszületett limfoid sejtek 3-as típusa (*innate lymphoid cells 3*), a γ/δ T-sejtek, Th22 és a CD8+ T-limfociták is szecernálnak IL-17-et. [6]

Az AP jelen ismereteink szerint az RA-hoz hasonlóan ma még nem gyógyítható. A terápia célja a tünetek enyhítése, a progresszió megállítása, az életminőség javítása és a szövődmények megelőzése. Az alkalmazott készítmények AP-ben az NSAID-ok, szteroidok, DMARD-ok és a biológiai terápiák. [248-250]

2.3.3. A reumatoid artritisz és az artritisz pszoriatika összehasonlítása

Az RA és az AP gyulladásos reumatológiai betegségek. A két kórkép jellemző differenciál- és képalkotó diagnosztikai vonatkozásait a **7. és 8. Táblázat** foglalja össze. [251]

7. Táblázat: Az RA és az AP differenciál-diagnosztikája.

ACPA= ciklikus citrullinált peptid ellenes antitest, DIP= disztális interfalangeális ízület, HLA= humán leukocita antigén, RF= reumatoid faktor

Jellemzők	RA	AP
prevalencia kaukázusi populációban	0,5-1%	0,1-0,2%
leggyakoribb kezdet	40-60 évesen	30-40 évesen
nemek aránya (nők: férfiak)	3: 1	1: 1
hajlamosító allélek	HLA-DR4	HLA-B27, -DR4
pszoriázis	-	+
pszoriázis a családi anamnézisben	-	+
ízületi eloszlás	szimmetrikus; perifériás ízületek	aszimmetrikus vagy szimmetrikus; perifériás és/vagy axiális ízületek
DIP ízület érintettsége	-	+
mono-/oligoartikuláris kezdet	-	+
daktilitisz	-	+
entezitisz	-	+
periosztitisz	-	+

Jellemzők	RA	AP
tendinitisz	+	-
vaszkulitisz	+	-
ankilózis	-	+
sugárérítettség (összes ízület egy ujjon)	-	+
gerinc érintettség	+ (atalantoax.)	+
reumatoid csomó	+	-
RF	+ (kb. 80%)	- (kb. 10%)
ACPA	+++	-

Forrás: Mc Ardle A et al. (2015) Arthritis Res Ther [251] alapján

8. Táblázat: Radiológiai különbségek RA-ban és AP-ben.

A krónikus gyulladás következtében kialakuló csontdestrukció különböző radiológiai képpel társul reumatoid artritiszben és artritisz pszoriaticában. CT= komputertomográfia, DIP= disztális interfalangeális ízület, MRI= mágneses magrezonanciás képalkotás, UH= ultrahang

Jellemzők	RA	AP	Képalkotó eljárás
eróziók száma	+++	+	röntgen
eróziók mérete	+++	++	μ-CT
eróziók formája	U- formájú	tubuláris	μ-CT
eróziók eloszlása	radiális dominancia	egyenletes	μ-CT
DIP erózió	+	+++	UH, MRI, röntgen
oszteofiták száma	+	+++	μ-CT
oszteofiták mérete	+	+++	μ-CT
csont proliferáció	-	+++	UH, MRI, röntgen

Jellemzők	RA	AP	Képkalkotó eljárás
szinovitisz	+++	++	MRI, UH
tenoszinovitisz	+++	++	MRI, UH
entezitisz	+	+++	MRI, UH
daktilitisz	-	+++	MRI, UH
arthritis mutiláns	-	+	röntgen

Forrás: Mc Ardle A et al. (2015) Arthritis Res Ther [251] alapján

A két megbetegedés patomechanizmusában is jelentős különbségek fordulnak elő. Az RA patogenezisében az IL-1, IL-6 és a TNF- α , míg AP-ben az IL-17, IL-23 és a TNF- α a leginkább meghatározó. [252] **(9. Táblázat)** Az RA-ra a periartikuláris fokális oszteoporózis a jellemző, míg AP-ben litikus és szklerotikus léziók egyaránt lehetnek a gyulladt ízületek környezetében. Az AP perifériás, vagy angol irodalomban „RA-szerűnek” is titulált poliartritiszes formájára jellemző inkább az oszteolízis, míg az axiális, vagy „spondilitisz ankilopoetika-szerű” típusára a csontújdonképződés. RA-ban gyakori az ACPA pozitivitás oszteoklasztogenetikus hatást válthat ki. Emellett RA-ban a gyulladt ízületekben több T- és B-limfocita van, míg AP-ben jelentősebb az érújdonképződés, magasabb az angiopoietin-2, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), bázikus fibroblaszt növekedési faktor expresszió. [251, 252] **(9. Táblázat)**

9. Táblázat: Az ízületi károsodás biomarkerei reumatoid arthritisben és arthritisz pszoriaticában.

anti-CARP= karbamilált peptid ellenes antitest, ACPA= ciklikus citrullinált peptid ellenes antitest, A-SAA=akut fázis szérumszám, amyloid A, CCL= kemokin ligand, IL= interleukin, MCP-1= monocita kemoattraktáns protein-1, MMP= mátrix metalloproteáz, RF= reumatoid faktor, VEGF= vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

Biomarkerek	RA	AP	A molekulák szerepe az arthritiszek patomechanizmusában
adiponektin	+	-	a szinoviális fibroblasztok IL-6, MMP-1; és a kondrociták IL-6, TNF- α , MCP-1 termelését növeli

Biomarkerek	RA	AP	A molekulák szerepe az artritiszek patomechanizmusában
angiopoetin-1	+	-	angiogenezis
angiopoetin-2	-	+	angiogenezis
anti-CARP	+	-	homocitrullin tartalmú peptidek kötése
ACPA	+	-	komplementaktiváció
A-SAA	+	+	MMP termelést segíti elő
calgranulin	-	+	fagocita aktivációban során szabadul fel
calprotectin	+	+	mieloid eredetű sejtek aktivitását befolyásolja
CCL-3	-	+	bazofil, eozinofil granulocita, monocita, limfocita kemoattraktáns
CCL-11	-	+	eozinofil granulocita kemoattraktáns
IL-13	+	-	B-sejtek antitest termelése
IL-15	-	+	T-sejt proliferáció, B-sejt differenciálódás
IL-16	+	-	CD4+ T-sejtek, monociták és eozinofilek kemotaxisa, T-sejtek aktivációját befolyásolja
IL-22	+	-	fibroblasztok proliferációját indukálja, illetve a MCP-1 termelést serkenti
MMP-1 és -3	+	-	kollagén degradációban játszik szerepet

Biomarkerek	RA	AP	A molekulák szerepe az artritiszek patomechanizmusában
RF	+	-	immunkomplexeket formál, komplementet aktivál
VEGF	+	++	az angiogenezis és a vaszkuláris permeabilitás potens induktora

Forrás: Mc Ardle A et al. (2015) Arthritis Res Ther [251] és Veale DJ et al. (2015) RMD Open [252] alapján

RA-ban és AP-ben eddig ma még kevés adat áll rendelkezésre az extracelluláris vezikulák szerepéről az ízületi destrukció létrejöttében. [83] Lehetséges, hogy az EV-k citokineket, antigéneket (pl. citrullinált fehérjék), immunkomplexeket vagy miRNS-eket szállítanak, felületet biztosítanak effektor molekulák számára, fokozhatják a fehérvérsejtek adhézióját, aktiválhatják a komplementrendszert, apoptózist indukálhatnak, ezáltal hatással lehetnek a kötőszöveti és immunsejtek működésére, a gyulladásos folyamat beindítására és fenntartására. [81, 83] RA-ban emelkedett vérlemezke-eredetű MV számot írtak le plazmában, illetve az IL-1 –et tartalmazó MV-k stimulálták a szinoviális fibroblasztokat. [84, 85] (ld. 2.1.2. Intercelluláris kommunikáció extracelluláris vezikulákkal) AP-ben eddig nem publikáltak plazma, illetve szinoviális extracelluláris vezikula profilra vonatkozó adatot.

A két kórkép patomechanizmusának pontos és részletes feltérképezése hozzájárul az artritiszek patogenezisének jobb megértéséhez.

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. Megbízható extracelluláris vezikula (mikrovezikula és exoszóma) izolálási és tárolási protokoll beállítása.
2. A plazma-eredetű exoszómák és mikrovezikulák hatásának vizsgálata a humán *in vitro* oszteoklaszogenezisre egészséges egyének mintáin.
3. Reumatoid artritiszben és artritisz pszoriatikában szenvedő donorok vérében jelenlévő exoszómák és mikrovezikulák hatása a csontfaló sejtek *in vitro* differenciálódására.
4. Az extracelluláris vezikulák *in vitro* oszteoklasztogenezist befolyásoló hatásának molekuláris háttere.

4. MÓDSZEREK

4.1. Donorok

10. Táblázat: A donorok adatai.

ACPA= ciklikus citrullinált peptid ellenes antitest, AP= artritisz pszoriatica, CRP= C reaktív protein, DAS= betegségaktivitási pontszám (disease activity score), DMARD= betegségmódosító antireumatikus szerek (disease modifying antirheumatic drugs), RA= reumatoid artritisz

	Egészséges	RA	AP
Donorok száma	19	20	15
Férfiak; Nők	11; 8	17; 3	7; 8
Életkor (év)	38,42±13.2	58±11,77	53,06±8,5
Betegségtartam (év)	-	10,55±9,7	5,83±3,81
Átlag DAS	-	4,79±1,96	2,79±0,72
Szteroid %	-	70	13,3
Konvencionális DMARD%	-	95	65
Biológiai DMARD%	-	35	53,5
Átlag RF (NE/ml)	-	146	5,94
Átlag ACPA (AE/ml)	-	813,9	-
Átlag CRP (mg/ml)	-	21,56	7,28
Átlag Süllyedés (mm/h)	-	36,65	16,93
Vörösvértest konc. (T/l)	-	4,15	4,755

		Egészséges	RA	AP
Vérlemezke	konc.	-	316,75	251,33
(G/l)				
Fehérvérsejt	konc.	-	8,46	10,75
(G/l)				
Neutrofil %		-	57,42	63,23
Eozinofil %		-	1,94	2,83
Bazofil %		-	0,07	0,03
Limfocita %		-	22,42	31,90
Monocita %		-	5,30	6,90

Forrás: Marton N et al. (2017) Cell Mol Life Sci [253] alapján

Kísérleteinkhez a vért egészséges donorok (nincs ismert reumatológiai kórkép, minimum két hete nem zajlott semmilyen heveny infekciózus megbetegedés, a vérvétel idejében gyógyszert nem szedtek) és a 2010 ACR/EULAR kritériumrendszer alapján reumatoid artritiszben **(5. Táblázat)**, illetve a CASPAR klasszifikáció **(6. Táblázat)** szerint poliartritiszes típusú artritisz pszoriaticában szenvedő egyének adták. [235, 245] A betegek közül mindenkinek legalább közepes aktivitású volt az artritisze a DAS (disease activity score) értékek alapján. Az RA minták a Budai Irgalmasrendi Kórház Reumatológiai osztályáról származnak, az AP minták egy része szintén a Budai Irgalmasrendi Kórházból, másik része a Glasgow Royal Infirmary-ből érkezett. Az artritiszes véradóktól a mérésekhez donált vér levételi idejéhez legközelebb eső vérképet is regisztráltuk. **(10. Táblázat)** A kísérletek elvégzéséhez szükséges etikai engedély rendelkezésünkre állt (TUKEB 22244/2013/EKU (280/2013)). A munkát a Helsinki Deklarációban (1975.) foglaltaknak megfelelően végeztük.

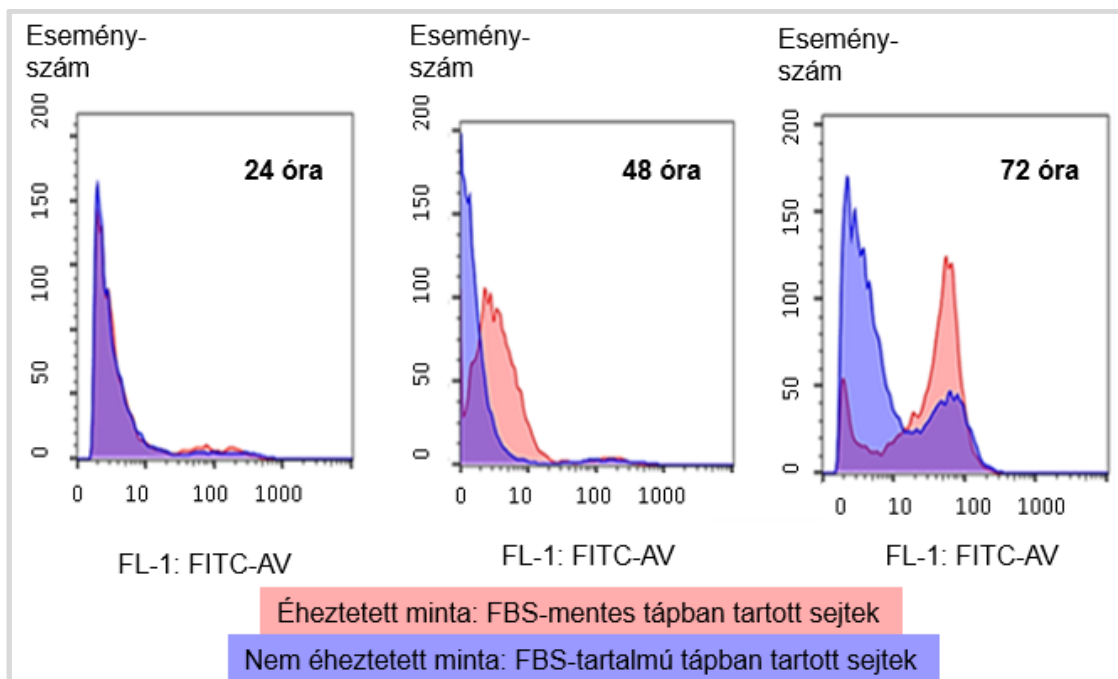
4.2. Kísérleti állatok

Az exoszóma izolálási protokoll beállításához a humán donoroktól begyűjtött minták mellett patkányok hasi aortájából citromsavas dextrózos (ACD-A) vérvételi csövekbe (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Ausztria) levett vért is használtunk. A kísérleti állatok a Farmakológia és Farmakoterápiás Intézet állatházából származó „Wistar” típusú hímnemű, albinó, 250-300 g testtömegű, 45-50 napos példányok voltak. Az EV-eket a humán minták feldolgozásához használt protokollal azonos módon preparáltuk, ezért a vonatkozó metodológiai részben együttesen tárgyaljuk az alkalmazott módszereket (ld. 4.4. Extracelluláris vezikula izolálás vérmintákból és sejtfelülszóból). Az állatok tartása és feldolgozása az amerikai székhelyű NIH (National Institute of Health, Egyesült Államok) által megállapított vonatkozó ajánlás (NIH publikáció No. 85–23, revízió 1996-ban), valamint az EU direktíva (2010/63/EU) és a Semmelweis Egyetem által támogatott etikai engedély szerint történt.

4.3. Sejtvonal

A fenotípusában monocitákra emlékeztető U.937 nem letapadó, humán hisztiocitás limfóma sejtvonalat ATCC-től (American Type Culture Collection) szereztük be. [254] A sejtek 10^6 /ml denzitásban voltak RPMI (Roswell Park Memorial Institute) médiumban tartva (Sigma, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok), mely 10 v/v % magzati borjúsavóval (FBS) (Gibco Laboratories, Gaithersburg, Maryland, Egyesült Államok), 2 mM L-glutammal (Sigma), 100 U/ml Penicillin-Streptomycinnel (Sigma) volt kiegészítve. A sejtvonal szuszpenziós sejtekhez ajánlott flaskában (Sigma) 37 °C-on 5% CO₂-n került tárolásra. Az esetleges mikoplazma fertőzést rendszeresen DAPI-alapú (4',6-diamidino-2-phenylindole) festéssel detektáltuk.

A viabilitást FBS-mentes médiumban történő 24, 48 és 72 órás inkubációt követően mértük: a lecentrifugált sejteket Annexin V (AV)–kötő pufferben (BioLegened, San Diego, Kalifornia, Egyesült Államok) szuszpendáltuk fel és $5 \mu\text{l}/10^5$ sejt mennyiségű Annexin V-FITC (fluoreszcein-izotiocianát) (BioLegened) festékkel festettük, majd áramlási citométerrel (flow cytometry - FCM) detektáltuk a foszfatidil-szerin externalizáció mértékét. **(19. Ábra)**



19. Ábra: Az apoptózis mértéke U.937 sejtekben 1, 2, 3 nap után FBS-t tartalmazó és FBS-mentes tápban.

Annak érdekében, hogy megállapítsuk az ideális inkubációs hosszt, ameddig a sejtek éheztetés mellett nem mutatnak jelentős mértékű pusztulást, áramlási citometriás méréseket végeztünk. Ahogy az a hisztogramokon is látszik, az éheztetett (piros) mintákban az AV + események száma a három mérési pont közül 24 óra után volt a legalacsonyabb, ekkor az FBS-tartalmú és FBS-mentes tápban tartott sejtek viabilitása nem különült el élesen, ami alapján kísérleteinkhez 1 nap éheztetés után használtuk fel a sejtek felülszóját. AV= annexin V, FITC= fluoreszcein izotiocianát, FL= fluoreszcens tengely

4.4. Extracelluláris vezikula izolálás vérmintákból és sejt felülszóból

A sejtvonal eredetű EV-eket 50 ml, az állati-eredetű vezikula kontamináció elkerülése miatt, FBS-mentes U.937 sejtvonal felülszóból izoláltuk. Az apoptózis és nekrozis aránya 5% alatt volt a propidium-jodid és az annexin-V festések alapján, amit áramlási citométerrel mértünk. A kondicionált médiumból 300 g 10 perces centrifugálással ülepítettük ki a sejteket.

A perifériás vénás vérmintákat közepes érleszorítás mellett (25 ml/ donor) ACD-A vérvételi csövekbe gyűjtöttük. [80, 108] Vervétel után a csöveket ötször óvatosan megforgattuk. A humán (lsd. 4.1. Donorok) és az állati (lsd. 4.2. Kísérleti állatok) mintákat azonos módon dolgoztuk fel.

A sejtmentesített felülúszót/plazmát 2500 g-n centrifugáltuk kétszer 15 percig szobahőn Avanti J-26S (Beckman Coulter, Brea, Kalifornia, Egyesült Államok) készülékkel, így az első lépés után vérlemezkében gazdag (platelet rich plasma – PRP), majd a második centrifugálás után vérlemezke-mentes plazmát (platelet free plasma-PFP), valamint sejtektől és nagyobb sejtfragmentumoktól mentes sejt felülúszót kaptunk. Ezután a mintákat 0,8 µm-es pórusátmérőjű szűrőn filtráltuk ráadott nyomás nélkül (Whatman Puradisc, Sigma). A mikrovezikulákat 20000 g-n 60 perc 16 °C (Eppendorf centrifuga, Hauppauge, New York, Egyesült Államok), az exoszómákat 100000 g-n MLA-55 fix és MLS-50 kilendülő rotorok segítségével 70 perc 4 °C (Optima Max-XP ultracentrifuga, Beckman-Coulter) pelletáltuk és mostuk. A protokoll végén a mintákat 0,2 µm-es pórusátmérőjű filteren szűrt 1*PBS-ben vettük fel a sejtkézelésekhez, méret és koncentráció meghatározáshoz (qNano, IZON); szintén PBS-ben, vagy ABP-ben az áramlási citometriás mérésekhez; lízis pufferben (CellLytic, Sigma) a western blothoz, paraformaldehidben (PFA) (Sigma) a transzmissziós elektronmikroszkópiához (TEM) vagy steril desztillált vízben toxicitási vizsgálatokhoz (melyeket az Országos Környezetegészségügyi Intézetben vizsgáltattunk be, *limulusz amőbocita lizátum* módszerrel). [255] A sejtkézelésekhez a 25 ml mennyiségű vérből izolált EV-ket két adagban (a differenciáltatási protokoll 2. és 5. vagy 6. napja lásd. 4.11. *In vitro* oszteoklaszt differenciáltatás) mértük fel 3 párhuzamos mintára. Az EV preparátumokat aliquotolva felhasználásig (maximum 4 hét, de általában egy héten belül) -80 °C-n tároltuk.

Az exoszóma minták izolálásával, tárolásával kapcsolatos kísérletekhez 7 ml egészséges donor vagy patkány plazmamintákból kiindulva a mikrovezikula-mentesített preparátumokat 1, 3, 6, és 14 órán keresztül ultracentrifugáltuk 4 °C-on, majd az 1 órás menetidőn pelletált mintákat PBS-ben mosás után szintén 1 órás, a hosszabb ideig ultracentrifugált preparátumokat 2 órás ismételt ultracentrifugálási lépéssel ülepítettük. Ezt követően a pelleteket a méreteloszlás, koncentráció (qNano), dinamikus fényszórás (DLS) mérésekhez PBS-ben, TEM-hez PFA-ban, western blothoz lízis pufferben vettük fel. Az EV preparátumokat itt is aliquotolva felhasználásig maximum 8 hétig 4 °C-on vagy -80 °C-on tartottuk.

4.5. Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

Az EV preparátumokat elektronmikroszkópia segítségével vizualizáltuk, amely egy széles körben elfogadott módszer a vezikulák vizsgálata során, mivel a képletek alakja, belső szerkezete és az esetleges szennyeződések is megfigyelhetők vele. Az EV izolálási protokoll végén a pelletre 500 µl 3%-os PFA-t mértünk. 24 óra inkubáció után a PFA-t 1*PBS-sel kimostuk, majd a preparátumokhoz 1% ozmium-tetraoxidot (Taab Laboratories, Aldermaston, Egyesült Királyság) adtunk majd 30 percig inkubáltuk a mintákat. Ezután a preparátumokat desztillált vízzel mostuk, majd etanolban dehidráltuk és 50% etanol - 1% uranil-acetát hozzáadásával jelöltük, majd Taab 812 (Taab) gyantába ágyasztuk be és egy éjszakán át hagytuk polimerizálódni. Ezután ultravékony metszeteket készítettünk és Hitachi 7100 mikroszkóppal vizsgáltuk a mintákat. [111] A TEM felvételeket ImageJ (NIH) szoftver segítségével elemeztük.

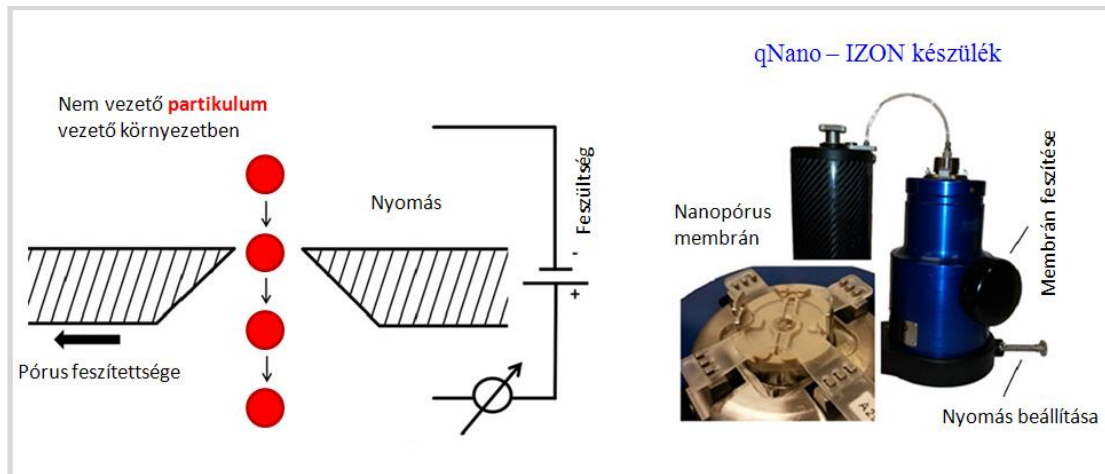
4.6. Dinamikus fényszórásmérés (DLS= dynamic light scattering)

A DLS-el a vezikulák fényszórását szuszpenzióban lehetséges vizsgálni, amely alapján kiszámolhatjuk a képletek méreteloszlását. A kísérlethez egy goniométerhez (ALV GmbH, Langen, Németország) rögzített diódalézer (CVI Melles Griot, Irvine, Kalifornia, Egyesült Államok; hullámhossz: 457,5 nm) használtunk. A szórt fény intenzitását 90°-ban detektáltuk, és a méreteloszlás meghatározásához szolgáló kiinduló függvényt IBM-PC alapú rendszerrel elemeztük. A partikula méreteloszlást a maximum entrópia módszer használatával határoztuk meg. [112]

4.7. A vezikulák méreteloszlásának és koncentrációjának mérése „rezisztív pulzus érzékelő módszerrel”

A vezikulák átmérőjét, koncentrációját qNano készülék („resistive pulse sensing method” IZON Science, Christchurch, Új-Zéland) segítségével vizsgáltuk a gyártó cég (IZON) protokollja alapján. [113] **(20. Ábra)** A mikrovezikula mintákhoz NP800 és NP400, az exoszóma mintákhoz NP300, NP200 nanopórus membránokat használtunk, melyeket 43-47 mm-esre feszítettünk és maximum 10 mbar nyomást alkalmaztunk a detektálás során. Az áramerősség 100-140 nA, a feszültség 0,04-0,7 V közé volt állítva.

A zaj (RMS noise) 15 pA alatt volt. A program 3 percig rögzítette a méréseket. A kalibrációt ismert koncentrációjú kalibráló gyöngyök (CPC) segítségével végeztük, mindig az adott membránhoz illő (CPC800, CPC400, CPC300, CPC200) gyöngyöt használtunk 1:2000 hígításban 1*PBS-ben. A PBS-ben felvett MV és EXO mintákat még 1:100 hígítottuk 1*PBS-ben a detektáláshoz.



20. Ábra: A qNano készülék működési elve.

A nanopórus membránok (NP) feszítése kapcsán szabaddá váló pórusokon a ráadott nyomás hatására keresztül haladnak a vezikulák, amelyek ellenállásként jelennek meg. A készülék az áramerősség változásait regisztrálja.

Forrás: <http://journals.co-action.net/index.php/jev/article/view/25922> alapján

4.8. Western blot

Az exoszómák detektálásához pozitív és negatív markerek jelenlétét vizsgáltuk szemikvantitatív immunoblot módszerrel (a mikrovezikulák detektálására nincsen az exoszómákéhoz hasonló western blotnál használt pozitív-negatív marker ajánlás). **(11. Táblázat)**

11. Táblázat: Az exoszómákra jellemző (pozitív marker) és nem jellemző (negatív marker) proteinek.

Pozitív EXO markerek		Negatív EXO markerek
Transzmembrán vagy lipidkötött extracelluláris proteinek	Citoszólikus proteinek	Intracelluláris proteinek
-Tetraspaninok (CD9, CD63, CD81), -Integrinek, vagy egyéb sejtadhéziós molekulák (ITG, CAM), -Növekedési faktor receptorok, -Heterotrimerik G fehérjék, -Foszfatidilszerin-kötő MFGE8/ laktadherin	-Endoszómális vagy membránkötő fehérjék (TSG101, annexinek, RAB proteinek), -Szignáltranszdukciós és scaffold proteinek (syntenin-1)	-Endoplazmatikus retikulum eredetű fehérjék (calnexin, HSP90B1), -Golgi (GM130), -Mitokondrium (citokróm), -Sejtmag (hisztonok) eredetű fehérjék, -Argonauta-RISC komplex

Forrás: Lotvall J et al. (2014) J Extracell Vesicles [121] alapján

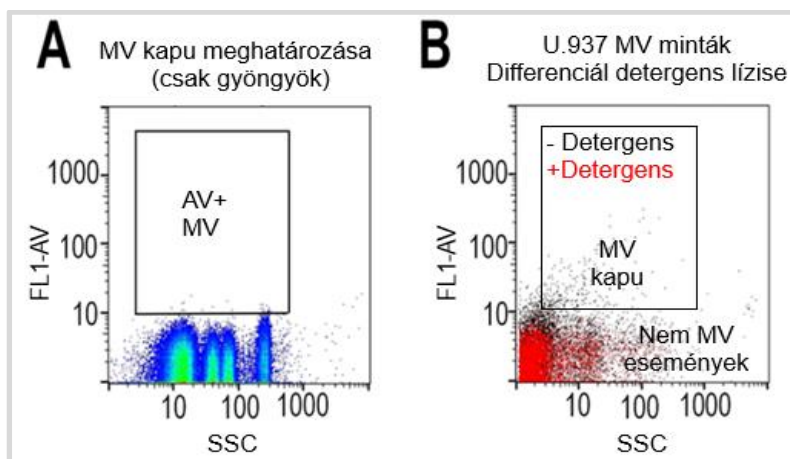
Ultracentrifugálás után az EXO pelleteket proteáz inhibitorokkal kiegészített 20 µl CellLytic lízis pufferben (Sigma) vettük fel, majd a fehérje koncentrációt mikro BCA (micro bichinchoninic acid) módszerrel (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) és NanoDrop ND-1000 készülékkel (Thermo Scientific Software ND-1000 V3.8.1) mértük a gyártók utasításai szerint. A mintákból 5 µg fehérjét adtunk 1/5 rész redukáló loading pufferhez (Pierce Lane Marker Reducing Sample Buffer, Thermo Scientific), majd 100 °C-on 5 perc inkubáció után a mintákat Mini-PROTEAN géleken (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, Egyesült Államok) futtattuk, majd PVDF membránokra (Bio-Rad) blottoltuk. Ezt követően 5% tejporos 1*TBS (Tris buffered saline) - 0,1% Tween 20 pufferrel blokkoltunk 60 percen keresztül, majd a megfelelő elsődleges antitestet adtuk 1% tejporos 1*TBS - 0,1% Tween 20 pufferhez [1:1000 anti-CD63 (SantaCruz BioTechnology, Dallas, Texas, US), anti-CD9 (Sigma), anti-syntenin-1 (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, Egyesült Államok), anti-TSG101 (Sigma), 1:5000 anti-calnexin (Sigma), 1:20000 anti- albumin (SantaCruz)] és az antitesttől függően 60 percig szobahőn, vagy egy éjszakán át (16 óra) 4 °C-on inkubáltuk a

membránokat. 30 perc TBS-es mosás után másodlagos antitesttel [1:1000 anti- nyúl (Sigma), 1: 10000 anti- egér (Dako, Agilent Technologies, Glostrup, Dánia)] inkubáltunk 30 percig szobahőn az 1% tejporos 1*TBS - 0,1% Tween 20 oldatban, majd ismételt 30 perces mosás után ECL reagenssel kezeltük a membránt a gyártó utasításai szerint (Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate, Thermo Scientific). A kemilumineszcenciát sötét szobában standard röntgenfilmmel, hívó és fixír oldatok segítségével detektáltuk (Amersham Biosciences, GE, Amersham, Egyesült Királyság). A filmeket beszkeneltük és ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, Egyesült Államok) programmal elemeztük az optikai denzitás értékeket.

4.9. Áramlási citometria

Az MV mintákat 1*PBS-ben, vagy annexin kötő pufferben (ABP - annexin binding buffer) (BioLegend) vettük fel. Mivel az exoszómák méretük folytán (kb. 30-150 nm) nem detektálhatóak a FACS Calibur készülékkel, így nagyobb hordozóhoz, 4 µm átmérőjű 4 w/v%-os aldehid szulfát latex gyöngyökhöz (Life Technologies) kötöttük őket a méréshez. A gyöngyök aspecifikus kötőhelyeit 1 w/v%-os szarvasmarha szérum albuminnal (Sigma) és 100 mM glicinnel (Sigma) blokkoltuk. Az EV mintákat (MV és EXO preparátumokat egyaránt) a donorsejt-eredetű markerek méréséhez anti-CD3-PerCP-Cy5.5 (Peridinin Chlorophyll Protein Complex), anti-CD19-FITC, anti-CD42b-PE, anti-CD235a-FITC (BioLegend, San Diego, CA, US) antitestekkel, illetve a RANK detektálásához primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) és szekunder fluoreszcens antitesttel (BioLegend) (FITC, PE) inkubáltuk. Emellett annexin V – FITC antitesttel (BioLegend) is jelöltünk a mikrovezikula preparátumokat, illetve CD9-FITC (Sigma) antitesttel az exoszóma mintákat. Az antitesteket minden esetben a gyártó ajánlása alapján alkalmaztuk. A méréshez a mintákat 300 µl pufferben vettük fel. Vezikula-mentes puffer festék kontrollokat, festetlen mintákat és az exoszóma minták esetében üres latex gyöngy mintákat is alkalmaztunk kontrollként a mérések során, illetve a fluoreszcens kapu meghatározásához. Az MV mintákhoz a kaput BioCytex MegaMix (Marseilles, Franciaország) gyöngyökkel határoztuk meg. **(21. Ábra)** Az MV preparátumok esetében az áramlási citometriás mérés után 0,1% Triton X-100 (Sigma) detergens adtunk a mintákhoz, majd 90 másodperc vortexelés és szuszpendálás után ismét lemértük az MV-k mennyiségét. Azokat az eseményeket tekintettük

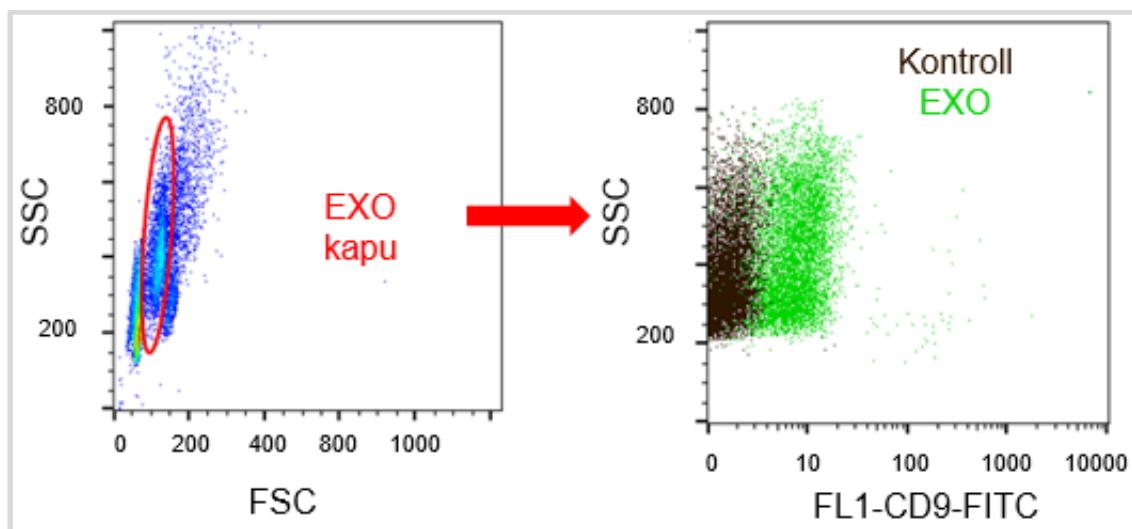
mikrovezikulának, amik a detergens hozzáadása után megszűntek, tehát a detergens előtti eseményszámból kivontuk a detergens utáni eseményszámot az MV kapuban. (21. Ábra) [112]



21. Ábra: Az MV kapu meghatározása standard gyöngyökkel, illetve az MV minták differenciál detergens lízise.

A, Az MV kaput ismert méretű gyöngyökkel határoztuk meg. **B,** Az MV detektálás során differenciál detergens lízist alkalmaztunk. A jelenség azon alapul, hogy a mikrovezikulák membránja dezorganizálódik detergens hatására. A lízis után is regisztrálható események immunkomplexek, fehérjeaggregátumok lehetnek. AV= annexin V, FL= fluoreszcens tengely, SSC= oldalszórás (side scatter)

Forrás: Marton N et al. (2017) Cell Mol Sci [253] alapján



22. Ábra: Az exoszóma kapu meghatározása áramlási citometriás mérésekhez. Az EXO mintákat 4 μ m-es aldehid-szulfát latex gyöngyökhöz kötöttük, az aspecifikus kötőhelyeket blokkoltuk, majd CD9-FITC antitesttel festettük a preparátumokat. Az exoszómákat tartalmazó minták esetében magasabb fluoreszcens jelet kaptunk (zöld), mint az exoszómákat nem tartalmazó kontroll preparátum esetében (barna). CD= cluster

of differentiation, FITC= fluoreszcein izotiocianát, FL= fluoreszcens tengely, FSC= méret (forward scatter), SSC= oldalszórás (side scatter)

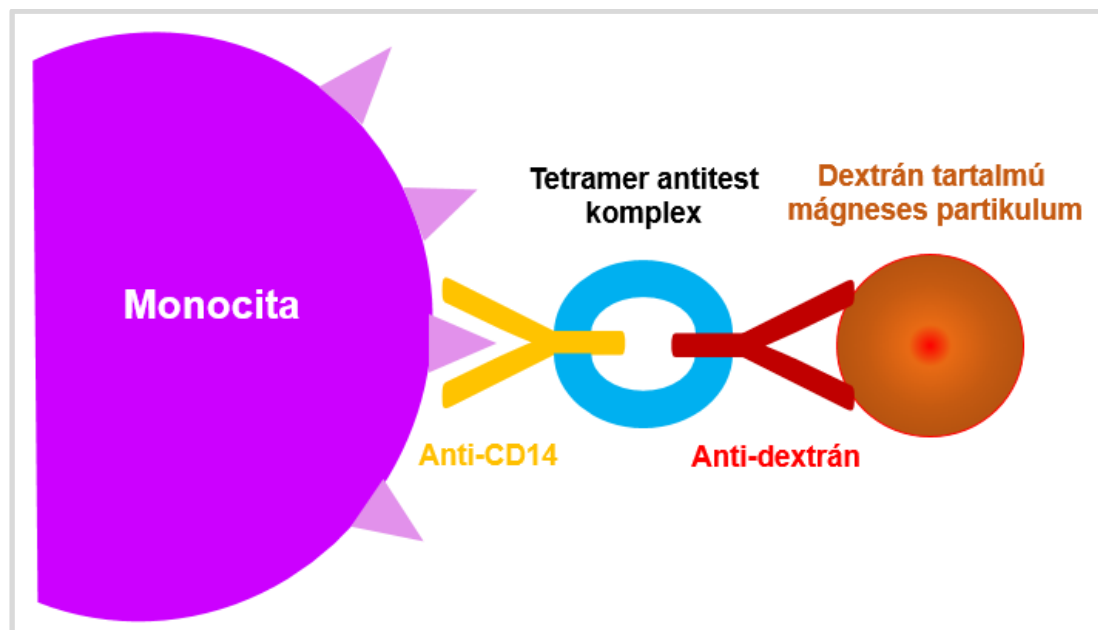
Az exoszóma méréseknél detergenst nem alkalmaztunk, mivel munkacsoportunk korábbi eredményei alapján az exoszómák detergens érzékenysége lényegesen elmarad a mikrovezikulákétól. **(22. Ábra)** [52]

4.10. Immunkomplexek előállítása

Az EV kezelések mellett kontrollként szolubilis immunkomplex (SIC) kezeléseket is alkalmaztunk, mivel az immunkomplexek jelen lehetnek az EV mintákban is. A humán IgG (Jackson ImmunoResearch, Baltimore Pike, Pennsylvania, Egyesült Államok) készítményt először 13000 RPM-en 5 percig centrifugáltuk, hogy az aggregálódott immunglobulinokat elkülönítsük. Ezután 150 μ M IgG-t összekevertünk 1* PBS-sel és 37,5 μ M rekombináns Staphylococcus Protein A (rSPA)-val (Repligen, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok), ahogy McLellan és munkatársai is eljártak korábban. [132] Majd a mintákat 1 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-n. A SIC preparátumokat minden kísérlethez frissen állítottuk elő. Különböző koncentrációjú kezeléseket alkalmaztunk a sejtenyészeteken: a fent említett SIC készítményből 1:100 adagolása a tápoldathoz felel meg az „1x” SIC mennyiségnek, de végeztünk méréseket „0,25x; 0,5x; 2x” mennyiségekkel is.

4.11. *In vitro* oszteoklaszt differenciáltatás

25 ml vénás vért gyűjtöttünk be az EV izolálásra szánt vérvétellel azonos időpontban (a protokoll 1. napja) ugyanazoktól a donoroktól EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) tartalmú vérvételi csövekbe (Greiner Bio-One). A mintából perifériás mononukleáris vérsejteket (PBMC) izoláltunk ficoll gradiens (Sigma) segítségével. A CD14+ sejteket pozitív szelekcióval, mágneses szeparációval különítettük el (EasySep, StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) a gyártó által javasolt módon. [132] **(23. Ábra)**



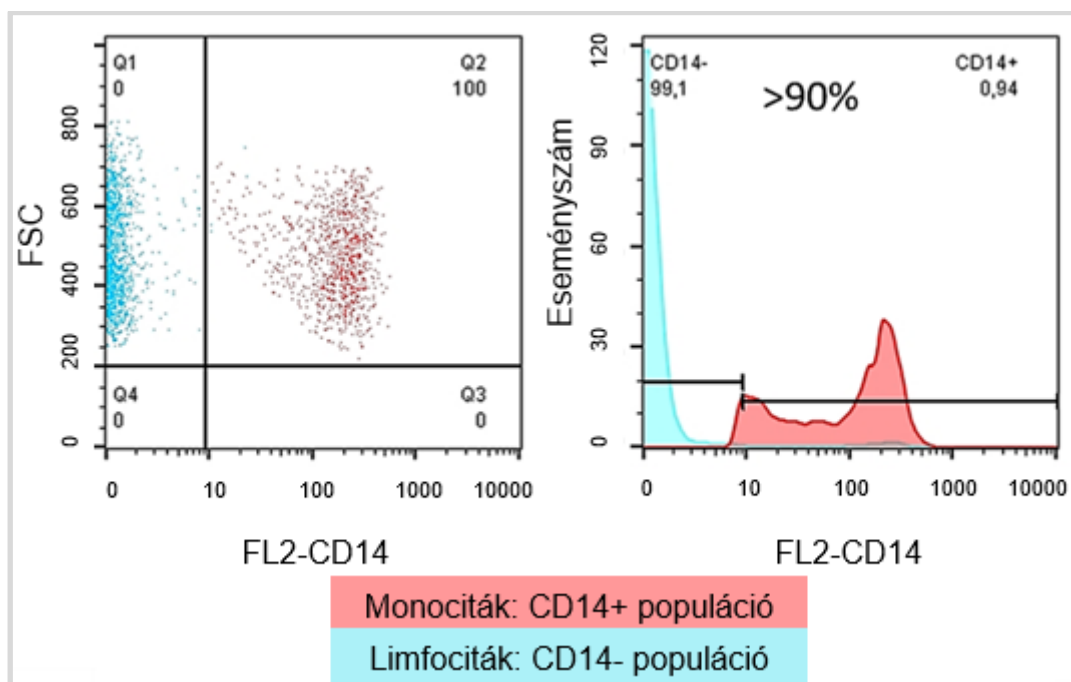
23. Ábra: EasySep mágneses CD14+ szeparációs kit működési elve. Az anti-CD14+ antitestek a monocitákon jelenlévő molekulákat ismerik fel, majd a tetramer antitest komplex anti- dextrán része a mágneses partikulumhoz köt, amely következtében a CD14+ sejtek kitapadnak a mágnesbe helyezett cső falára, így a CD14-populáció egyszerűen leönthető róluk. Ezután a műanyag csövet a mágnesből kivéve a monociták begyűjthetők.

Forrás: <http://www.enco.co.il/landing/EasySep.htm> alapján

A monocita izolálás tisztaságát CD14-PE festéssel áramlási citometriával ellenőriztük. **(23. Ábra)**

A sejteket tripánkék exklúziós módszerrel számoltuk meg mikroszkóp alatt. A monocitákat 10% FBS-sel (Gibco), 1% L-glutaminnal (Sigma) és 1% Penicillin-Streptomycinnel (Sigma) kiegészített α -MEM (minimal essential medium α , Sigma) tápban vettük fel. 10^5 sejt/100 μ l táp/ lyuk osztottuk szét a mintát. A monocitákat először 24 órán keresztül 50 ng/ml rekombináns humán M-CSF készítménnyel (PeproTech, London, Egyesült Királyság) stimuláltuk, amely növeli a RANK expresszióját. [132] Ezután a tápoldathoz adtunk 50 ng/ml koncentrációban rekombináns humán RANKL-ot (PeproTech), valamint ekkor kezeltük a sejteket EV vagy egyéb kontroll (lsd. lejjebb) preparátummal. Egy minta három párhuzamosból állt. A következő kezeléseket adtuk a médiumhoz: vér vagy U.937 – eredetű MV vagy EXO preparátum (lsd. 4.4. Extracelluláris vezikula izolálás vérmintákból és sejtfeülúszókból), illetve MV és EXO feülúszók az 1. és 2. centrifugálási lépések után, SIC „0,25x, 0,5x, 1x, 2x” mennyiségben (lsd. 4.10. Immunkomplexek előállítása), humán albumin több különböző koncentrációkban (Sigma), 1*PBS. Minden esetben alkalmaztunk kezeletlen

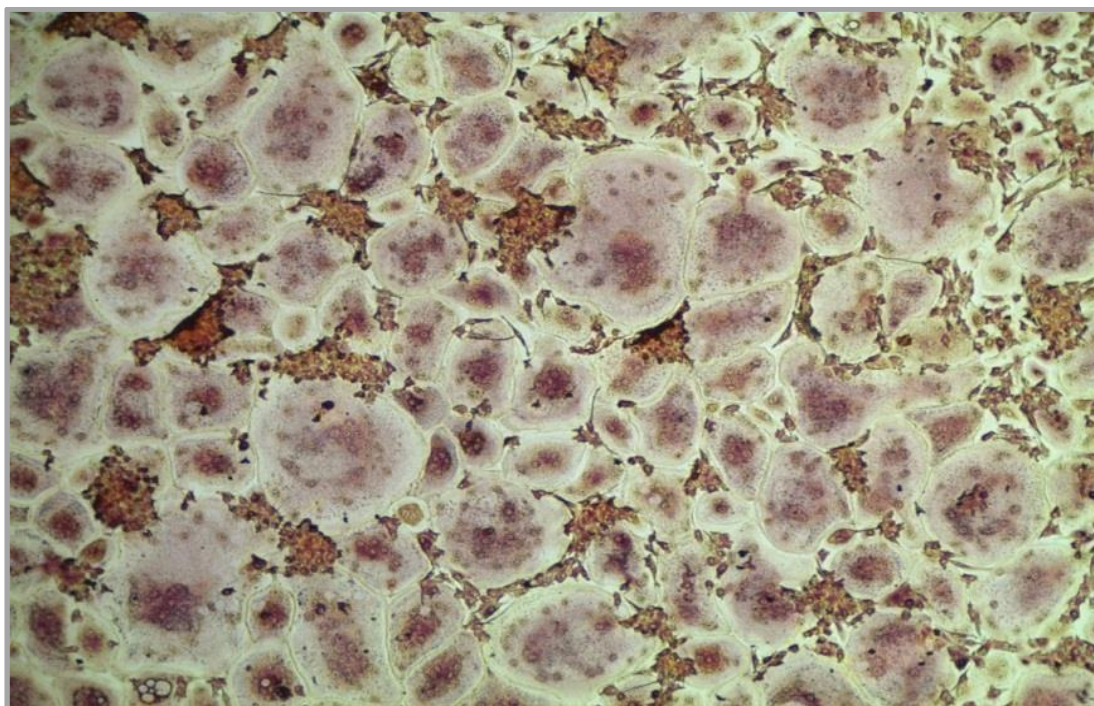
kontrollokat is, melyek akkora térfogatban kaptak steril, szűrt 1*PBS-t, mint amekkorában a szétosztásra kerülő EV minták fel voltak véve (max 10 µl/lyuk). 3 nap után cseréltünk tápfolyadékot, amikor a friss oldat mellé ismét citokineket és kezeléseket is adagoltunk, tehát az egész differenciálási protokoll alatt kétszer mértük az adott kezeléseket a sejtekre.



24. Ábra: CD14+ mágneses szeparáció eredményének ellenőrzése áramlási citometria alkalmazásával.

A sejtek CD14-PE (BioLegend) antitesttel lettek jelölve. A CD14+ populáció több, mint 90%-a expresszálta a CD14 receptort. CD= cluster of differentiation, FL= fluoreszcens tengely, FSC= forward scatter, azaz sejtméret.

A protokoll 8. napján a mintákat leukocita acidotikus foszfatáz (TRAP, Sigma) kit alkalmazásával fixáltuk citromsavas, formaldehides, acetonos fixír oldattal (Sigma) és festettük a gyártó utasításai alapján. A megfestett kiszárított mintákat Nikon (Tokió, Japán) mikroszkóppal és kamerával fotóztuk, majd a TRAP+ minimum 3 magvú sejteket oszteoklasztnak tekintve ImageJ (NIH) program segítségével rögzítettük a sejtszámot. **(25. Ábra)**



25. Ábra: Humán oszteoklaszt tenyészet tartarát rezisztens savanyú foszfátáz (TRAP) festése.

A lilás színreakciót adó sejtek expresszálják a TRAP enzimet. A minimum 3 maggal rendelkező TRAP+ sejteket számoltuk érett oszteoklasztnak. A kevesebb, mint 3 sejtmagot tartalmazó TRAP+ sejtek preoszteoklasztok. A nem festődő mononukleális sejtek monociták.

4.12. Viabilitás mérés

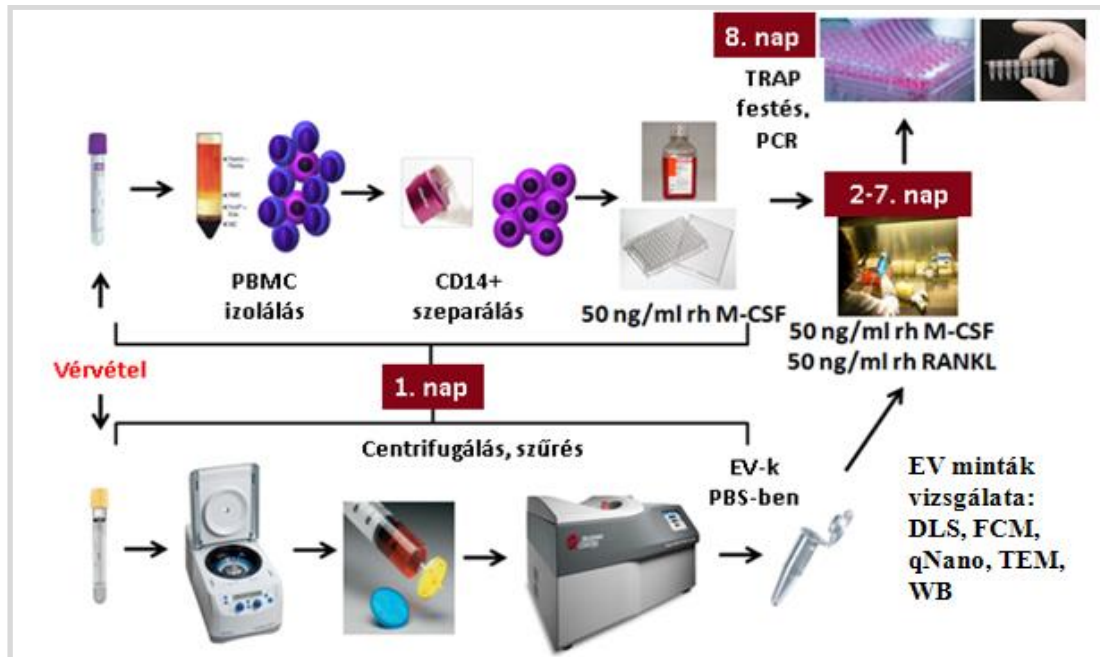
A 96 lyukú lemezen differenciáltatott oszteoklaszt tenyészetek viabilitását a protokoll 8. napján az apoptózis során fragmentálódó genomiális DNS jelölésén alapuló TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase -TdT dUTP nick end labeling) reagenssel vizsgáltuk (3 párhuzamos mintán). A sejteket In Situ Cell Death Detection Kit, AP (Roche, Bázél, Svájc) alkalmazásával fixáltuk és festettük a gyártó utasításai szerint. Pozitív kontrollként DNÁz I-el kezelt sejteket, negatív kontrollként TdT hiányos reagenst kapott sejteket alkalmaztunk. A TUNEL pozitív sejteket fluoreszcens mikroszkóp és Nikon kamera segítségével fotóztuk, majd ImageJ (NIH) programmal kvantifikáltuk. [256]

4.13. Génexpresszió vizsgálata kvantitatív valós idejű RT PCR módszerrel

A protokoll 8. napján, tehát azonos időpontban, mikor az oszteoklasztokat fixáltuk és festettük, totál RNS-t is izoláltunk egyes mintákból. 3 párhuzamos lyuk tartozott itt is egy kezeléstípushoz. Az RNS izolálást RNeasy Micro Kit (Quiagen, Venlo, Hollandia) segítségével végeztük. Az izolátumok RNS koncentrációját és szennyezettségét NanoDrop ND-1000 készülékkel (Thermo Scientific Software ND-1000 V3.8.1) regisztráltuk, csak a 260/280 >1,8 emisszió aránnyal rendelkező mintákat használtuk fel. Ezután mintánként legalább 200 ng cDNS-t írtunk át SensiFAST cDNS Synthesis Kit (BioLine, London, UK) használatával a gyártó instrukciói alapján. A qPCR reakciót 384 lyukú PCR (polimeráz láncreakció) lemezek, Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied BioSystems, Thermo Scientific) 5 ng/minta cDNS és specifikus primerek alkalmazásával hajtottuk végre. A következő génekhez ajánlott primereket alkalmaztuk: CALCR (GC07M093424), C-FOS (GC14P075278), CTSK (GC01M150768), C-FMS (GC05M150053), DC-STAMP (GC08P104339), NFATc1 (GC18P079395), OSCAR (GC19M054094), RANK (GC18P062325), TRAP (GC00U923131), SLAP-1 (GC08M133040), és SLAP-2 (GC20M036613) (IDT, San Jose, Kalifornia, Egyesült Államok). Standard valós idejű protokollt használtunk ABIPrism 7900ht PCR készülékkel. Komparatív Ct ($\Delta\Delta C_t$) módszerrel számítottuk ki a génexpressziót, melyet a glicáraldehid-3-foszfát (GAPDH) (GC12P006533), mint konstitutívan kifejeződő, háztartási gén expressziójához mértük.

4.14. Statisztika

A statisztikai számításokat és az ábrákat GraphPad Prism V6 szoftverrel (San Diego, Kalifornia, Egyesült Államok) készítettük. A normális eloszlás vizsgálatához egymintás Kolmogorov-Smirnov tesztet végeztünk. Két csoport összehasonlításához t-próbát, nem normális eloszlás esetén Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk. Több csoport összehasonlításához egyutas varianciaanalízist (ANOVA) használtunk Tukey-féle post hoc tesztel. A korrelációk vizsgálatához Pearson-féle korrelációs együtthatót számoltunk. A p értéket 0,05 alatt tekintettük szignifikánsnak.



26. Ábra: Az alkalmazott oszteoklaszt differenciálási protokoll összefoglalása.

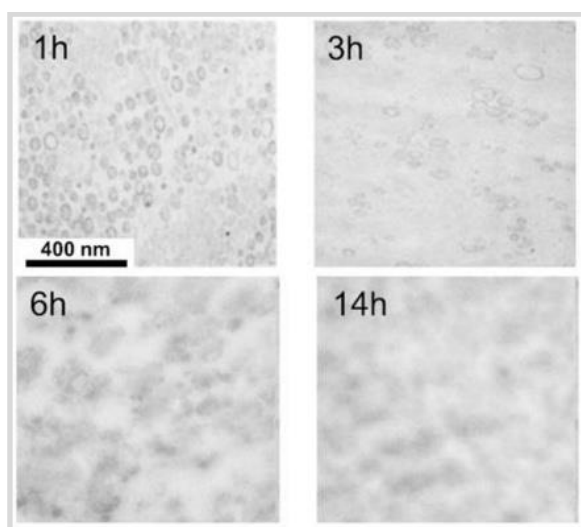
A vérvétel napját számoltuk az 1. napnak, mely időpontban extracelluláris vezikulákat és monocitákat izoláltunk. Az EV preparátumok egy részét elektronmikroszkópia, western blot, áramlási citometria, dinamikus fényszórásméréssel vagy „rezisztív pulzus érzékelő eljárás” segítségével elemeztük. A monocitákat 24 óra 50 ng/ml M-CSF előstimuláció után kezeltük meg 50-50 ng/ml RANKL-dal és M-CSF -el egyaránt, valamint a vér és az U.937 sejtvonal-eredetű EV mintákat, illetve az egyéb kontroll kezeléseket (szolubilis immunkomplexek, albumin, EV felülűszök, PBS) is ekkor kapták meg a sejtek. 3 nap múlva tápot cseréltünk, majd a 8. napon a sejteket fixáltuk, festettük, és megszámloltuk, vagy RNS-t izoláltunk génexpressziós mérésekhez.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Extracelluláris vezikula izolálási és tárolási protokoll beállítása, a preparátumok jellemzői.

5.1.1. A centrifugálás optimális időtartamának meghatározása

Az EV izolálási protokoll beállításához humán vérminták mellett patkány vért is alkalmaztunk. A patkány vér-eredetű exoszómákat különféle hosszúságú ultracentrifugálási idővel (1, 3, 6, 14 óra) szeparáltuk, hogy leteszteljük, mely centrifugálási idővel sikerül legnagyobb mennyiségben, legtisztább minőségben elkülöníteni a vezikulákat. A TEM felvételeken exoszómáknak megfeleltethető strukturálisan intakt, vezikuláris képletek csak az 1 és 3 óra centrifugálási idő után figyelhetők meg. **(27. Ábra)** 6 és 14 óra centrifugálás után is látható néhány vezikula, de a fotó legnagyobb részén amorf törmelék ábrázolódik. **(27. Ábra)**



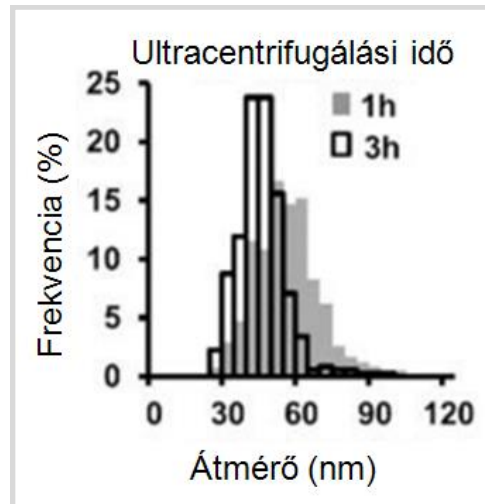
27. Ábra: A különböző ultracentrifugálási időtartamok hatása az exoszóma preparátumok tisztaságára: TEM felvételek.

Patkány vérből 100 000 g-n különféle hosszúságú centrifugálási idővel szeparált preparátumok TEM képei. 1 óra után főképp kerek, hólyagszerű struktúrák ábrázolódtak a felvételen. 3 óra után csökken a vezikulák száma, kissé torzul a képletek alakja. 6 és 14 óra ultracentrifugálás után csak foltos jellegű üledék figyelhető meg a fotókon.

Forrás: Baranyai T et al. (2015) Plos One [257] alapján.

A DLS analízis alapján az 1 óráig centrifugált mintákban találhatók leginkább az exoszómális mérettartományba (az átmérő módusza= 98,49 nm; n=3) eső képletek. 3,

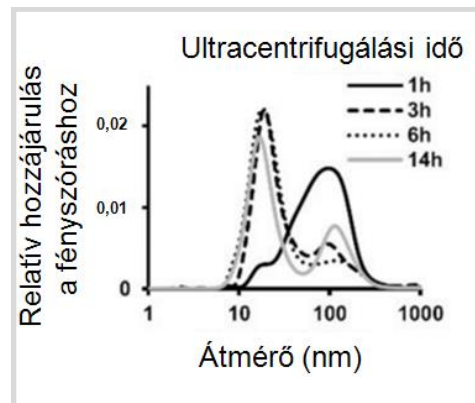
6 és 14 óra után a preparátumban jelenlévő struktúrák kisebb mérettartományba (az átmérők módusza= 18,5 nm; n=3-5) tartoznak, mind az elektronmikroszkópos, mint a fényszóráson alapuló mérések szerint. (28., 29. Ábra)



28. Ábra: 1 és 3 órás ultracentrifugálási időtartamok hatása a szeparált képletek méretére.

Patkány plazma-eredetű EXO-k TEM felvételek alapján kalkulált méret szerinti eloszlása (1h UC: n = 2 440; 3h UC: n = 353).

Forrás: Baranyai T et al. (2015) Plos One [257] alapján



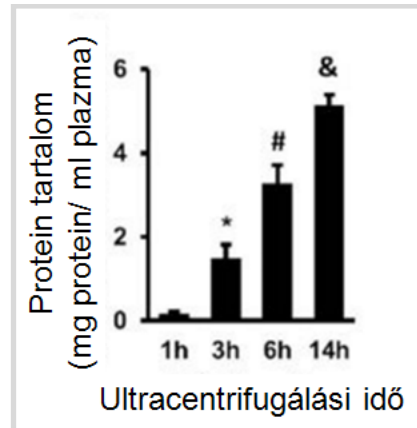
29. Ábra: 1, 3, 6, 14 órás ultracentrifugálási időtartamok hatása a szeparált vezikulák méretére.

Különbféle centrifugálási idővel előállított partikulumok átmérő szerinti eloszlása DLS analízis alapján.

Forrás: Baranyai T et al. (2015) Plos One [257] alapján

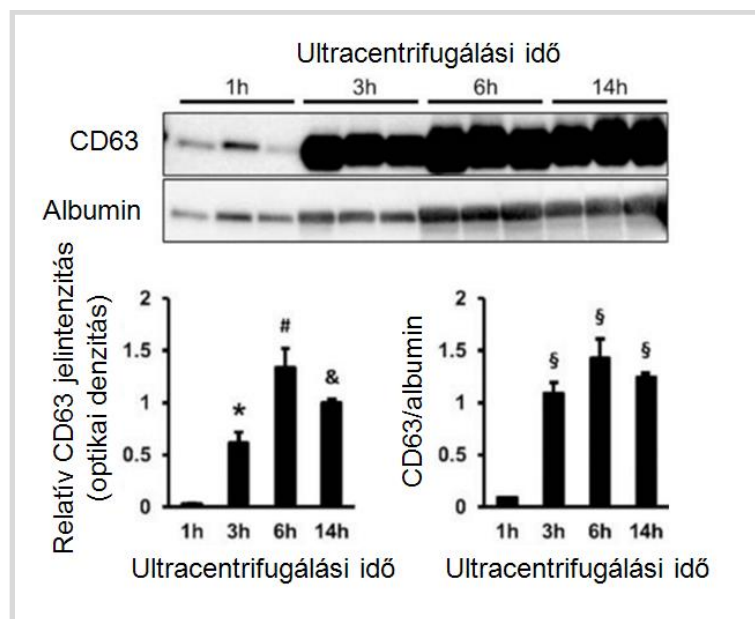
Az 1 órás centrifugálási és a hosszabb menetidejű protokollok között szignifikáns az izolált vezikuláris képletek átmérőjének különbsége ($p < 0,05$). (27-29. Ábra) [257]

A humán vérből izolált EXO minták protein tartalma a centrifugálási idővel együtt növekedett. (30. Ábra)



30. Ábra: Különböző hosszúságú ultracentrifugálási időtartamok hatása az EXO preparátumok protein koncentrációjára.

1, 3, 6, 14 órás UC futamidővel szeparált EXO homogenizátumok fehérje koncentrációja. Az 1 h mintákhoz képest mind a három hosszabban centrifugált csoportban szignifikánsan több proteint tartalmazott a pellet. (n = 3–7; *, #, &: p<0.05).
Forrás: Baranyai T et al. (2015) Plos One [257] alapján



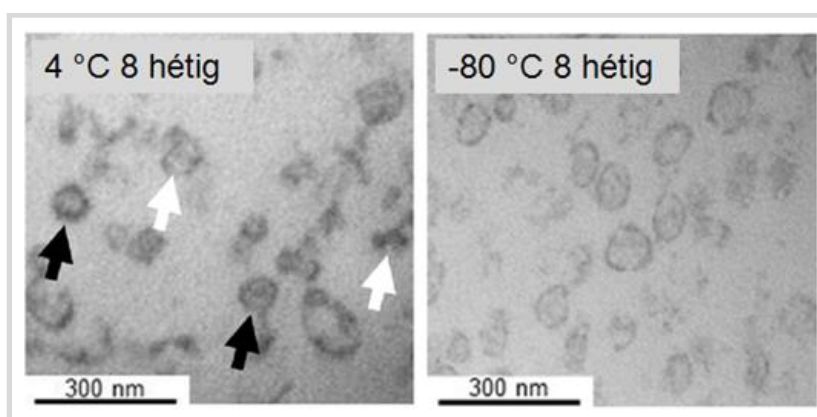
31. Ábra: Különböző hosszúságú ultracentrifugálási időtartamok hatása a preparátumok albumin és exoszóma marker CD63 fehérje tartalmára.

Különböző centrifugálási idővel (1, 3, 6, 14 óra) előállított humán EXO minták CD63 és albumin tartalma western blot mérések alapján. Az 1 óráig ülepített mintákhoz képest a 3, 6 és 14 órán keresztül centrifugált minták szignifikánsan több CD63 molekulát tartalmaztak, és a CD63/albumin arányuk is magasabb volt. (n = 3; *, #, &, \$: p<0.05)
Forrás: Baranyai T et al. (2015) Plos One [257] alapján

Western blot mérések eredménye alapján hosszabb ultracentrifugálási periódus hatására nagyobb mennyiségben volt jelen az exoszómákra jellemző CD63 tetraspanin molekula a preparátumokban, illetve a CD63/albumin arány magasabb volt. **(31. Ábra)**

5.1.2. A tárolási hőmérséklet hatása a preparátumok eltarthatóságára

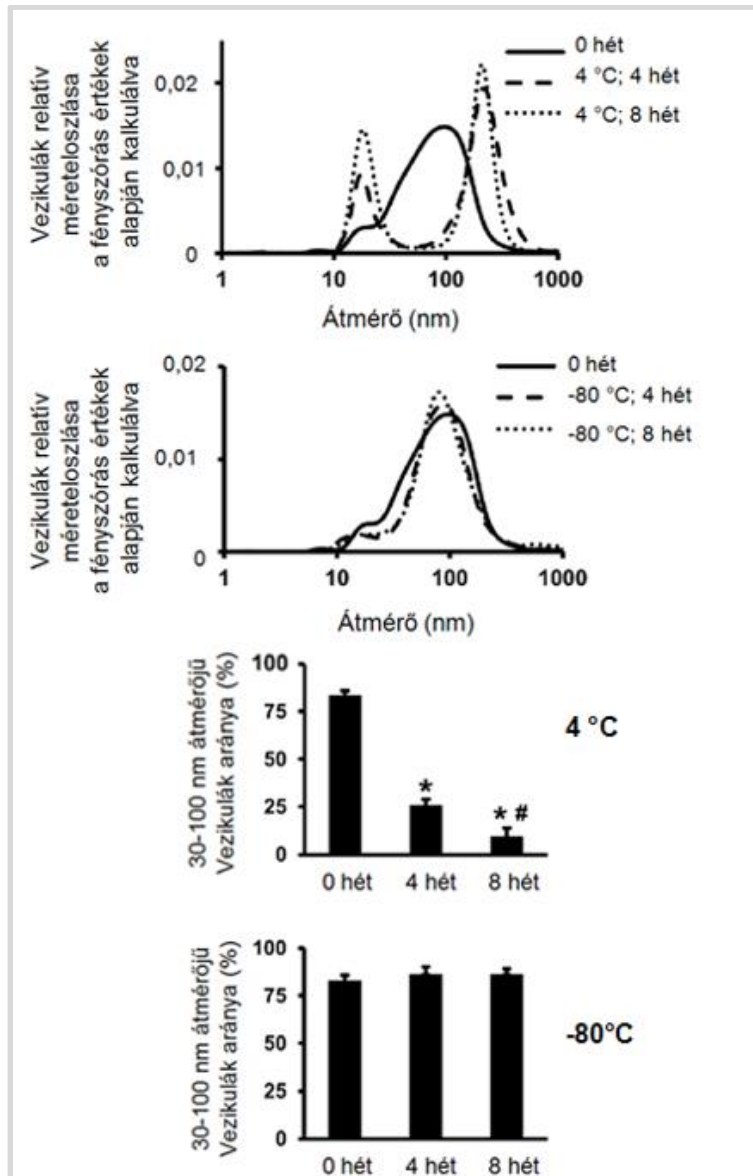
Az extracelluláris vezikulák biológiai hatásának vizsgálatához elengedhetetlen, hogy megfelelő mennyiségben és minőségben legyenek jelen a vezikulák az előállított preparátumban a kezelés időpontjában. Több időigényes kísérleti felállás során is előfordul, hogy nem frissen izolált vezikula mintát tudunk a sejtkeszletekhez felhasználni. Ezekben az esetekben alapvető fontosságú, hogy hogyan tároljuk el az EV preparátumokat. Eredményeink alapján az extracelluláris vezikula minták $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő hűtése során az EV-k könnyebben degradálódnak, kevesebb szabályos vezikuláris képlet figyelhető meg, mint a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -n tárolt preparátumokban. **(32. Ábra)**



32. Ábra: A tárolási hőmérséklet hatása a vezikulák morfológiájára. 8 héten keresztül $+4$ vagy $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -n tárolt EXO preparátumok TEM képe. A fekete nyilak a megkímélt vezikuláris képleteket, a fehér nyilak az EXO-k károsodása során kialakuló törmeléket jelölik.

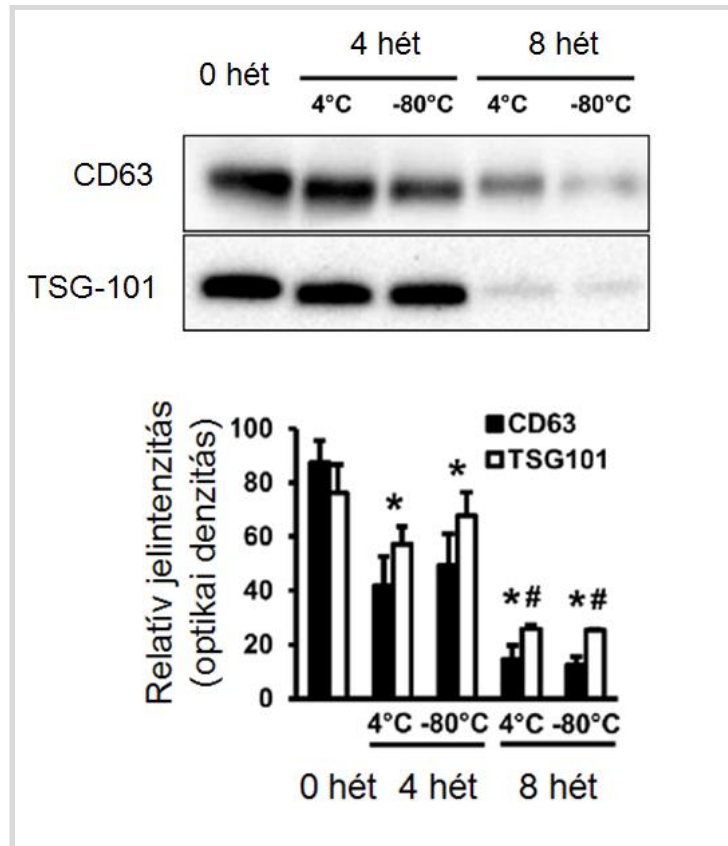
Forrás: Baranyai T et al. (2015) Plos One [257] alapján

Az alacsony hőmérsékleten ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) fagyasztott exoszóma preparátumok átlagos átmérője nem változott jelentősen 4 és 8 hét tárolás után, míg a $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -n tartott mintákban 4 és 8 hét után is szignifikánsan kevesebb képlet esett a tipikusan exoszómális mérettartományba. **(33. Ábra)**



33. Ábra: A tárolási idő hatása a vezikuláris képletek átmérőjére. EXO-k DLS módszerrel megállapított méret szerinti eloszlása különféle tárolási periódusok (4 és 8 hét) után (n=3). Az oszlopok az exoszómákra jellemző átmérőjű (30-150 nm) képletek arányát reprezentálják. 0, 4 és 8 hét tárolás után, +4 és -80 °C-on. +4 °C-on 4 és 8 hét után is szignifikánsan alacsonyabb az exoszómális mérettartományba eső képletek száma friss mintákhoz viszonyítva (*p <0,05, *#p <0,01). A -80 °C-n történő tárolás nem változtatta meg jelentősen a vezikulák méreteloszlását.
Forrás: Baranyai T et al. (2015) Plos One [257] alapján

Az exoszóma preparátumok pozitív EXO marker tartalma 4 hét hűtve (+4 és -80 °C) tárolás után a kiindulási mennyiség kb. 60-80 %-ra, 8 hét után kb. 25-40%-ra csökken. (34. Ábra)



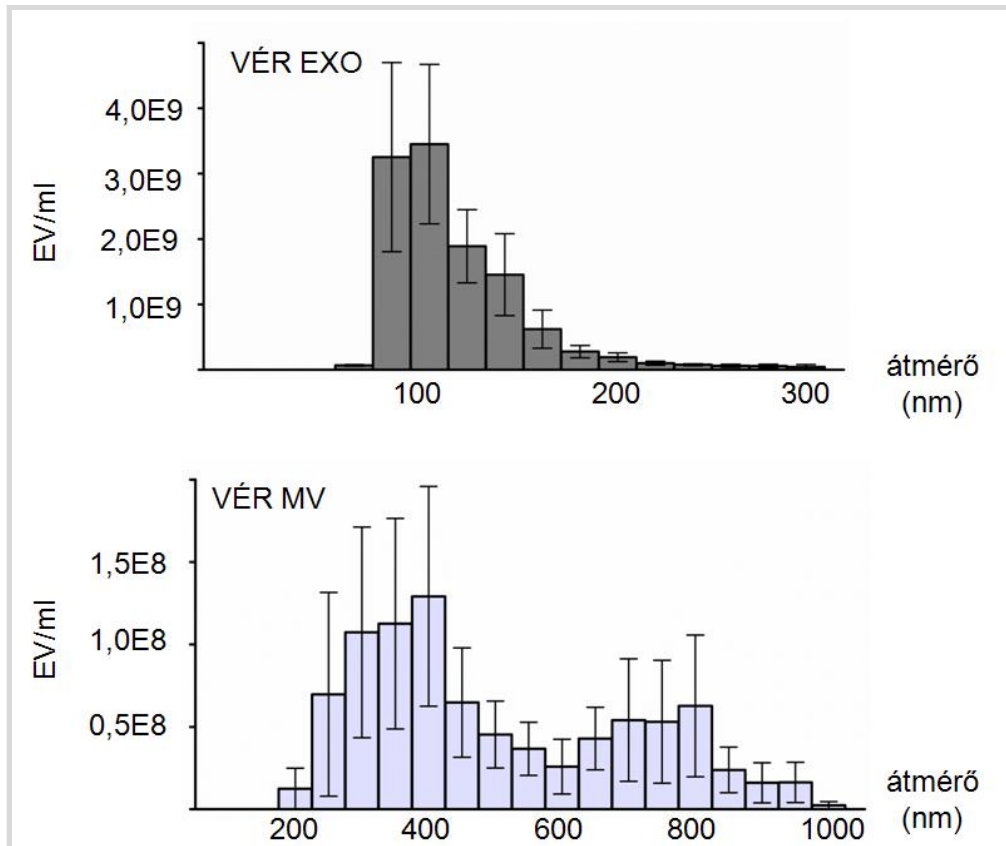
34. Ábra: A tárolási idő hatása az EXO marker expresszióra.

Humán EXO preparátumok CD63, TSG-101 expressziójának mértéke különféle tárolási paraméterek hatására. 4 hét után kis mértékben (kb. -20-40 %), 8 hét után jelentősebben (kb. -60-75 %) csökken a pozitív EXO marker tartalma a mintáknak (n=3). * p < 0.05, *# p < 0,01

Forrás: Baranyai T et al. (2015) Plos One [257] alapján

5.1.3. Sejtkezelésekhez használt EV preparátumok paraméterei

Az oszteoklaszt differenciáltatáshoz használt vezikula preparátumok paramétereit több eljárással is vizsgáltuk. A „rezisztív pulzus érzékelő” technikával mért eredmények alapján a mikrovezikulák nagy része 250-800 nm átmérőjű volt, az exoszómák átlagos átmérője 100 nm körül mozgott. A populációk között az átfedés 5% alatt maradt minden esetben, mely információ alapján sikerült a megfelelő mérettartományba eső képleteket szeparálnunk. (35. Ábra)

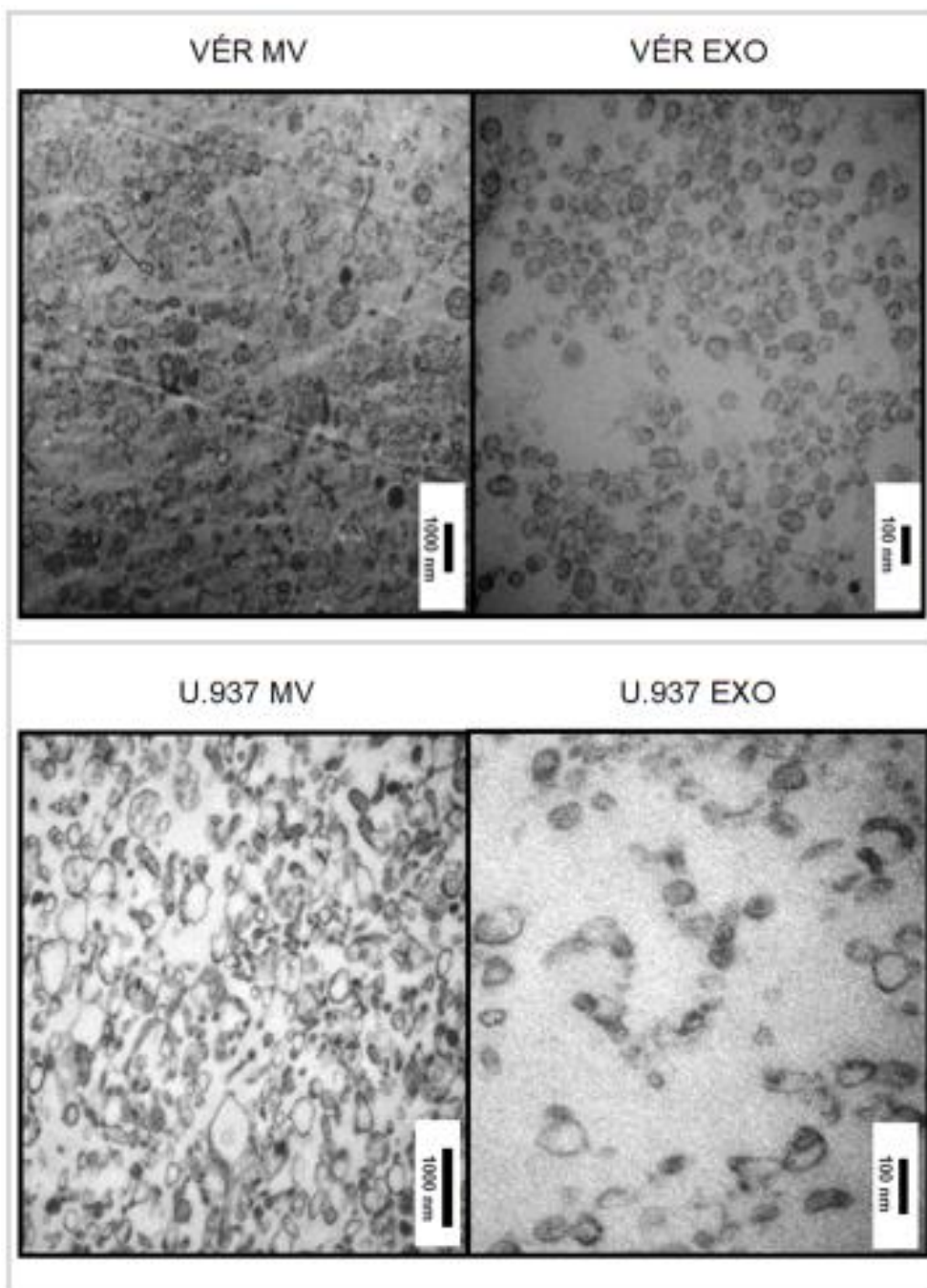


35. Ábra: A sejtkeléshez használt preparátumok jellemzői: a vezikulák méreteloszlása.

Az exoszómák (vér $n=8$) és a mikrovezikulák (vér $n=8$) átlagos átmérője 60-220 nm és 200-1000 nm tartományba esett. Az oszlopok $\text{átlag} \pm \text{SEM} -t$ jelölnék.

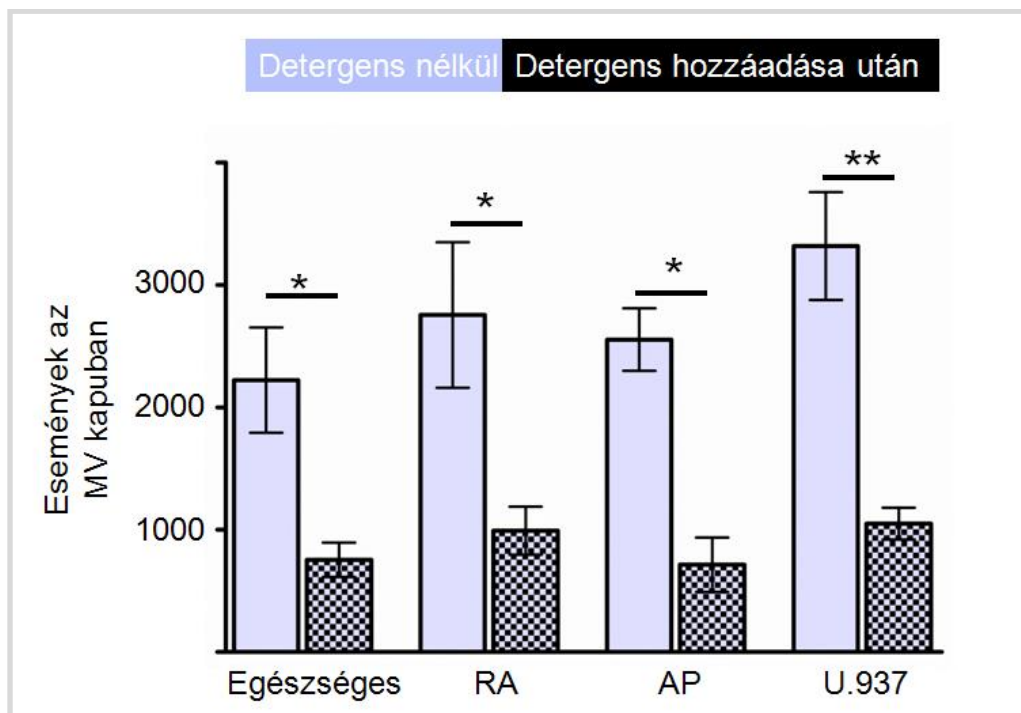
Forrás: Marton N et al. (2017) Cell Mol Life Sci [253] alapján

Az EV mintákról TEM felvételeket készítettünk. Preparátumainkat jelentős mértékben nem kontaminálták apoptotikus testek. **(36. Ábra)** Mindegyik mintában előfordultak a várt EV populációra jellemző vezikuláris képletek. **(37. Ábra)**



36. Ábra: A sejtkezeléshez használt EV minták jellemzői: TEM fotók.
Forrás: Marton N et al. (2017) Cell Mol Life Sci [253] alapján

A mikrovezikulák jelenlétét a preparátumainkban áramlási citometriás mérés során alkalmazott differenciál detergens lízissel is igazoltuk. **(37. Ábra)**

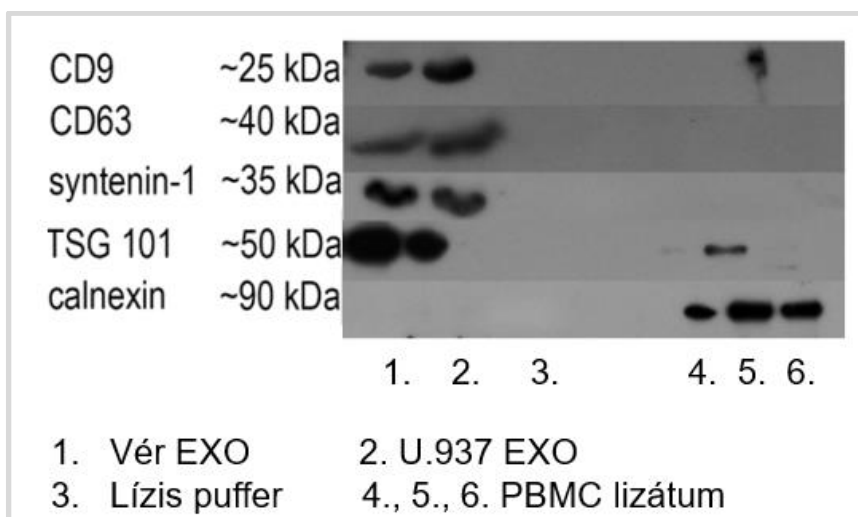


37. Ábra: A sejtkezeléshez használt preparátumok jellemzői: a minták mikrovezikula tartalmának igazolása áramlási citometriával.

Egészséges (n=6), RA (n=7), AP (n=5) vér-, valamint U.937-eredetű (n=5) MV preparátumok áramlási citometriás analízise. A mintákat Annexin V- FITC fluoreszcens antitesttel jelöltük. Mérés után 30 s-ig 0,1% Triton-X 100 kezelést alkalmaztunk, majd megismételtük a mérést. Detergens hozzáadása után szignifikánsan kevesebb eseményt regisztráltunk mindegyik vizsgált csoportban. Az oszlopok átlag±SEM-et jelölnek, *p<0.05, **p<0.01. A detergens előtt mínusz detergens után mért eseményszám különbsége mutatja az MV számot.

Forrás: Marton N et al. (2017) Cell Mol Life Sci [253] alapján

Az „ISEV ajánlása” értelmében az EXO-k jelenlétét több együttes marker detekciójával kell bizonyítani. Pozitív EXO markereknek kell jelen lenni a mintában, míg a negatív EXO markerek nem, vagy csak nagyon kis mennyiségben fordulhatnak elő.[121] **(11. Táblázat)** Kétféle tetraspanint (CD9, CD63) és két citoszólikus (syntenin-1, TSG-101) pozitív EXO markert vizsgáltunk western blot eljárással. Az endoplazmatikus retikulum-eredetű calnexin fehérje csak a kontrollként használt sejtizátumokban volt jelentős mennyiségben kimutatható. **(38. Ábra)**



38. Ábra: A sejtkeléshez használt EV preparátumok jellemzői: EXO markerek jelenlétének kimutatása.

Pozitív és negatív EXO markerek detektálása western blot technikával. A fehérjemintákat exoszóma preparátumokból izoláltuk, kontrollként lízis puffert és PBMC lizátumot alkalmaztunk.

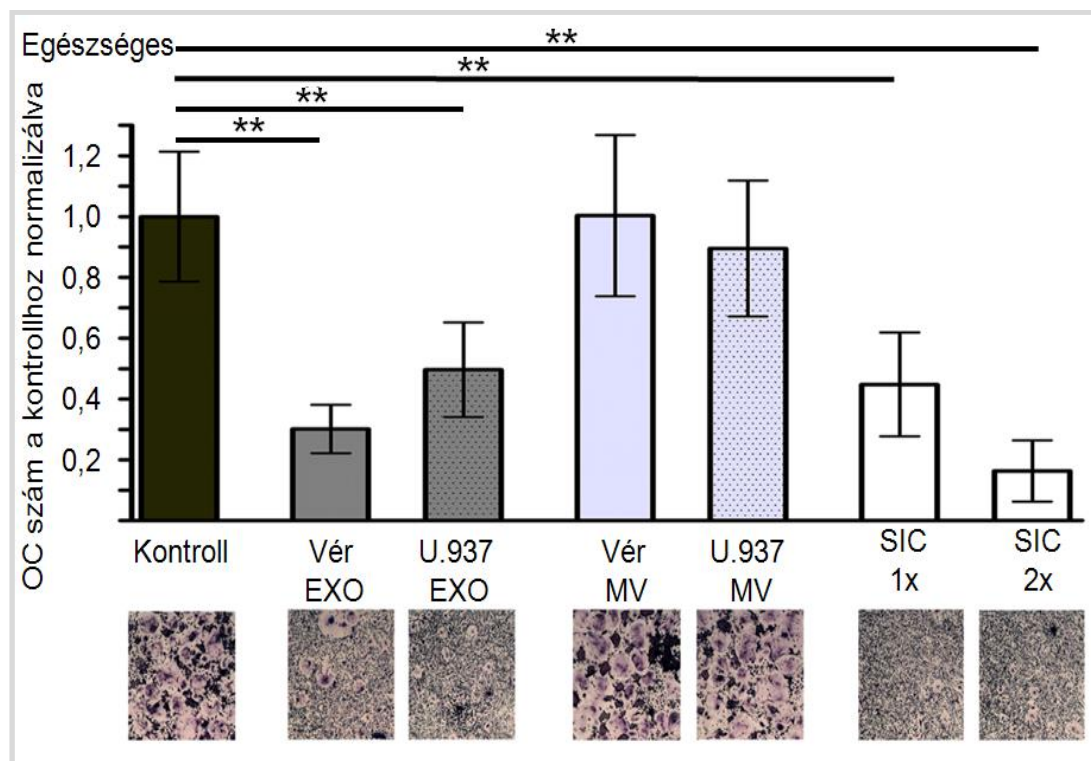
Forrás: Marton N et al. (2017) Cell Mol Life Sci [253] alapján

A minták endotoxin tartalmát *limulusz amöbocita lizátum módszer* alkalmazásával (n=3) vizsgáltuk. Preparátumaink csak nyomokban tartalmaztak lipopoliszaccharid szennyeződést (átlagosan 0,0008 EU/μg), ami nem befolyásolta az EV minták biológiai hatását.

5.2. A plazma eredetű exoszómák és mikrovezikulák hatásának vizsgálata a humán *in vitro* oszteoklaszogenezisre egészséges egyének mintáin.

Egészséges egyének véréből izolált monocitákból differenciáltattunk oszteoklasztokat. A párhuzamos mintákat ugyanazon egyének vér-eredetű EV preparátumaival kezeltük, melyek mellett többféle kontrollt is alkalmaztunk, hogy kizárjuk a kontamináló, illetve a kísérleti eljárás módjából adódó esetleges műtermékeket a vezikulák valódi biológiai hatásától. Az U.937 sejtvonalat azért választottuk kísérleteinkhez, mivel a differenciáltatás kiindulási sejtjeihez, a monocitákhoz hasonló fenotípussal rendelkezik. Emellett a sejtvonal-eredetű EV-k alkalmazása felkínálja azt a lehetőséget, hogy monokultúra-eredetű vezikulákat tesztelhessünk, valamint a felülszóban nincs jelen kontamináló immunkomplex, plazma- és lipoprotein. A teljes vérből izolált extracelluláris vezikula minták a felülszóból elkülönített preparátumokkal szemben komplexebb összetételűek, nagyobb

a szennyeződés lehetősége, illetve változatosabb a partikulák eredete, molekuláris összetétele is. Az immunkomplexek kontrollként alkalmazása a kontamináló protein- és antitestaggregátumok kizárása céljából történt. **(39. Ábra)** [253] McLellan és munkatársai leírták, hogy az rSPA-ból és humán IgG-ből álló immunkomplexek negatív oszteoklasztogenetikus hatással bírnak. Az alkalmazott SIC-ek koncentrációját az említett irodalmi adat, illetve saját mérések alapján állítottuk be. **(44. Ábra)**



39. Ábra: Az egészséges kontrollok vérmintáiból izolált extracelluláris vezikulák hatása az oszteoklasztogenezisre.

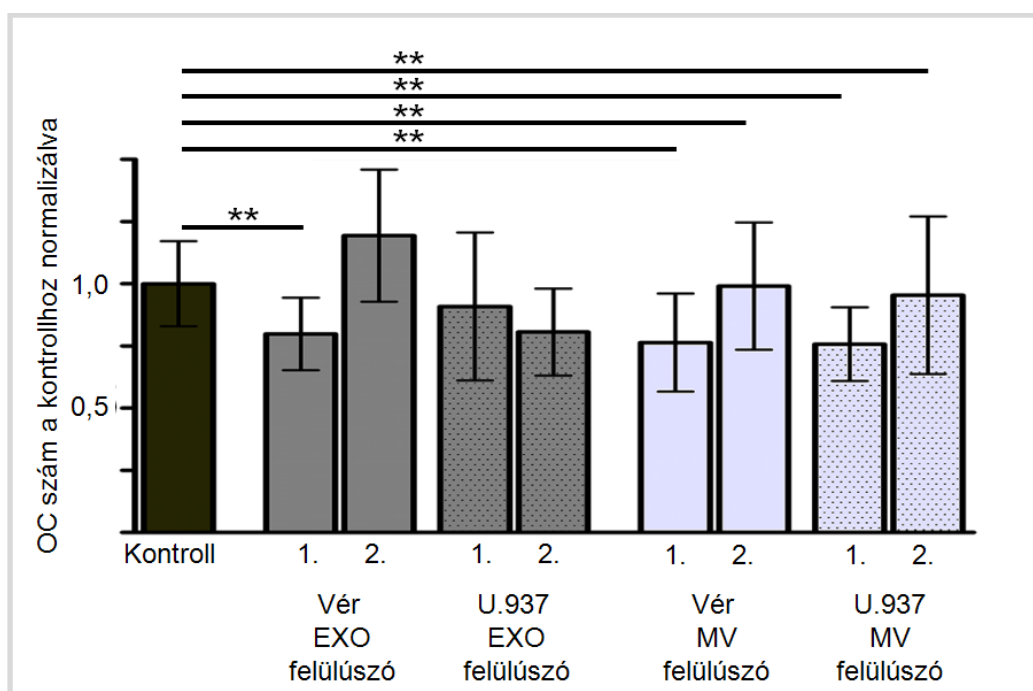
Egészséges egyének (n=11) vérmintáiból izolált CD14+ sejtekből differenciáltattunk oszteoklasztokat M-CSF és RANKL segítségével. A sejteket vér vagy U.937 felülúszóból izolált MV és EXO preparátumokkal, illetve két különböző koncentrációjú SIC-el kezeltük. A monocitákat és az EV-et ugyanazon egyének mintáiból szeparáltuk. A kontroll minták a citokinek mellett csak a kezelésekkel egyező térfogatú PBS-t kaptak. A protokoll 8. napján a sejteket fixáltuk és TRAP kittel festettük, majd a legalább 3 magvú TRAP+ sejteket tekintettük érett oszteoklasztnak. A vér- és a sejt felülúszó-eredetű EXO-k valamint a SIC-ek szignifikánsan csökkentették az érett csontfaló sejtek számát. Az oszteoklasztok számát a kontroll mintákéhoz normalizáltuk. Az oszlopok átlag±SEM-et jelölnek, **p < 0,01. OC= oszteoklaszt

Forrás: Marton N et al. (2017) Cell Mol Life Sci [253] alapján

Sem a vér-, sem a sejtvonal-eredetű MV minták nem befolyásolták szignifikánsan a multinukleált, TRAP+ sejtek számát. Ugyanakkor a vér- és az U.937-

eredetű EXO preparátumok, valamint az immunkomplexek is gátló hatást gyakoroltak az *in vitro* oszteoklasztogenezisre (** $p < 0,01$). **(39. Ábra)**

Az EV izolálási protokoll során félretettünk néhány mikrolitert az MV és EXO preparátumok felülúszóiból. Az MV felülúszók (mind a két centrifugálási lépés után) és az első ultracentrifugálás után nyert EXO felülúszó is szignifikánsan csökkentette az érett csontfaló sejtek számát (** $p < 0,01$). **(40. Ábra)** Az extracelluláris vezikula szeparálás során alkalmazott többlépcsős centrifugálás eredményeképp a különböző lépések végén nem 100%-os a vezikulák kiülepítése. Ennek oka, a már korábban említett stratégiánk, hogy próbáltunk olyan protokollt használni, amely során minél kevesebb kontamináló ágens ülepszik a vezikulákkal. [257] A vezikula-felülúszókkal nyert eredmény azt a megfigyelést támasztja alá, hogy az exoszómáknak és nem a mikrovezikuláknak van szignifikáns hatása az oszteoklasztogenezisre. **(40. Ábra)**

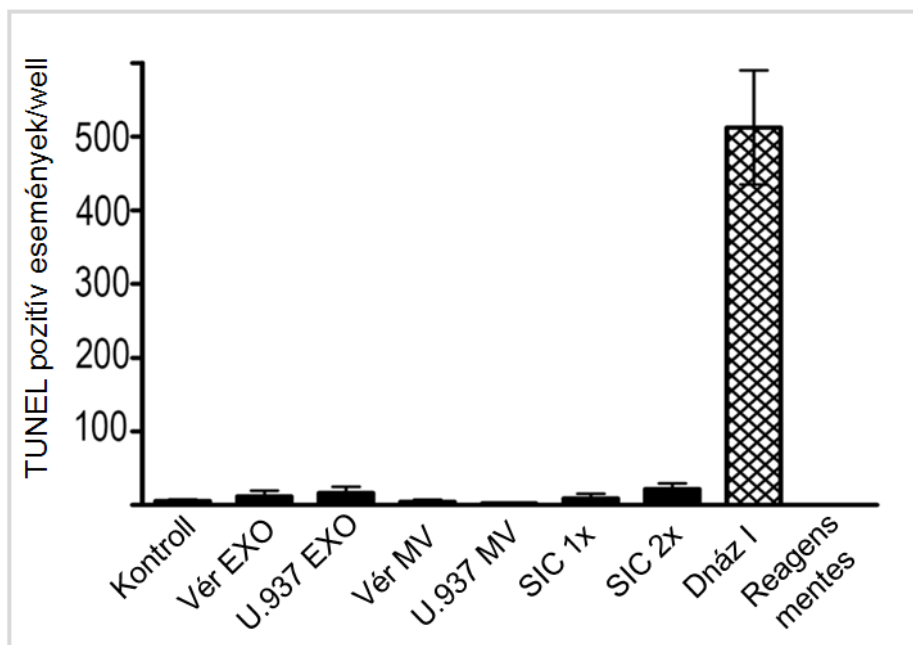


40. Ábra: Az EV preparátumok felülúszóinak hatása az *in vitro* oszteoklasztogenezisre.

Az EV felülúszó kezelések hatása az *in vitro* oszteoklasztogenezisre. Az 1. és 2. 20000 és 100000 g centrifugálások végén tettük félre a felülúszókat. EXO-k jelen lehetnek az MV felülúszókban és az első 100000 g centrifugálás után nyert felülúszóban is. Az EXO tartalmú felülúszó mintáknak is gátló hatása van a csontfaló sejtek differenciálódására (n=10). Az oszlopok átlag±SEM-et jelölnek, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Forrás: Marton N et al. (2017) Cell Mol Life Sci [253] alapján

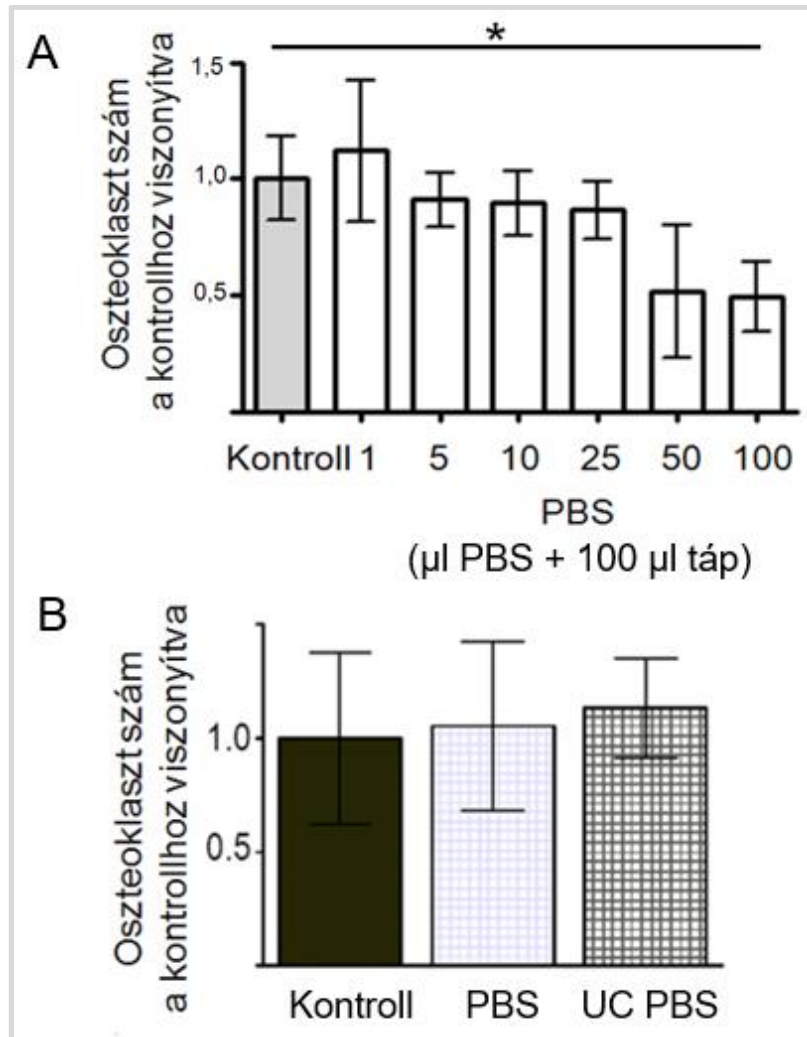
Az alkalmazott kezelések hatására nem növekedett jelentősen az apoptotizált sejtek száma, tehát az EXO és SIC preparátumok megfigyelt gátló hatása nem lehet kizárólag a viabilitás csökkenésének következménye. **(41. Ábra)** Ezt támasztja alá az az adat is, hogy az EV minták nem tartalmaztak jelentős mennyiségű endotoxint.



41. Ábra: Az EV és SIC preparátumok proapoptotikus hatásának vizsgálata. Az alkalmazott kezelések nem befolyásolják a sejtek viabilitását a TUNEL módszerrel mérve (n=2).

Forrás: Marton N et al. (2017) Cell Mol Life Sci [253] alapján

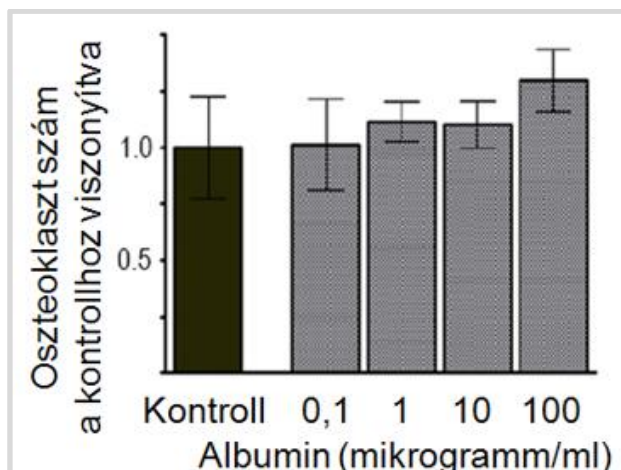
Mivel az EV preparátumok PBS-ben voltak felvéve, a szűrt és az ultracentrifugált 1* PBS hatásait is vizsgáltuk az oszteoklaszt differenciálódásra. Egyik PBS kezelés sem módosította lényegesen az érett sejtek számát. **(42. Ábra)** A hozzáadott PBS mennyiség után mért sejtszám alapján kizárhatjuk, hogy önmagában a táp felhígítása, a citokinek kihígulása lenne felelős ezért a jelenségért. **(42. Ábra)** A vezikulákat mindig a lehető legkisebb térfogatú steril PBS-ben szuszpendáltuk fel és aliquotolva fagyasztottuk.



42. Ábra: Különböző térfogatú steril PBS kezelések hatása az *in vitro* oszteoklasztogenezisre.

A, 100 mikroliter α -MEM táphoz különféle mennyiségben adagoltunk steril 0,2 μ m pórusnagyságú szűrőn filtrált PBS-t ($n=3$). A tápfolyadék kétszeresére történő hígításának (100 μ l tápfolyadék +100 μ l PBS) hatására volt szignifikáns a változás az érett oszteoklasztok számában. Ez alapján EV preparátumainkat mindig kevesebb, mint 50 μ l PBS-ben szuszpendáltuk fel a sejtkezelésekhez. **B**, Az ultracentrifugált PBS sem ($n=3$) módosította szignifikánsan az *in vitro* oszteoklaszt képződést. Az oszlopok átlag $\pm$ SEM-et jelölnek. Az oszlopok átlag $\pm$ SEM-et jelölnek, * $p < 0,05$.

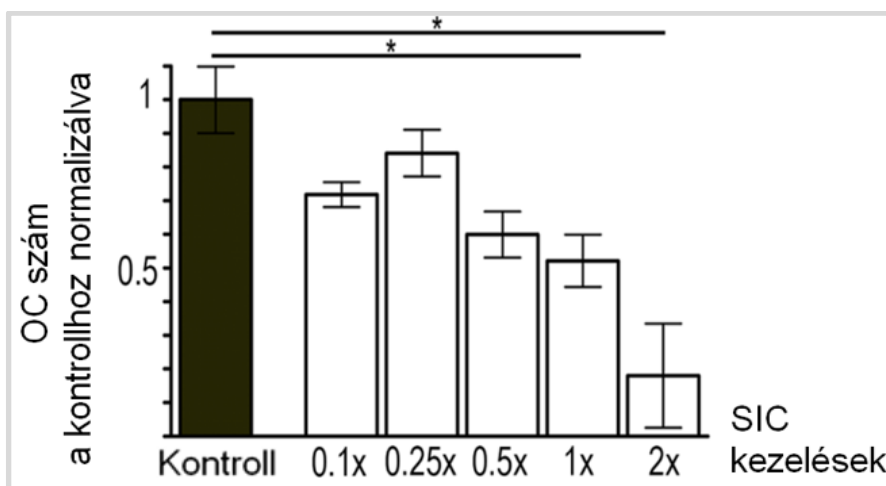
Emellett humán szérum albumint is adtunk a differenciálódó sejtek felülszójához, eredményeink alapján ennek a kezelésnek sem volt szignifikáns hatása az oszteoklasztogenezisre. (**43. Ábra**)



43. Ábra: Az albumin hatása az *in vitro* oszteoklasztogenezisre.

Sem a különböző koncentrációban adagolt humán szérum albumin (n=3) nem befolyásolta jelentősen az *in vitro* oszteoklasztogenezist. Az oszlopok átlag±SEM-et jelölnek.

A kontrollként használt SIC preparátumok koncentrációját McLellan és mtsai. cikke alapján választottuk. [132] Mindkét alkalmazott SIC mennyiség („1x”, „2x”), a már korábban publikált módon, szignifikánsan gátolta az oszteoklasztogenezist, míg kisebb koncentrációknál ez a hatás nem volt ilyen kifejezett. [132] **(44. Ábra)**



44. Ábra: A szolubilis immunkomplexek koncentrációfüggő hatása az oszteoklaszt differenciálódásra.

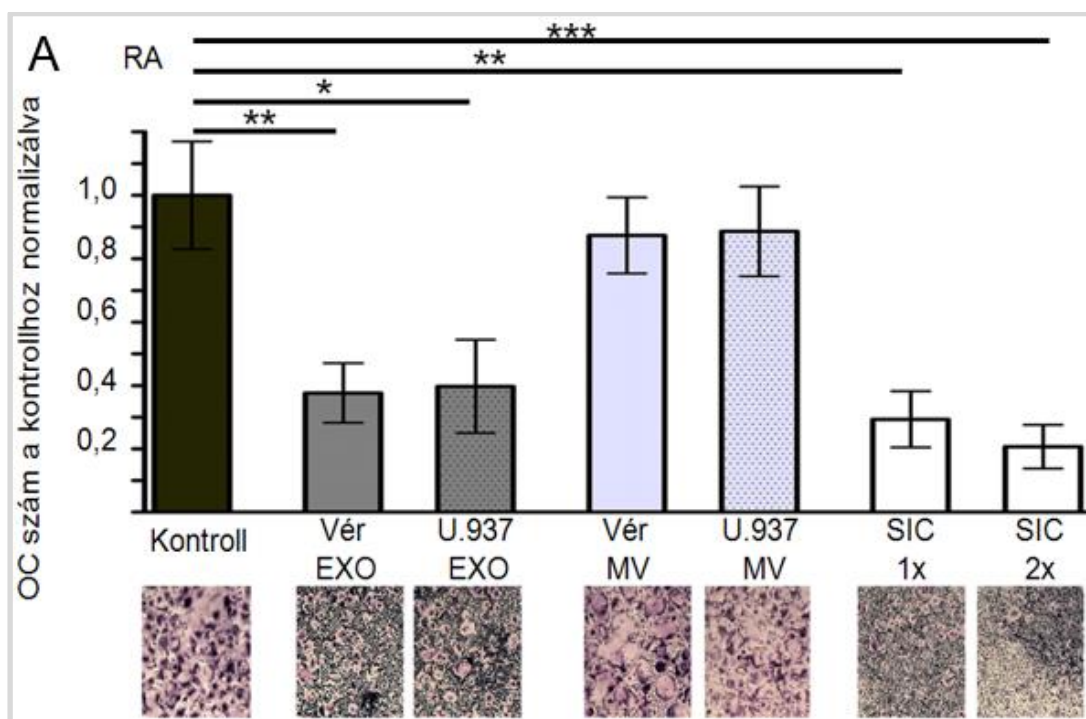
A szolubilis immunkomplexeket mindig frissen készítettük a kísérletekhez. „0,25x, 0,5x, 1x és 2x” mennyiségek 0,25, 0,5, 1 és 2 µl SIC minta/100 µl α-MEM tápoldatot jelölnek. Az 1x és 2x mennyiségű SIC kezelés hatására a kontroll mintákhoz képest szignifikánsan kevesebb érett oszteoklaszt differenciálódott (n=3). A kisebb koncentrációjú SIC kezeléseknek nem volt ilyen markáns hatása az oszteoklasztogenezisre. Az oszlopok átlag±SEM-et reprezentálnak, * p<0,05.

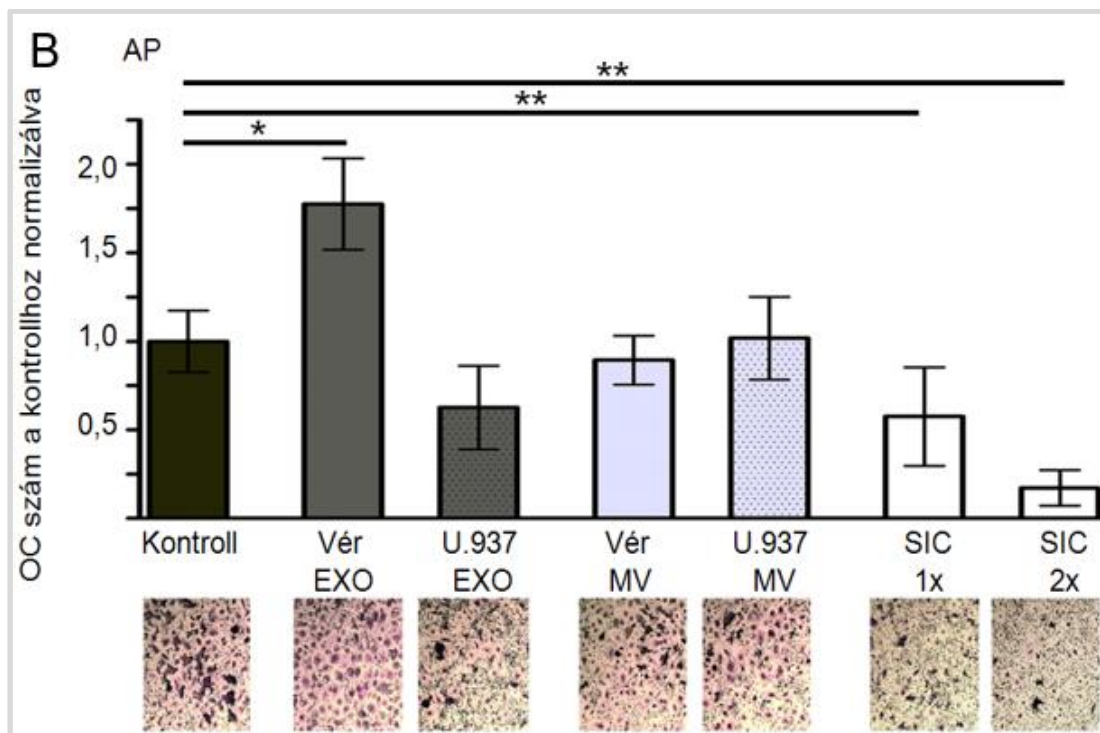
Forrás: Marton N et al. (2017) Cell Mol Life Sci [253] alapján

5.3. Reumatoid artritisben és perifériás típusú artritisz pszoriaticában szenvedő donorok vérében jelenlévő exoszómák és mikrovezikulák hatása a csontfaló sejtek *in vitro* differenciálódására.

Az EV-k oszteoklasztogenezisre gyakorolt hatását aktív ízületi gyulladással rendelkező (10. Táblázat) RA-s és AP-s egyének mintáin is lemértük. (45. Ábra) Az „azonos donor” kísérleti felállásban, -amikor ugyanazon egyének donálták a sejteket és a vezikulákat- az RA betegek esetében az egészséges egyénekéhez hasonló eredményt kaptunk. Mindkét EXO és SIC kezelés csökkentette az érett csontfaló sejtek számát (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). (45. A, Ábra)

Az AP minták esetében ugyanakkor a vérből izolált EXO preparátumok stimuláló hatással rendelkeztek az oszteoklasztogenezisre (* $p < 0,05$; ~175%). Az U.937-eredetű EXO kezelés hatására tendenciózusan kevesebb érett sejtet számláltunk. Az immunkomplexek ebben a csoportban is inhibitoros hatást mutattak (** $p < 0,01$). (45. B Ábra) Az MV preparátumok egyik betegcsoportban sem módosították szignifikánsan az oszteoklasztok számát. (45. A, B Ábra)





45. Ábra: Reumatoid artritiszes (A) és artritisz pszoriaticus (B) vérmintákból izolált EV-k eltérően hatnak az *in vitro* oszteoklasztogenezisre.

A, RA-ban szenvedő egyének (n=12) azonos személytől származó vér-eredetű EXO preparátumai és U.937 felülszóból izolált EXO-k egyaránt szignifikánsan csökkentették az érett csontfaló sejtek számát a mintákban. Sem a vérből, sem a sejtvonal felülszóból szeparált MV minták nem gyakoroltak szignifikáns hatást az *in vitro* oszteoklasztogenezisre. Az immunkomplexeknek mindkét koncentrációban szignifikánsan inhibitoros hatása volt. **B,** Perifériás típusú artritisz pszoriaticában szenvedő páciensek (n=10) „azonos donor” mintáin a vérből izolált exoszómák szignifikánsan stimulálták az oszteoklasztogenezist. Az U.937-eredetű EXO preparátumoknak tendenciózusan gátló hatása volt a csontfaló sejtek képződésére. Az MV preparátumok nem fejtettek ki jelentős hatást a kezelt mintákra. SIC hozzáadása után a preparátumok szignifikánsan kevesebb TRAP+ multinukleált sejtet tartalmaztak. Az oszteoklasztokat mindegyik mérés során humán CD14+ sejtekből differenciáltattuk, a kontroll minták a többi kezelés térfogatával megegyező PBS-t kaptak. A különböző minták oszteoklaszt számát a kontrollhoz normalizáltuk. Az oszlopok átlag±SEM-et reprezentálnak. * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Forrás: Marton N et al. (2017) Cell Mol Life Sci [253] alapján

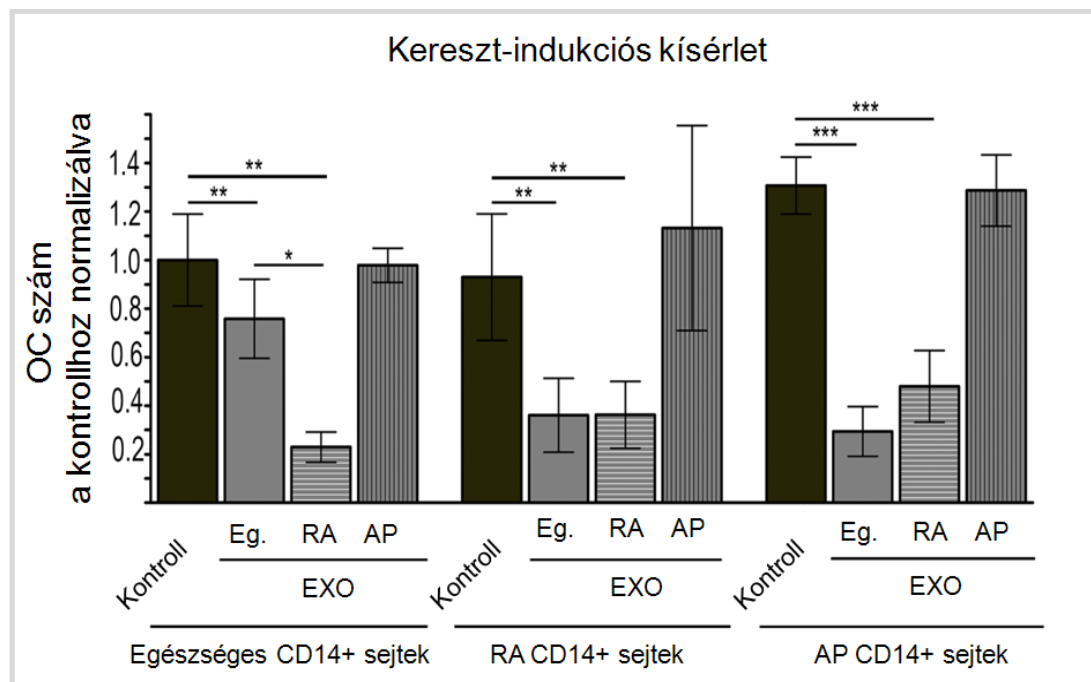
Mivel a kétféle EV kezelés közül az EXO preparátumok esetében mértünk hatást, ezért az EXO kezelések után regisztrált oszteoklaszt értékek (vér EXO kezelt oszteoklaszt szám/ kontroll oszteoklaszt szám) és a 3 donorcsoport paramétereinek esetleges korrelációját is megvizsgáltuk. Sem az életkor, sem a betegségaktivitás vagy betegség tartam, autoantitestek mennyisége és a gyulladásos paraméterek sem mutattak összefüggést az EXO-k oszteoklasztogenezist befolyásoló hatásával. **(12. Táblázat)**

12. Táblázat: Az azonos donortól származó EXO kezelések hatására bekövetkezett sejtszám változás korrelációja a donor különféle paramétereivel.

Pearsons korreláció alapján sem a donorok életkora, sem a betegség aktivitása (DAS), tartama, autoantitestek mennyisége (ACPA, RF), sem a gyulladásos paraméterek (CRP, We) nem változtak az EXO kezelés hatására regisztrált érett csontfaló sejtek számával. ACPA= ciklikus citrullinált peptid ellenes antitest, CRP= C-reaktív protein, DAS= betegségaktivitási pontszám, R= korrelációs együttható, p= szignifikancia, We= süllyedés

		Betegség -tartam	CRP	We	ACPA	RF	DAS	Élet- kor
RA	R érték	0,0272	-0,300	-0,560	-0,290	-0,404	-0,251	-0,072
	p érték	0,930	0,370	0,070	0,416	0,210	0,430	0,822
AP	R érték	0,104	0,960	-0,740	NA	0,723	0,324	0,538
	p érték	0,76	0,23	0,92	NA	0,167	0,530	0,087

Az előzőekben vázolt kísérletek mind azonos donortól származó EV és CD14+ mintákkal történtek. Emellett alkalmaztunk a csoportok között „kereszt-indukciós” kezeléseket is, amelyek során a különböző egyénektől származó sejteket más betegek vagy egészséges kontrollok vezikuláival kezeltük és mind a három donorcsoport egyaránt kapott mintát mindegyik csoporttól. Ebben a felállásban azt figyeltük meg, hogy az egészséges- és az RA- eredetű EXO-k szignifikánsan gátolták az oszteoklasztogenezist mindhárom csoportban, így az AP CD14+ sejtes minták esetében is (* p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). Ugyanakkor az AP vér-eredetű EXO preparátumok nem rendelkeztek inhibitoros oszteoklasztogenetikus hatással egyik vizsgált csoportban sem. Hasonló mennyiségű érett sejt differenciálódott az egészséges és az RA kezletlen minták esetében, az AP donoroktól származó monocitákból kicsivel több csontfalósejt fejlődött (*p<0,05). Az egészséges-eredetű monociták oszteoklaszt irányba történő fejlődését az RA EXO-k kifejezettebben gátolták, mint az egészséges EXO-k (*p<0,05) eltérő donorok esetében. (46. Ábra)



46. Ábra: Az egészséges és az RA –eredetű exoszómák gátolják a csontfaló sejtek képződését, de az AP exoszómáknak nincs oszteoklaszt differenciálódást gátló hatása.

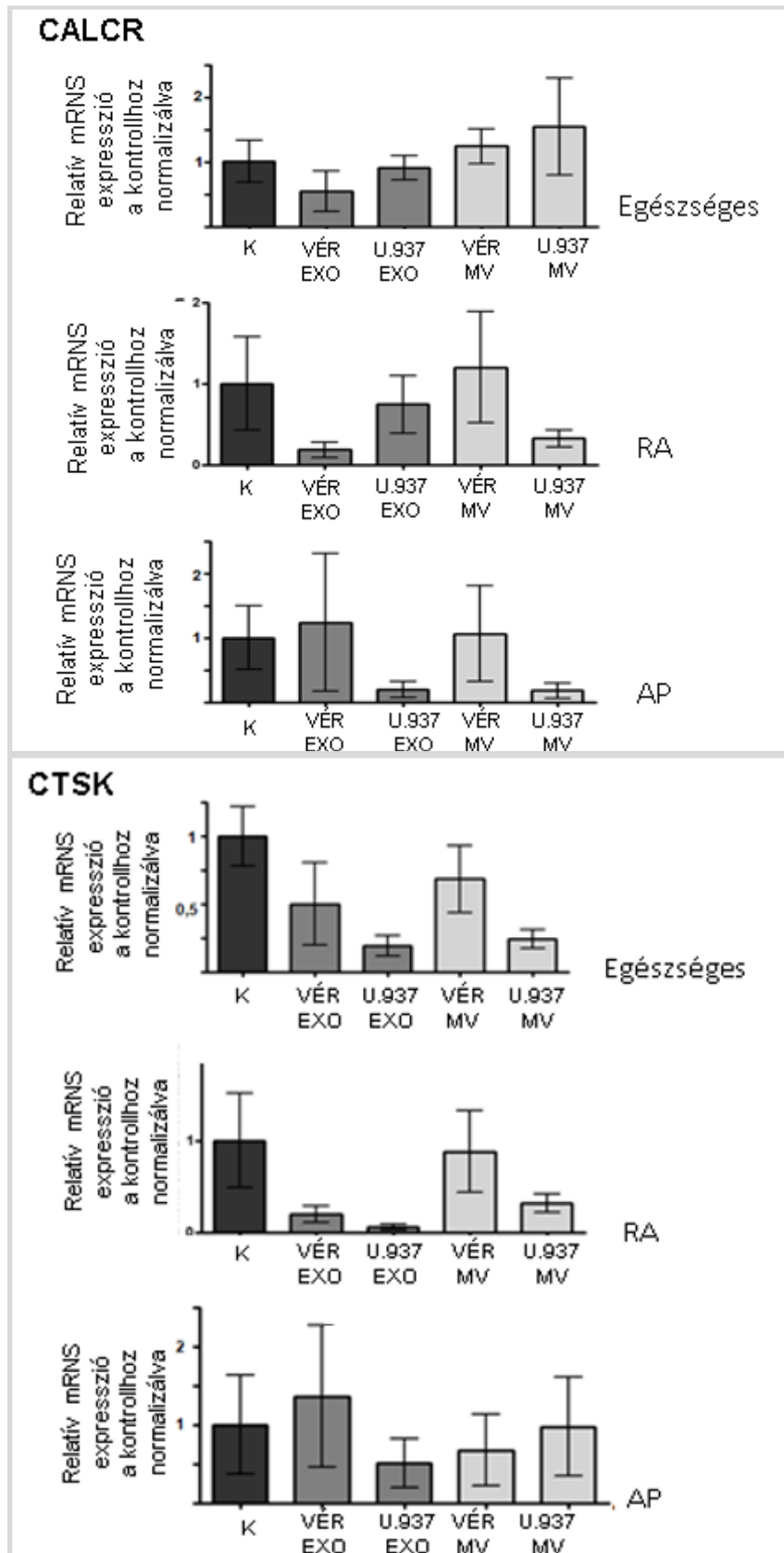
Az egészséges, az RA és az AP vérekből izolált EXO-kat eltérő egyének sejtjeinek kezelésére használtuk fel. A „kereszt-indukció” során a három csoport között cserélgettük az EXO kezeléseket, tehát az egészséges, RA és AP CD14+ sejtek kaptak mind egészséges, RA és AP –eredetű EXO kezelést is (egészséges sejt+ egészséges EXO n=11, egészséges sejt+ RA EXO n=9, egészséges sejt+ AP EXO n=7, RA sejt+ egészséges EXO n=8, RA sejt+ RA EXO n=10, RA sejt+ AP EXO n=8, AP sejt+ egészséges EXO n=9, AP sejt+ RA EXO n=8, AP sejt+ AP EXO n=16). A kontroll minták felülúszójához csak PBS-t adtunk. A protokoll végén a sejteket fixáltuk és festettük, majd megszámoltuk. A relatív oszteoklaszt számot az egészséges kezeletlen kontroll mintákhoz normalizáltuk. Az egészséges és az RA kontroll csoportban hasonló mennyiségű érett csontfaló sejtet számláltunk, ehhez képest a kezeletlen AP mintákban több oszteoklaszt volt (* $p < 0,05$ *nincs jelölve az ábrán*). Az egészséges- és RA-eredetű EXO kezelések mindhárom csoportban szignifikánsan csökkentették a csontfaló sejtek differenciálódását, míg az AP donoroktól származó EXO minták nem rendelkeztek ilyen hatással. Az oszlopok átlag $\pm$ SEM-et reprezentálnak, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Eg. =egészséges

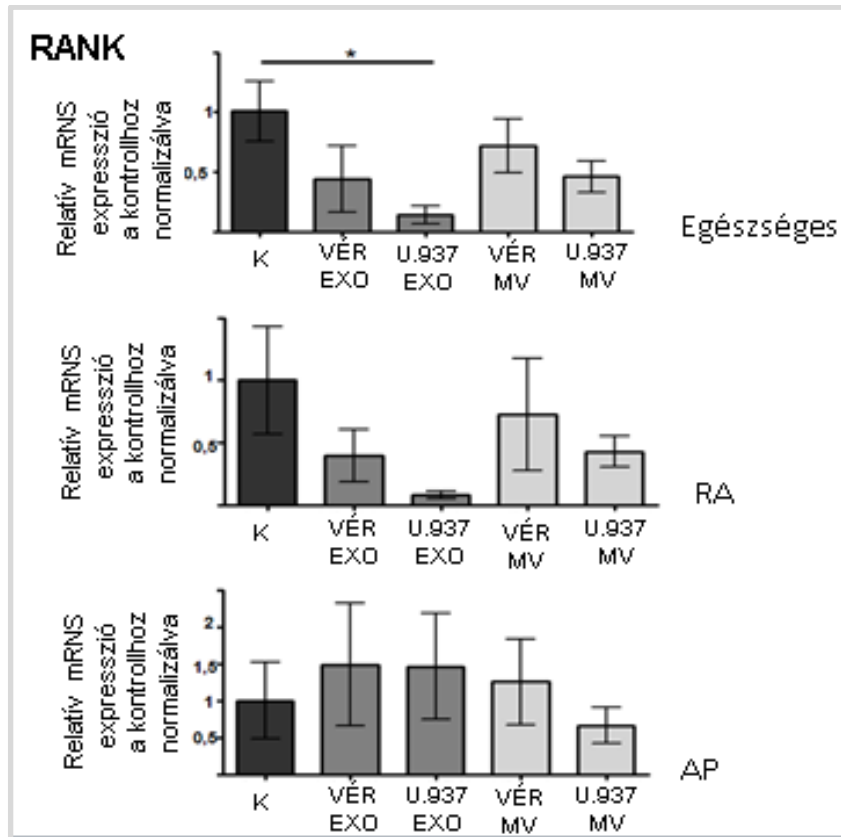
Forrás: Marton N et al. (2017) Cell Mol Life Sci [253] alapján

5.4. Az extracelluláris vezikulák *in vitro* oszteoklasztogenezisre gyakorolt hatásmechanizmusának feltérképezése.

Az alkalmazott kezelések oszteoklasztogenezist befolyásoló hatásának lehetséges mechanizmusát génexpresszió analízissel vizsgáltuk. A kísérleti felállás a

differentiáltság során alkalmazott protokollal egyezett meg, a vezikulákat és a sejteket azonos személyek donálták.





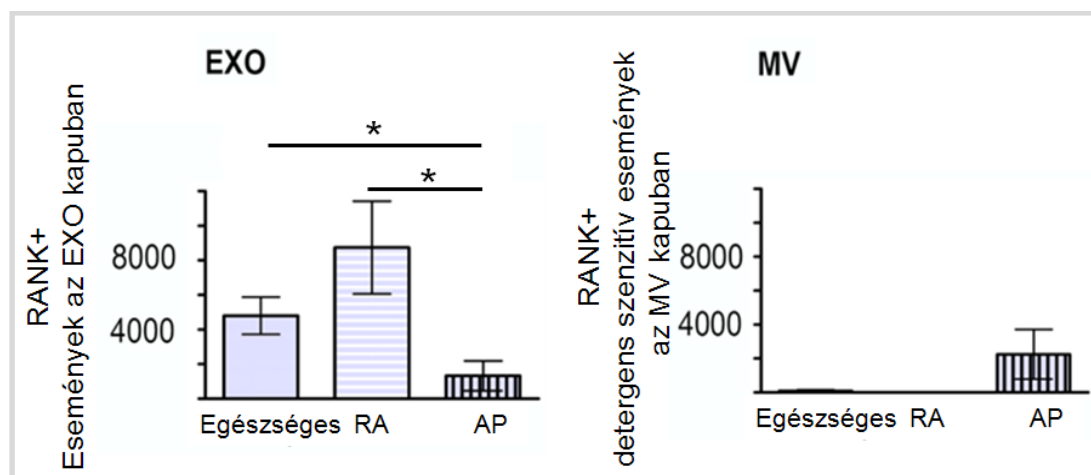
47. Ábra: Vér-, illetve sejtvonal-eredetű EV-k hatása a génexpresszióra oszteoklaszt differenciálódás során.

Az oszteoklasztokat a TRAP festésnél már felvázolt protokoll szerint differenciáltattuk, majd a 8. napon fixálás helyett lizáltuk az egészséges (n=6), RA (n=6) és AP (n=6) mintákat, RNS-t izoláltunk belőlük, majd cDNS-sé átírva RT qPCR analízist végeztünk. Az oszteoklasztokban fontos funkciót ellátó gének kifejeződését vizsgáltunk. Az mRNS expressziót a GAPDH, mint kontroll gén kifejeződéséhez normalizáltuk. A CALCR, CTSK és RANK mRNS szintje csökkent EXO kezelés hatására egészséges és RA mintákban, míg az AP mintákban ez a mintázat nem volt megfigyelhető. Az MV kezelések esetében sem regisztráltunk hasonló tendenciát. Az oszlopok átlag±SEM-et reprezentálnak. * p<0,05.

Forrás: Marton N et al. (2017) Cell Mol Life Sci [253] alapján

Az egészséges és az RA mintákban hasonló tendenciózus mintázatot figyeltünk meg: a vizsgált 10 gén közül közül 3 esetben detektáltunk kismértékű mRNS szint változást. A CALCR, CTSK és RANK expressziója mérséklődött EXO kezelés hatására egészséges és RA mintáknál, míg az AP preparátumok esetében nem volt ilyen tendencia megfigyelhető. **(47. Ábra)** A további vizsgált oszteoklasztokra-jellemző gének (C-FMS, C-FOS, DC-STAMP, OSCAR, SLAP-1, SLAP-2, TRAP) kifejeződésében nem mutatkozott sem tendenciózus, sem szignifikáns változás egyik csoportban sem.

Összehasonlítottuk a három donorcsoport vezikuláris RANK tartalmát. Az AP-eredetű EXO-k szignifikánsan kevesebb RANK-ot expresszáltak, mint az egészséges és RA vérből szeparált EXO-k. Az MV minták csekély mennyiséget hordoztak a vizsgált molekulából. (48. Ábra)

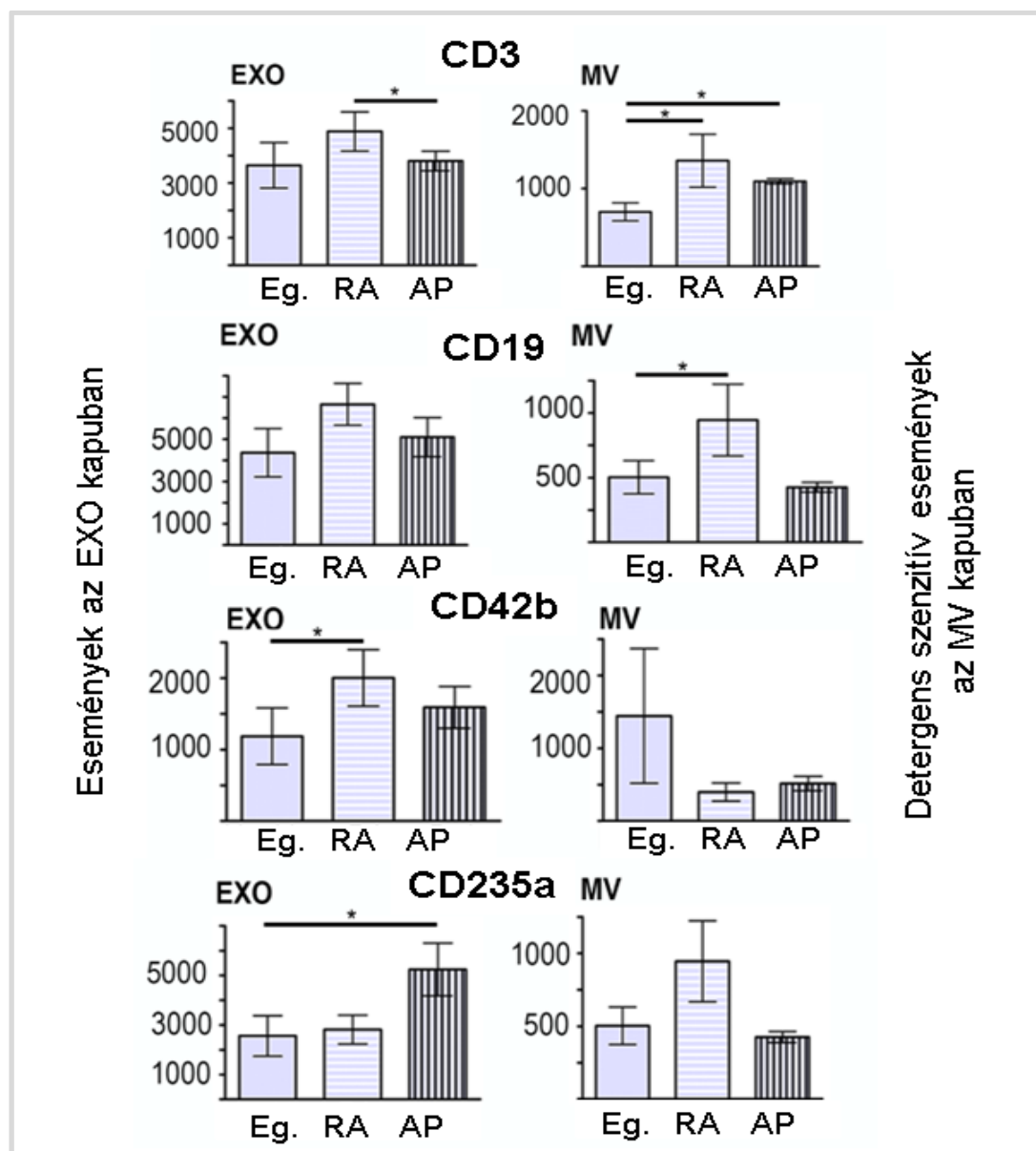


48. Ábra: Az EV minták RANK expressziója.

Az áramlási citometriás eredmények alapján az MV-k nem tartalmaztak jelentős mennyiségű RANK-ot. Az egészséges (n=4) és RA (n=3) EXO preparátumokkal összevetve az AP (n=3) EXO-k kevesebb membránkött RANK molekulát hordoznak. Az oszlopok átlag±SEM-et reprezentálnak. Az eseményszám minden mérés esetében 100000 eseményre van kalkulálva, egyszerre csak egyféle fluoreszcens antitesttel voltak jelölve a minták. * p<0,05.

Forrás: Marton N et al. (2017) Cell Mol Life Sci [253] alapján

Az EV-k donorsejt-eredetű markereket -pl. CD molekulákat- hordoznak. A vérben jelentős mennyiségben előforduló sejttypusokra: vörösvértestekre (CD235a), vérlemezkékre (CD42b), T-sejtekre (CD3), B limfocitákra (CD19), jellemző transzmembrán receptorok előfordulását mértünk áramlási citometriával az EV mintákon és szignifikáns eltéréseket regisztráltunk a három csoport CD antigén expressziójában. A legtöbb vörösvértest markert az AP EXO-k hordozták (*p <0,05). Az RA EXO-k nagyobb része származott vérlemezkéktől, mint az egészséges mintáké (*p <0,05). Az artritiszes EV-k közül több volt a T-limfocita eredetű (*p <0,05). RA-ban nagyobb arányban fordultak elő B-sejtek által kibocsátott MV-k (* p<0,05). (49. Ábra)



49. Ábra: Donorsejt-eredetű CD markerek vizsgálata MV és EXO mintákon. Szignifikáns különbségeket észleltünk a három donorcsoport CD molekula mintázatában. Az oszlopok átlag±SEM-et reprezentálnak (egészséges n=6, RA n=7, AP n=5). Az eseményszám minden mérés esetében 30000 eseményre van normalizálva. *p<0,05; Eg.= egészséges.

Forrás: Marton N et al. (2017) Cell Mol Life Sci [253] alapján

6. MEGBESZÉLÉS

Ph.D. munkám során főképp a vérpályában megtalálható exoszómák és mikrovezikulák humán *in vitro* oszteoklaszt fejlődésre gyakorolt hatásait vizsgáltam egészségesekben és reumatológiai betegekben. A bemutatott eredmények két nagyobb témakörbe sorolhatóak be. Az elsőként taglalt adatok a vérből történő extracelluláris vezikulák szeparálásának módjáról, a preparátumok eltarthatóságáról nyújtanak információt. Ezeket a megfigyeléseket a *PlosOne* folyóiratban közzétettük le, a cikkben társszerző vagyok. A másodikként részletezett kérdéskörben a humán vérből izolált vezikulaminták oszteoklasztogenezist befolyásoló hatását tártuk fel, a vezikulák paramétereit jellemeztük. Ebből a munkából elsőszerzős közleményem született, melyet a *Cellular and Molecular Life Sciences* nevű lapban publikáltuk.

Mint az elmúlt években kiderült, az extracelluláris vezikulák biológiailag aktív szignalszómaként funkcionálhatnak, befolyásolhatják a velük interakcióba lépő sejtek, így az oszteoklasztok vagy előalakjaik fejlődését, működését. Az oszteoklasztok endocitózissal, fúzióval vagy sejtfelszíni molekulák receptor-ligand interakciója révén léphetnek kapcsolatba az extracelluláris vezikulákkal. [14] Néhány kutatócsoport tanulmányozta a csontsejtek extracelluláris vezikulákkal történő kommunikációját, illetve bizonyos tumorsejt-eredetű EV-k csontfalósejtekre gyakorolt hatásait (ld. 2.2.6. Csontsejtek és extracelluláris vezikulák). [219, 220] [227-229] Ezen túlmenően az elmúlt hónapokban közzétett adatok alapján a kísérleteinkhez hasonló protokoll szerint preparált tehéntej-eredetű exoszómák stimulálni képesek a humán *in vitro* oszteoklasztogenezist, de a csontbontást már nem fokozzák szignifikánsan. [258] A csontsejtek jelentős mennyiségű extracelluláris vezikulát vesznek fel a keringésből, ugyanakkor a plazmában jelenlévő EV-k oszteoklasztokra kifejtett hatását korábban még nem írták le. [52] Mindezek miatt érdemesnek tartottuk vizsgálni az érrendszerben jelenlévő vezikulák csontfalósejtekre kifejtett hatását. A lehetséges fiziológias funkciókon kívül a cirkuláló extracelluláris vezikulák esetleges patogenetikus szerepe is foglalkoztatott minket, emiatt az egészségesek mellett két gyulladásos reumatológiai betegcsoportot (reumatoid arthritisz és perifériás típusú arthritisz pszoriatica) is vizsgáltunk.

A vezikulák biológiai hatásainak méréséhez megbízható izolálási protokollokra és kontrollok alkalmazására van szükség (ld. 2.1.5. Az extracelluláris vezikulák

izolálásának, tárolásának és vizsgálatának kihívásai). A plazmában jelenlévő vezikulák szeparálásakor, vizsgálatakor számos faktort figyelembe kell vennünk. Mintavételkor az érleszorítás mértéke, az alkalmazott véralvadást gátló anyag minősége, a feldolgozásig eltelt idő és a tárolási hőmérséklet is jelentősen befolyásolhatja a preparátumok minőségét, ezért a körülmények standardizálása rendkívüli fontossággal bír. [80] Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján az ACD-A antikoagulánst tartalmazó vérvételi csőben a legalacsonyabb a sejtek *ex vivo* vezikula kibocsátása, így ezzel az alvadást gátlóval érhetjük el a vérben *in vivo* jelenlévő mennyiséghez leginkább közelítő vezikulaszámot és minőségi összetételt, ezért végig ezt az anyagot alkalmaztuk az EV szeparálásra gyűjtött minták esetében. [108] Ezenkívül semmilyen a sejtek vezikula kibocsátását bizonyítottan stimuláló anyagot (pl. lipopoliszacharid, ionofor) nem adtunk a vérmintákhoz. [259] A kontrollként használt humán sejtvonal felülszót nem szupplementáltuk állati eredetű savóval, hogy elkerüljük a kontamináló vezikulák izolálását. [253]

Több extracelluláris vezikulák elkülönítésre szolgáló eljárás létezik. Azért választottuk a széles körben alkalmazott „differenciál centrifugálásos, gravitációs filtrációs” technikát a membránkött molekulák alapján történő szelekcióval szemben, mert mind mikrovezikulákat, mind exoszómákat szeretnénk volna ugyanazokból a mintákból preparálni. A mikrovezikulák jelen tudásunk szerint kevésbé jellemezhetőek specifikus markerekkel, mint az exoszómák; illetve az exoszómák izolálásához is több molekula együttes előfordulásán alapuló eljárás eredményezhet nagyobb tisztaságú populációt. [121] Amennyiben kevés (<1 ml) biológiai minta áll rendelkezésre és csak exoszómákat szeretnénk elkülöníteni, abban az esetben kereskedelembe kapható EXO szeparáló kitékkel (pl. *miRCURY*, *ExoQuick*, *Invitrogen Total Exosome Isolation Reagent*) is jó eredményeket lehet elérni friss irodalmi adatok szerint. [260] Mindegyik széles körben alkalmazott EXO szeparációs eljárás végén koncentrálni, pelletálni kell a szubcelluláris képleteket, melyhez centrifugálási lépések szükségesek. A centrifugálás paraméterei jelentős hatással vannak a preparátumok minőségére. [257] A futási idővel csökken a szabályos morfológiájú vezikulák aránya a preparátumban, habár az EXO markerek koncentrációja a mintákban a centrifugálás hosszával együtt növekszik, melyek feltehetőleg károsodott EV struktúrákból származnak. [257] **(31. Ábra)** A biológiai hatás teszteléséhez minél több intakt vezikula kinyerésére, és minél kevesebb

szennyeződésre kell törekednünk a preparálás során. Ennek érdekében -TEM és DLS eredményeink alapján- az 1 órás ultracentrifugálási protokollt alkalmaztuk az *in vitro* sejtkelzéses mérésekhez. [257] Az előbbieken felvázolt többlépcsős EV szeparálási módszerek mind idő- és munkaigényesek, emiatt folyamatosan dolgoznak gyorsabb izolálási, detektálási módszerek kifejlesztésén. Erre példa a *microarray technikán* alapuló exoszóma kimutatás, melynek a későbbiekben a diagnosztikában lehet szerepe (pl. vezikuláris tumor antigén detektálása), illetve *mikrofluidikában* használatos eljárásokkal is kísérleteznek EV szeparációs protokollt beállítani. [261, 262]

Az EV minták lehető leggyorsabb felhasználása lenne a legideálisabb, de nem minden kísérleti felállás teszi lehetővé, hogy frissen preparált vezikulákkal dolgozzunk pl. oszteoklaszt differenciáltatás során az általunk alkalmazott protokoll 5-6. napján **(26. Ábra)** a tápcsere időpontjában a vezikulákat is pótoltuk, „kereszt-indukciós” vagy áramlási citometriás mérésekhez összegyűjtöttünk több donortól származó EV mintát. [253] **(39., 45., 46. Ábra)** A nem megfelelő hőmérséklet hatására a foszfolipid kettősréteg felnyílhat, a fehérjék, nukleinsavak degradálódhatnak, így sem a vezikulák morfológiájáról, sem esetleges hatásaikról nem kapunk valós képet a mérések során. Eredményeink alapján alacsonyabb tárolási hőmérsékleten tovább maradnak intaktak az extracelluláris vezikulák és nagyobb mennyiségben vannak jelen a vezikuláris markerek (pl. CD63, TSG-101). Eszerint $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -n ajánlott tartani a mintákat a felhasználásra kerülésig, melynek időpontja lehetőleg az izolálástól számított 4 héten belül legyen, mivel az EXO marker fehérjék koncentrációja 8 hét tárolás után $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -n is jelentősen csökkent. [257] **(32., 33., 34. Ábra)** Munkacsoportunk az ideális tárolási hőmérséklet és időtartam meghatározására további kísérleteket tervez folyékony nitrogénben tartott mintákkal. Ligeti E. és munkatársai méréseinek alapján is $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on állnak el leghosszabb ideig intaktan a vezikulák, illetve ezen a hőmérsékleten a neutrofil granulocita-eredetű EV-k egy hétig jó eséllyel megőrzik antibakteriális hatásukat; viszont a krioprotektív anyagoknak lítikus hatása lehet a vezikulákra, így azok használata kerülendő. [263] Az ismételt lefagyasztás- felolvasztás is károsítja a preparátumokat, mivel feltárhatja a vezikuláris struktúrákat. Ennek elkerülése érdekében a pelletált, krioprotektáns-mentes pufferben felvett EV minták aliquotolása célszerű.

A vezikulák jelenlétét az általunk előállított preparátumokban párhuzamosan több eljárással igazoltuk. Az elektronmikroszkópia az extracelluláris vezikulák

vizualizására elterjedt módszer, mely információt szolgáltat a partikulák alakjáról, méretéről és az esetleges szennyeződésekről is. [22] **(27., 32., 36. Ábra)** Emellett az elektronmikroszkópiás minta előkészítése során a vezikulák formája változhat, a natív állapotban gömb alakú képletek csészére hasonlító konfigurációt vehetnek fel. TEM felvételek, illetve a DLS és „rezisztív pulzus érzékelő” módszerekkel történő méréseink alapján az izolálni kívánt mérettartományba eső EV-k voltak jelen túlnyomórészt a preparátumainkban. [253] **(28., 36. Ábra)**

A különböző extracelluláris vezikula populációk eltérő mértékben detergens érzékenyek, ezt a jelenséget kihasználva mikrovezikulák jelenlétét differenciál detergens lízis módszerrel igazoltuk. **(37. Ábra)** [80, 253] Az extracelluláris vezikulák rendkívül sokféle molekulát hordozhatnak, melyek közül több kifejezetten exoszómákra jellemző membránköthető receptor fordul elő. Mintáinkban jelen volt több pozitív marker, de a negatív marker nem jellemezte az EXO-kat, tehát az „ISEV kritériumoknak” megfelelő molekulákat tartalmazták a sejtkészítésekhez felhasznált EXO preparátumok. **(38. Ábra, 11. Táblázat)** A vérből előállított EV mintákat ugyanakkor tömegspektrometriás és western blot méréseink alapján albumin kontaminálta, ami viszont nem befolyásolta az oszteoklasztogenezis mértékét. [253] **(31. Ábra)**

A keringésből a csontsejtek környezetébe kerülő extracelluláris vezikulák lehetséges hatását az oszteoklasztok képződésére, funkciójára előttünk még nem publikálta másik munkacsoport. Eredményeink alapján sem a plazmából, sem a sejtvonal felülúszóból szeparált mikrovezikulák nem befolyásolják az oszteoklasztogenezist egy vizsgált csoportban sem. Ezzel szemben a kisebb mérettartományba eső exoszómák szabályozzák az oszteoklaszt prekursorok fejlődését. A sejtvonal, az egészséges és az RA donor-eredetű exoszóma preparátumokkal kezelt mintákban lényegesen kevesebb érett sejt fejlődött a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, viszont az AP vérmintákból izolált exoszómák nem rendelkeztek hasonló gátló hatással. [253] **(45., 46. Ábra)**

A vezikulaminták toxikus hatása ellen szól, hogy az apoptotikus sejtek száma nem gyarapodott jelentős mértékben egyik alkalmazott kezelés hatására sem, emellett az endotoxin-szint rendkívül alacsony volt a mintákban (sejtkészítéshez ajánlott citokinek adatlapján ennél nagyobb érték is megengedett a gyári termékekben lsd.

peprotech.com), illetve az is az EV minták esetleges sejthalált indukáló hatását cáfolja, hogy a mikrovezikula és az AP exoszóma preparátumok nem csökkentették az oszteoklasztok számát. [253] **(41., 45. B Ábra)**

Az a megfigyelés, hogy a sejtvonal-eredetű exoszómák is hatást gyakoroltak az *in vitro* oszteoklasztogenezisre, azt sugallja, hogy nem a „nem-vezikuláris” plazma- vagy lipoproteinek váltották ki a megfigyelt hatást, melynek kizárása rendkívüli fontossággal bír, mivel munkacsoportunk korábbi megfigyelései (Sódar B et al.) és idén publikált irodalmi adatok alapján is a lipoproteinek (20-100 nm) együtt pelletálhatóak az exoszómákkal. [111, 264] **(39., 45. Ábra)** A lipoproteinek esetleges hatásának további elkülönítése érdekében az „azonos donor” kísérleti felállásunkban egészséges egyénektől származó mintákon méretkizárásos oszlop-kromatográfiával tisztított vezikulákkal is folytattunk méréseket és hasonló hatást tapasztaltunk, mint a „differenciál centrifugálással, szűréssel” előállított preparátumok esetében. [253]

Érdekes módon az „azonos donor” mérésekben RA minták esetén hasonló eredményt kaptunk, mint az egészséges-eredetű mintáknál: mind az exoszómák, mind a SIC-ek inhibitoros hatással bírtak a csontfaló sejtek differenciálódására. Ezzel szemben perifériás típusú AP-ben a saját exoszómák ellenkezőleg hatottak, serkentették az oszteoklasztogenezist, viszont a SIC-ek itt is szignifikánsan gátolták az oszteoklasztok képződését, ami alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az exoszómák és az immunkomplexek a csontfaló sejt előalakokban eltérő intracelluláris szignáltanszdukciós útvonalakat befolyásolhatnak **(45. A és B Ábra)**. [253] A „kereszt-indukciós” mérések során is azt figyeltük meg, hogy az egészséges- és RA-eredetű exoszómák gátolják a csontfaló sejtek differenciálódását, itt az AP CD14+ sejtes mintákban az egészséges és RA exoszóma kezelések hatására is csökkent volt az érett csontfaló sejtek száma. Ezzel szemben az AP exoszóma kezelések egyik esetben sem módosították szignifikánsan a multinukleált TRAP+ sejtek számát. **(46. Ábra)** További megfigyelésünk a „kereszt-indukciós” kísérleti felállás során, hogy egészséges és RA monocita minták esetében hasonló számú oszteoklaszt differenciálódott, míg az AP mintákban nagyobb mennyiségben képződtek oszteoklasztok. **(46. Ábra)** Annak a megfigyelésnek, hogy az „azonos” és a „kereszt-indukciós” méréseknél más eredményt kaptunk az AP csoportban, az lehet a magyarázata, hogy a két különböző rendszerben egyszer saját, másszor eltérő egyének véréből származtak az extracelluláris vezikulák. A

„kereszt-indukciós” mérések alapján az AP exoszómák markánsan különböző hatással rendelkeznek az oszteoklasztogenezis tekintetében, mint az egészséges és RA exoszómák. Ez különösen érdekes eredmény, hiszen mindkét kórképre jelentős a fokozott oszteolízis, ami a csontfaló sejtek tevékenysége révén jön létre. Emellett a CD14+ sejtek minőségében is lehetnek különbségek, mivel AP-ben nagyobb mennyiségben képződtek belőlük oszteoklasztok a kezeletlen populációban, illetve a „saját donor” mérésekben exoszóma hatásra. Ezek az adatok azt sejtetik, hogy RA-ban és AP-ben az érpályában jelenlévő extracelluláris vezikulák, az oszteoklaszt előalakok és feltehetőleg a monociták is eltérő fenotípusúak. Ez utóbbit abból következtetjük, hogy munkánk során nem csontvelői, hanem vérsejtekkel dolgoztunk, keringésben megtalálható monocitákat stimuláltunk, amelyek eltérően reagáltak a két betegcsoportban. A közelmúltban publikált megfigyelések alapján AP-ben magasabb a periériás vérben fellelhető oszteoklaszt progenitorok RANK expressziója, míg RA-ban a TNF- α szinttel korrelálva magasabb a keringésben előforduló csontfaló sejt előalakok száma. [265] Ez a jelenség is azt a megfigyelést erősíti, hogy az AP és RA patomechanizmusában számos különbség figyelhető meg. A két kórfolyamatban különböző citokinek eltérő hangsúllyal játszanak szerepet, emellett RA-ban nagy jelentőségűek az autoantitesteknek is. **(7., 9. Táblázat, 50. Ábra)** Ezen molekuláris különbségeknek lehet az a klinikai konzekvenciája, hogy az RA-ban és AP-ben alkalmazott anti-TNF- α biológiai terápiáknak pozitív hatása lehet a radiológiai progresszióra [266], de emellett AP-ben az IL-17A ellenes *secukinumab* monoklonális antitest antiinflammatorikus és csontérintettséget befolyásoló hatásai is kecsegtetőek. [267] AP-ben a litikus léziók kifejezettebb mértékűek lehetnek, mint RA-ban, ezt a tényt is alátámasztaná, hogy a „saját donor” méréseken az exoszómák stimulálták az AP-eredetű oszteoklasztokat, ami elősegítheti a fokozott csontbontást. [251] **(45. B Ábra)**

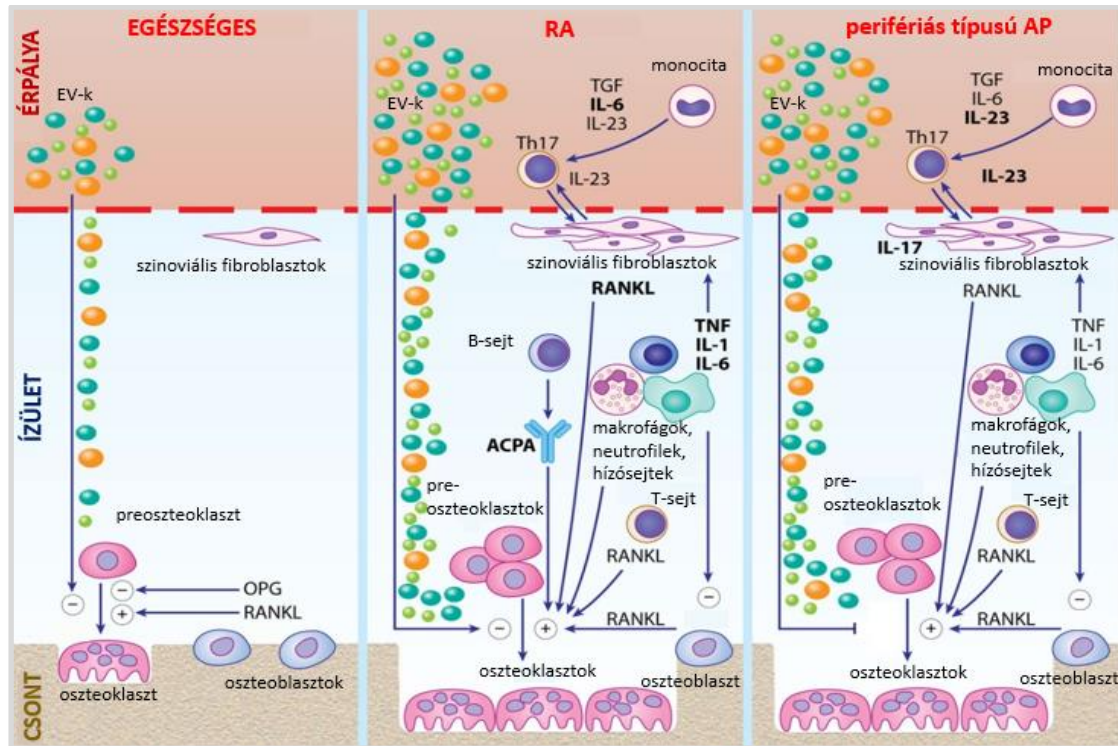
Az egészséges donorok mintáin mért eredmények alapján arra is következtethetünk, hogy a vérben jelenlévő EV-k szabályozzák a csontfaló sejtek aktiválódását, így a csontbontást is. Ennek például csonttörések utáni regeneráció során lehet szerepe, melynek során az érsérülések révén a szokottnál több vezikula áramolhat a csontsejtek közvetlen környezetébe és blokkolhatja az oszteoklasztokat, így terepet

adva az oszteoblasztok regeneratív működésének. Ez a csontgyógyulási mechanizmus is eltérhet a két vizsgált gyulladásos reumatológiai betegségben. [253]

Az EV-k oszteoklasztogenezist módosító hatásának molekuláris hátterét is vizsgáltuk. **(36- 38. Ábra)** Az egészséges és RA mintáknál, ahol a TRAP festett preparátumok alapján kevesebb érett csontfaló sejt differenciálódott, tendenciózusan csökkent volt a CALCR, CTSK és RANK gének expressziója. Ezen megfigyelések magyarázata lehet, hogy több oszteoklasztogenezist befolyásoló szignáltranszdukciós lépésben érintett gén kifejeződésének kismértékű változása összeadódhat, így az összegződött mRNS szint módosulások befolyásolhatják a további differenciálódást. **(47. Ábra)** A vezikulák esetleges csontélettani szempontból fontos RANK, RANKL és OPG molekula tartalmát is vizsgáltuk. [252] A mikrovezikulák, melyek nem gyakoroltak lényeges hatást az oszteoklasztogenezisre, nem is expresszáltak jelentős mennyiséget a felsorolt molekulákból, valamint a három donorcsoport exoszómáinak OPG és RANKL szintjében nem figyeltünk meg jelentős eltéréseket. [253] Ezzel szemben egészségesekben és RA-ban több RANK tartalmú exoszómát mutattunk ki. Ezek a RANK-ot hordozó képletek Huynh és mtsai által leírt kompetitív módon kötődhetnek a RANKL-hoz, meggátolva annak serkentő hatását. [220] Ez a hatásmechanizmus egy lehetséges magyarázata lehetne megfigyeléseinknek. AP-ben nem volt magas az exoszómális RANK mennyisége, de ezek az EV-k nem is csökkentették az oszteoklasztogenezis mértékét. Emellett a három vizsgált csoport vezikulaprofilja is különbözött, eltérő mennyiségben voltak jelen a donorsejt-eredetű markerek a vezikulákon. Arthritisben több limfocitáktól származó extracelluláris vezikulát detektáltunk a preparátumokban, mint az egészséges mintákon, valamint RA-ban nagyobb mennyiségben voltak jelen a vérlemezkéktől származó exoszómák. **(49. Ábra)** Az általunk vizsgált gyulladásos kórképekben a limfociták patogenetikus szerepe nagy jelentőséggel bír, így arra következtethetünk, hogy ezen sejtféleségek vezikulakibocsátásuk révén is hozzájárulhatnak a betegségek kialakításához, létrejöttéhez.

Munkánk során csak a vezikulák és az oszteoklasztok direkt kapcsolatát vizsgáltuk, de az extracelluláris vezikulák indirekt módon is befolyásolhatják a csontfaló sejtek működését. Erre lehet példa, hogy gyulladásos citokinek mennyiségére lehetnek hatással, valamint másik ízületben, csontszövetben előforduló sejttípus működését befolyásolhatják, amely sejtek aztán direkt sejt-sejt kontaktussal, szolubilis

molekulákkal, vagy EV kibocsátással módosíthatják az oszteoklasztok működését. [59]
(50. Ábra) Ezen lehetséges hatásmechanizmusok pontosabb feltérképezésére munkacsoportunk további méréseket tervez.



50. Ábra: Összefoglalás: a vér-eredetű extracelluláris vezikulák lehetséges hatása az oszteoklasztogenezisre.

Mind az RA-ra, mind a perifériás típusú AP-re a fokozott oszteoklasztogenezis és a következményes eróziók kialakulása jellemző. A csontfaló sejtek képződését, aktiválódását több egyéb faktor mellett citokinek, autoantitestek és EV-k befolyásolhatják. RA-ban emelkedett számú EV-t írtak le perifériás típusú vérmintákban. A vastaggal szedett betűk a prominensebb szerepet hangsúlyozzák a két kórkép patomechanizmusában. ACPA= anti- ciklikus citrullinált peptid ellenes antitest, EV= extracelluláris vezikula, IL= interleukin, RANK= nukleáris faktor κ B receptor aktivátora, RA= reumatoid artritisz, RANKL= RANK ligand, TNF= tumor nekrosis faktor, TGF= tumor növekedési faktor

Forrás: Marton N et al. (2017) Cell Mol Life Sci [253] alapján

7. KÖVETKEZTETÉSEK

A „4. Célkitűzések” fejezetnek megfelelően taglalva eredményeink alapján az itt felsorolt következtetéseket vontuk le:

1. Az extracelluláris vezikulákkal történő méréseknél rendkívüli fontossággal bír a körütekintő mintavétel, feldolgozás és tárolás, valamint megfelelő kontrollok alkalmazása a biológiai hatás detektálásához. A hosszabb futamidejű centrifugálási lépésekhez képest az 1 óra hosszúságú ultracentrifugálási protokollal nyerhető ki a legtöbb exoszómára jellemző morfológiájú vezikula a mintából. Az EV preparátumok $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on hosszabb ideig maradnak morfológiailag intaktak, mint $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, de 8 hét után mindkét tárolási hőmérsékleten kimutathatóan degradálódnak a vezikuláris fehérjék, ezért a minták lehető leghamarabbi felhasználása javasolt.
2. A plazmában előforduló, többnyire vérsejtek által kibocsátott exoszómák az oszteoklasztokkal direkt kapcsolatba léphetnek, melynek következményeképp egészséges egyének esetében egy rendkívül markáns csontfaló sejt- képződést gátló hatás jön létre. Ennek a folyamatnak élettani szerepe lehet a csontok regenerációjában.
3. Az egészségesekben leírthoz hasonlóan reumatoid artritiszben is inhibitoros hatása van a vérből szeparált exoszómáknak az *in vitro* oszteoklasztogenezisre, míg poliartritiszes artritisz pszoriaticás donoroknál nem jelentkezik ilyen gátló hatás, ami a két gyulladásos reumatológiai kórkép eltérő patogenezisére utal.
4. Lehetséges, hogy az exoszómák csontfaló sejt differenciálódást gátló hatásának hátterében az exoszómális RANK révén az oszteoklaszt prekursorok sejt felszíni RANK és szolubilis RANKL kapcsolódásának kompetitív gátlása áll. A folyamat részletesebb megismerése új terápiás célpontok és lehetőségek azonosításához járulhat hozzá reumatoid artritiszben és artritisz pszoriaticában. Emellett egészséges, reumatoid artritiszes és artritisz pszoriaticás egyéneknél eltér a keringő vezikulamintázat, amely új diagnosztikus és prognosztikus tesztek kifejlesztéséhez járulhat hozzá.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az extracelluláris vezikulák szubcelluláris, membránnal határolt képletek, melyek a sejtközi kommunikáció új formáját képviselik, mivel képesek információt továbbítani a donorsejttől a recipiens sejttípushoz. A vezikulák termelődése általános sejtbioológiai jelenség, így minden testnedvben előfordulnak. A legkisebb extracelluláris vezikulák a 150 nm-nél kisebb exoszómák, náluk nagyobbak az ektocitózissal keletkező mikrovezikulák. A vezikulák izolálása, tárolása nagy körütekintést igényel. Többféle módszer áll rendelkezésünkre exoszómák, mikrovezikulák szeparálására, az egyik legelterjedtebb eljárás szűrési és centrifugálási lépéseken alapul. Eredményeink szerint a centrifugálási idővel együtt nő a kontamináló fehérjék kiülepítésének, illetve a vezikuláris képletek degradálódásának esélye is, ezenkívül a vezikula preparátumok tárolási hőmérséklete is jelentősen befolyásolja a minták intaktságát.

Különböző betegségekben megváltozhat a vér vezikula-profilja. Méréseink alapján reumatoid artritiszben és artritisz pszoriaticában, két gyakori immunmediált gyulladásos reumatológiai betegségben, több limfocita-eredetű vezikula található meg a perifériás vérben, mint egészségesekben.

A csontszövet jelentős mennyiségű cirkulációban jelenlévő extracelluláris vezikulát vesz fel. Az extracelluláris vezikulák a csontsejtekkel kapcsolatba léphetnek, hatással lehetnek a sejtek differenciálódására, aktivációs állapotára. Először mutattuk ki, hogy egészséges egyének és reumatoid artritiszben szenvedő donorok véréből izolált exoszómák gátolják a csontfaló sejtek képződését *in vitro* körülmények között. Perifériás típusú artritisz pszoriaticában szenvedő egyének vér-eredetű exoszómái nem hatnak negatívan az oszteoklasztogenezisre. Egészséges és RA donorok mintáin az exoszómák hatására tendenciózusan csökken az oszteoklaszt-specifikus gének expressziója. A mikrovezikuláknak nincsen jelentős hatása az *in vitro* oszteoklasztogenezisre. RA-ban és egészségesekben több RANK-ot hordozó exoszóma van jelen a vérben, ami a RANKL-hoz kötődve kompetitíven gátolhatja a csontfaló sejtek differenciálódását.

Eredményeink szerint a plazmában jelenlévő exoszómák hatással lehetnek a csontfaló sejtekre, s így a csontbontásra is. Ez a hatás RA-ban és AP-ben küönböző, ami a két kórkép eltérő patomechanizmusára világít rá.

9. SUMMARY

Extracellular vesicles are cell-derived membrane enclosed subcellular structures. They represent a new way of intercellular communication because of their ability to transfer information from donor to recipient cells. Exosomes are vesicles with maximum approx. 150 nm diameter; microvesicles are bigger structures come into existence via ectocytosis. The production of extracellular vesicles is common in every cell type, so they could be found in all type of the biological fluids.

Separation and storage of vesicle samples have to be accurate and careful in order to obtain a reliable/reproducible sample quality. A lot of EV isolation protocols are existing according to the literature but one of the most frequently used protocol type is based on filtration and centrifugation. According to our results longer centrifugation time may lead to the destruction of the vesicular components. Storage temperature could have a critical impact on the quality of the vesicle samples.

The extracellular vesicle profile of the blood plasma might be altered in different diseases. We have found that in rheumatoid and psoriatic arthritis -two common type of immune-mediated arthropathies- more T cell-derived vesicles could be found in peripheral blood samples.

After the liver, the bone tissue is the second biggest consumer of extracellular vesicles. EVs could alter the differentiation and activation of bone cells. We have described the first time that blood- derived exosomes of healthy and rheumatoid arthritis patients, but not peripheral type psoriatic arthritis donors, have an inhibitory effect on *in vitro* osteoclastogenesis. Healthy- and RA- derived exosomes tendentially decrease the expression of osteoclast-related genes. Microvesicles do not have a significant effect on the generation of osteoclasts. There are more RANK expressing exosomes in healthy and rheumatoid arthritis donors' blood than in psoriatic arthritis blood samples. A possible explanation of the observed inhibitory effect could be that RANK containing vesicles are able to attach to the soluble RANKL molecules and competitively inhibit the generation of bone resorbing osteoclasts.

According to our finding, circulating extracellular vesicles could have an impact on the generation of osteoclasts and influence the bone resorption. This effect is different in RA and PsA which points to the different pathogenesis of the two diseases.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Colombo M, Raposo G, Thery C. (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30: 255-289.
2. McInnes IB, Schett G. (2011) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 365: 2205-2219.
3. Gladman DD, Antoni C, Mease P, Clegg DO, Nash P. (2005) Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. *Ann Rheum Dis*, 64 Suppl 2:14-17.
4. Teitelbaum SL. (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289: 1504-1508.
5. Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, Jakobsson PJ, Baum W, Nimmerjahn F, Szarka E, Sarmay G, Krumbholz G, Neumann E, Toes R, Scherer HU, Catrina AI, Klareskog L, Jurdic P, Schett G. (2012) Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest*, 122: 1791-1802.
6. Paine A, Ritchlin C. (2016) Bone remodeling in psoriasis and psoriatic arthritis: an update. *Curr Opin Rheumatol*, 28: 66-75.
7. Nakashima T, Takayanagi H. (2009) Osteoclasts and the immune system. *J Bone Miner Metab*, 27: 519-529.
8. Lee EY, Choi DY, Kim DK, Kim JW, Park JO, Kim S, Kim SH, Desiderio DM, Kim YK, Kim KP, Gho YS. (2009) Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics*, 9: 5425-5436.
9. Bebawy M, Combes V, Lee E, Jaiswal R, Gong J, Bonhoure A, Grau GE. (2009) Membrane microparticles mediate transfer of P-glycoprotein to drug sensitive cancer cells. *Leukemia*, 23: 1643-1649.
10. Post DM, Zhang D, Eastvold JS, Teghanemt A, Gibson BW, Weiss JP. (2005) Biochemical and functional characterization of membrane blebs purified from *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Biol Chem*, 280: 38383-38394.
11. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Thery C. (2016) Proteomic comparison defines

- novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: E968-977.
12. Chargaff E, West R. (1946) The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem*, 166: 189-197.
 13. Wolf P. (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*, 13: 269-288.
 14. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Kramer-Albers EM, Laitinen S, Lasser C, Lener T, Ligeti E, Line A, Lipps G, Llorente A, Lotvall J, Mancek-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-'t Hoen EN, Nyman TA, O'Driscoll L, Olivan M, Oliveira C, Pallinger E, Del Portillo HA, Reventos J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sanchez-Madrid F, Santarem N, Schallmoser K, Ostendorf MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos M, Wauben MH, De Wever O. (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*, 4: 27066.
 15. Pap E, Pallinger E, Pasztoi M, Falus A. (2009) Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflamm Res*, 58: 1-8.
 16. Lasser C, Thery C, Buzas EI, Mathivanan S, Zhao W, Gho YS, Lotvall J. (2016) The International Society for Extracellular Vesicles launches the first massive open online course on extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*, 5: 34299.
 17. Morello M, Minciacchi VR, de Candia P, Yang J, Posadas E, Kim H, Griffiths D, Bhowmick N, Chung LW, Gandellini P, Freeman MR, Demicheli F, Di Vizio D. (2013) Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA. *Cell Cycle*, 12: 3526-3536.
 18. Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, Laszlo V, Pallinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzas EI. (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*, 68: 2667-2688.

19. Thery C, Ostrowski M, Segura E. (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9: 581-593.
20. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257.
21. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. (2001) Rapid secretion of interleukin-1 β by microvesicle shedding. *Immunity*, 15: 825-835.
22. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. (1999) Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and α -granules. *Blood*, 94: 3791-3799.
23. Basso M, Bonetto V. (2016) Extracellular Vesicles and a Novel Form of Communication in the Brain. *Front Neurosci*, 10: 127.
24. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2: 569-579.
25. Perez-Hernandez D, Gutierrez-Vazquez C, Jorge I, Lopez-Martin S, Ursa A, Sanchez-Madrid F, Vazquez J, Yanez-Mo M. (2013) The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem*, 288: 11649-11661.
26. Nazarenko I, Rana S, Baumann A, McAlear J, Hellwig A, Trendelenburg M, Lochnit G, Preissner KT, Zoller M. (2010) Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res*, 70: 1668-1678.
27. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita C F, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohen N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, Thery C. (2010) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*, 12: 19-30; sup pp 11-13.
28. Hanson PI, Shim S, Merrill SA. (2009) Cell biology of the ESCRT machinery. *Curr Opin Cell Biol*, 21: 568-574.

29. Metcalf D, Isaacs AM. (2010) The role of ESCRT proteins in fusion events involving lysosomes, endosomes and autophagosomes. *Biochem Soc Trans*, 38: 1469-1473.
30. Johnstone R. M, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*, 262: 9412-9420.
31. Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. (1998) Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med*, 4: 31-36.
32. Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. (2002) The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*, 3: 321-330.
33. Calzolari A, Raggi C, Deaglio S, Sposi NM, Stafsnes M, Fecchi K, Parolini I, Malavasi F, Peschle C, Sargiacomo M, Testa U. (2006) Tfr2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J Cell Sci*, 119: 4486-4498.
34. Subra C, Grand D, Laulagnier K, Stella A, Lambeau G, Paillasse M, De Medina P, Monsarrat B, Perret B, Silvente-Poirot S, Poirot M, Record M. (2010) Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res*, 51: 2105-2120.
35. Kim CW, Lee HM, Lee TH, Kang C, Kleinman HK, Gho YS. (2002) Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. *Cancer Res*, 62: 6312-6317.
36. Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. (2007) Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*, 89: 205-212.
37. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. (2006) Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20: 847-856.
38. Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF. (2010) Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm (Vienna)*, 117: 1-4.

39. Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, Zheng Y, Hoshino A, Brazier H, Xiang J, Williams C, Rodriguez-Barrueco R, Silva JM, Zhang W, Hearn S, Elemento O, Paknejad N, Manova-Todorova K, Welte K, Bromberg J, Peinado H, Lyden D. (2014) Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res*, 24: 766-769.
40. Waldenstrom A, Genneback N, Hellman U, Ronquist G. (2012) Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One*, 7: e34653.
41. Lee TH, Chennakrishnaiah S, Audemard E, Montermini L, Meehan B, Rak J. (2014) Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 451: 295-301.
42. Krishnamoorthy L, Bess J. W, Jr, Preston AB, Nagashima K, Mahal LK. (2009) HIV-1 and microvesicles from T cells share a common glycome, arguing for a common origin. *Nat Chem Biol*, 5: 244-250.
43. Escrevente C, Keller S, Altevogt P, Costa J. (2011) Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer*, 11: 108.
44. Staubach S, Schadewaldt P, Wendel U, Nohroudi K, Hanisch FG. (2012) Differential glycomics of epithelial membrane glycoproteins from urinary exovesicles reveals shifts toward complex-type N-glycosylation in classical galactosemia. *J Proteome Res*, 11: 906-916.
45. Gerlach JQ, Kruger A, Gallogly S, Hanley S. A, Hogan MC, Ward CJ, Joshi L, Griffin MD. (2013) Surface glycosylation profiles of urine extracellular vesicles. *PLoS One*, 8: e74801.
46. Heemskerk JW, Bevers E. M, Lindhout T. (2002) Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*, 88: 186-193.
47. Merten M, Pakala R, Thiagarajan P, Benedict CR. (1999) Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism. *Circulation*, 99: 2577-2582.
48. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM. (2010)

- Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science*, 327: 580-583.
49. Cloutier N, Tan S, Boudreau LH, Cramb C, Subbaiah R, Lahey L, Albert A, Shnayder R, Gobezie R, Nigrovic PA, Farndale RW, Robinson WH, Brisson A, Lee DM, Boilard E. (2013) The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes. *EMBO Mol Med*, 5: 235-249.
 50. Takahashi Y, Nishikawa M, Shinotsuka H, Matsui Y, Ohara S, Imai T, Takakura Y. (2013) Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. *J Biotechnol*, 165: 77-84.
 51. Rank A, Nieuwland R, Crispin A, Grutzner S, Iberer M, Toth B, Pihusch R. (2011) Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets*, 22: 111-116.
 52. Willekens FL, Werre J. M, Kruijt JK, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Dopp Y. A, van den Bos AG, Bosman GJ, van Berkel TJ. (2005) Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood*, 105: 2141-2145.
 53. Saunderson SC, Dunn AC, Crocker PR, McLellan AD. (2014) CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node. *Blood*, 123: 208-216.
 54. Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D. (2012) Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*, 18: 883-891.
 55. Sabapatha A, Gercel-Taylor C, Taylor DD. (2006) Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am J Reprod Immunol*, 56: 345-355.
 56. Taylor DD, Akyol S, Gercel-Taylor C. (2006) Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. *J Immunol*, 176: 1534-1542.

57. Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, Agouni A, Heymes C, Sargentini C, Asfar P, Martinez MC, Andriantsitohaina R. (2008) Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Am J Respir Crit Care Med*, 178: 1148-1155.
58. Wang JG, Williams JC, Davis BK, Jacobson K, Doerschuk CM, Ting JP, Mackman N. (2011) Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1 β -dependent manner. *Blood*, 118: 2366-2374.
59. Szabo GT, Tarr B, Paloczi K, Eder K, Lajko E, Kittel A, Toth S, Gyorgy B, Pasztoi M, Nemeth A, Osteikoetxea X, Pallinger E, Falus A, Szabo-Taylor K, Buzas EI. (2014) Critical role of extracellular vesicles in modulating the cellular effects of cytokines. *Cell Mol Life Sci*, 71: 4055-4067.
60. Giri PK, Schorey JS. (2008) Exosomes derived from M. Bovis BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in vitro and in vivo. *PLoS One*, 3: e2461.
61. Walker JD, Maier CL, Pober JS. (2009) Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4⁺ memory T cells by releasing antigenic exosomes. *J Immunol*, 182: 1548-1559.
62. Obregon C, Rothen-Rutishauser B, Gitahi SK, Gehr P, Nicod LP. (2006) Exovesicles from human activated dendritic cells fuse with resting dendritic cells, allowing them to present alloantigens. *Am J Pathol*, 169: 2127-2136.
63. Bedford P, Garner K, Knight SC. (1999) MHC class II molecules transferred between allogeneic dendritic cells stimulate primary mixed leukocyte reactions. *Int Immunol*, 11: 1739-1744.
64. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, 183: 1161-1172.
65. Muntasell A, Berger A. C, Roche PA. (2007) T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes. *Embo j*, 26: 4263-4272.
66. Thery C, Duban L, Segura E, Veron P, Lantz O, Amigorena S. (2002) Indirect activation of naive CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol*, 3: 1156-1162.

67. Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F. (2012) Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 328-335.
68. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9: 654-659.
69. Skokos D, Botros HG, Demeure C, Morin J, Peronet R, Birkenmeier G, Boudaly S, Mecheri S. (2003) Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. *J Immunol*, 170: 3037-3045.
70. Admyre C, Grunewald J, Thyberg J, Gripenback S, Tornling G, Eklund A, Scheynius A, Gabrielsson S. (2003) Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *Eur Respir J*, 22: 578-583.
71. Thomas LM, Salter RD. (2010) Activation of macrophages by P2X7-induced microvesicles from myeloid cells is mediated by phospholipids and is partially dependent on TLR4. *J Immunol*, 185: 3740-3749.
72. Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Croce CM. (2013) A new role for microRNAs, as ligands of Toll-like receptors. *RNA Biol*, 10: 169-174.
73. Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schorey JS. (2007) Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood*, 110: 3234-3244.
74. O'Neill HC, Quah BJ. (2008) Exosomes secreted by bacterially infected macrophages are proinflammatory. *Sci Signal*, 1: pe8.
75. Timar CI, Lorincz AM, Csepanyi-Komi R, Valyi-Nagy A, Nagy G, Buzas EI, Ivanyi Z, Kittel A, Powell DW, McLeish KR, Ligeti E. (2013) Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood*, 121: 510-518.
76. Ismail N, Wang Y, Dakhallallah D, Moldovan L, Agarwal K, Batte K, Shah P, Wisler J, Eubank TD, Tridandapani S, Paulaitis ME, Piper MG, Marsh CB. (2013) Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood*, 121: 984-995.

77. Hiemstra TF, Charles PD, Gracia T, Hester SS, Gatto L, Al-Lamki R, Floto RA, Su Y, Skepper JN, Lilley KS, Karet Frankl FE. (2014) Human urinary exosomes as innate immune effectors. *J Am Soc Nephrol*, 25: 2017-2027.
78. Liu C, Yu S, Zinn K, Wang J, Zhang L, Jia Y, Kappes JC, Barnes S, Kimberly RP, Grizzle WE, Zhang HG. (2006) Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J Immunol*, 176: 1375-1385.
79. Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z. (2008) Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol*, 180: 7249-7258.
80. Gyorgy B, Szabo TG, Turiak L, Wright M, Herczeg P, Ledeczki Z, Kittel A, Polgar A, Toth K, Derfalvi B, Zelenak G, Borocz I, Carr B, Nagy G, Vekey K, Gay S, Falus A, Buzas EI. (2012) Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. *PLoS One*, 7: e49726.
81. Skriner K, Adolph K, Jungblut P. R, Burmester GR. (2006) Association of citrullinated proteins with synovial exosomes. *Arthritis Rheum*, 54: 3809-3814.
82. Mor-Vaknin N, Kappes F, Dick AE, Legendre M, Damoc C, Teitz-Tennenbaum S, Kwok R, Ferrando-May E, Adams BS, Markovitz DM. (2011) DEK in the synovium of patients with juvenile idiopathic arthritis: characterization of DEK antibodies and posttranslational modification of the DEK autoantigen. *Arthritis Rheum*, 63: 556-567.
83. Buzas EI, Gyorgy B, Nagy G, Falus A, Gay S. (2014) Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 10: 356-364.
84. Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, van de Laar MA. (2002) Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 46: 1498-1503.
85. Messer L, Alsaleh G, Freyssinet JM, Zobairi F, Leray I, Gottenberg JE, Sibilia J, Toti-Orfanoudakis F, Wachsmann D. (2009) Microparticle-induced release of B-lymphocyte regulators by rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Res Ther*, 11: R40.

86. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L, Perez C, Saez C, Panes O, Matus V, Mezzano D. (2006) Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost*, 95: 94-99.
87. Baka Z, Senolt L, Vencovsky J, Mann H, Simon PS, Kittel A, Buzas E, Nagy G. (2010) Increased serum concentration of immune cell derived microparticles in polymyositis/dermatomyositis. *Immunol Lett*, 128: 124-130.
88. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. (2000) Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 101: 841-843.
89. Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, Aime G, Ahn YS. (2003) Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension*, 41: 211-217.
90. Amabile N, Heiss C, Real WM, Minasi P, McGlothlin D, Rame EJ, Grossman W, De Marco T, Yeghiazarians Y. (2008) Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 177: 1268-1275.
91. Bernard S, Loffroy R, Serusclat A, Boussel L, Bonnefoy E, Thevenon C, Rabilloud M, Revel D, Moulin P, Douek P. (2009) Increased levels of endothelial microparticles CD144 (VE-Cadherin) positives in type 2 diabetic patients with coronary noncalcified plaques evaluated by multidetector computed tomography (MDCT). *Atherosclerosis*, 203: 429-435.
92. Nomura S, Uehata S, Saito S, Osumi K, Ozeki Y, Kimura Y. (2003) Enzyme immunoassay detection of platelet-derived microparticles and RANTES in acute coronary syndrome. *Thromb Haemost*, 89: 506-512.
93. Nozaki T, Sugiyama S, Koga H, Sugamura K, Ohba K, Matsuzawa Y, Sumida H, Matsui K, Jinnouchi H, Ogawa H. (2009) Significance of a multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol*, 54: 601-608.

94. Nozaki T, Sugiyama S, Sugamura K, Ohba K, Matsuzawa Y, Konishi M, Matsubara J, Akiyama E, Sumida H, Matsui K, Jinnouchi H, Ogawa H. (2010) Prognostic value of endothelial microparticles in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*, 12: 1223-1228.
95. Nilsson RJ, Balaj L, Hulleman E, van Rijn S, Pegtel DM, Walraven M, Widmark A, Gerritsen WR, Verheul HM, Vandertop WP, Noske DP, Skog J, Wurdinger T. (2011) Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood*, 118: 3680-3683.
96. Hron G, Kollars M, Weber H, Sagaster V, Quehenberger P, Eichinger S, Kyrle PA, Weltermann A. (2007) Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb Haemost*, 97: 119-123.
97. Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. (2007) Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost*, 5: 520-527.
98. Hood JL, San RS, Wickline SA. (2011) Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res*, 71: 3792-3801.
99. Tesselaar ME, Romijn FP, van der Linden IK, Bertina RM, Osanto S. (2009) Microparticle-associated tissue factor activity in cancer patients with and without thrombosis. *J Thromb Haemost*, 7: 1421-1423.
100. Auwerda JJ, Yuana Y, Osanto S, de Maat MP, Sonneveld P, Bertina R.M, Leebeek FW. (2011) Microparticle-associated tissue factor activity and venous thrombosis in multiple myeloma. *Thromb Haemost*, 105: 14-20.
101. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S, Wood MJ. (2011) Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol*, 29: 341-345.
102. El-Andaloussi S, Lee Y, Lakhal-Littleton S, Li J, Seow Y, Gardiner C, Alvarez-Erviti L, Sargent IL, Wood MJ. (2012) Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nat Protoc*, 7: 2112-2126.
103. Maguire CA, Balaj L, Sivaraman S, Crommentuijn MH, Ericsson M, Mincheva-Nilsson L, Baranov V, Gianni D, Tannous BA, Sena-Esteves M, Breakefield

- XO, Skog J. (2012) Microvesicle-associated AAV vector as a novel gene delivery system. *Mol Ther*, 20: 960-971.
104. Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gomez M, Archer J, Hatch SC, Erkizia I, Blanco J, Borrás FE, Puertas MC, Connor JH, Fernandez-Figueras MT, Moore L, Clotet B, Gummuluru S, Martinez-Picado J. (2009) Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood*, 113: 2732-2741.
 105. Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gomez M, Erkizia I, Puertas MC, Borrás FE, Blanco J, Martinez-Picado J. (2010) HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse? *PLoS Pathog*, 6: e1000740.
 106. Yuana Y, Bertina R. M, Osanto S. (2011) Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb Haemost*, 105: 396-408.
 107. Merchant A. M, Zhu Z, Yuan JQ, Goddard A, Adams C. W, Presta LG, Carter P. (1998) An efficient route to human bispecific IgG. *Nat Biotechnol*, 16: 677-681.
 108. Gyorgy B, Paloczi K, Kovacs A, Barabas E, Beko G, Varnai K, Pallinger E, Szabo-Taylor K, Szabo TG, Kiss AA, Falus A, Buzas EI. (2014) Improved circulating microparticle analysis in acid-citrate dextrose (ACD) anticoagulant tube. *Thromb Res*, 133: 285-292.
 109. Artoni A, Merati G, Padovan L, Scalabrino E, Chantarangkul V, Tripodi A, (2012) Residual platelets are the main determinants of microparticles count in frozen-thawed plasma, Residual platelets are the main determinants of microparticles count in frozen-thawed plasma United States, 2012:561-562.
 110. Larson MC, Luthi MR, Hogg N, Hillery CA. (2013) Calcium-phosphate microprecipitates mimic microparticles when examined with flow cytometry. *Cytometry A*, 83: 242-250.
 111. Sodar BW, Kittel A, Paloczi K, Vukman KV, Osteikoetxea X, Szabo-Taylor K, Nemeth A, Sperlagh B, Baranyai T, Giricz Z, Wiener Z, Turiak L, Drahos L, Pallinger E, Vekey K, Ferdinandy P, Falus A, Buzas EI. (2016) Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. *Sci Rep*, 6: 24316.

112. Gyorgy B, Modos K, Pallinger E, Paloczi K, Pasztoi M, Misjak P, Deli MA, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgar A, Toth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel A, Buzas EI. (2011) Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood*, 117: e39-48.
113. Osteikoetxea X, Sodar B, Nemeth A, Szabo-Taylor K, Paloczi K, Vukman KV, Tamasi V, Balogh A, Kittel A, Pallinger E, Buzas EI. (2015) Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Org Biomol Chem*, 13: 9775-9782.
114. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 3: Unit 3.22.
115. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, Dignat-George F. (2012) Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost*, 10: 437-446.
116. Boing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, Coumans FA, Sturk A, Nieuwland R. (2014) Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles*, 3:
117. Muller L, Hong CS, Stolz DB, Watkins SC, Whiteside TL. (2014) Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *J Immunol Methods*, 411: 55-65.
118. Nordin JZ, Lee Y, Vader P, Mager I, Johansson HJ, Heusermann W, Wiklander OP, Hallbrink M, Seow Y, Bultema JJ, Gilthorpe J, Davies T, Fairchild PJ, Gabrielsson S, Meisner-Kober NC, Lehtio J, Smith CI, Wood MJ, El Andaloussi S. (2015) Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomedicine*, 11: 879-883.
119. Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CS, Wiegmans AP, Leimgruber A, Moller A. (2015) Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles*, 4: 27031.

120. de Menezes-Neto A, Saez MJ, Lozano-Ramos I, Segui-Barber J, Martin-Jaular L, Ullate JM, Fernandez-Becerra C, Borrás FE, Del Portillo HA. (2015) Size-exclusion chromatography as a stand-alone methodology identifies novel markers in mass spectrometry analyses of plasma-derived vesicles from healthy individuals. *J Extracell Vesicles*, 4: 27378.
121. Lotvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzas EI, Di Vizio D, Gardiner C, Ghossein YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Thery C. (2014) Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*, 3: 26913.
122. Connor DE, Exner T, Ma DD, Joseph JE. (2010) The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost*, 103: 1044-1052.
123. Nakashima T, Takayanagi H. (2009) Osteoimmunology: crosstalk between the immune and bone systems. *J Clin Immunol*, 29: 555-567.
124. Nakashima T, Hayashi M, Takayanagi H. (2011) [Bone and calcium update; bone research update. Osteoclastogenesis and osteoimmunology]. *Clin Calcium*, 21: 93-102.
125. Kneser KH. (1976) Crystallization of fibrils, chondroid and osseous mineralization in desmal osteogenesis and intervertebral disk. *Acta Anat (Basel)*, 96: 429-443.
126. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Bone. In: Ross M Kaye GI, Pawlina W (szerk.), *Histology: A Text and Atlas* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003: 180-213.
127. Geddes AC. (1913) The Origin of the Osteoblast and of the Osteoclast. *J Anat Physiol*, 47: 159-176.
128. Rauner M, Sipos W, Pietschmann P. (2007) Osteoimmunology. *Int Arch Allergy Immunol*, 143: 31-48.
129. Aguila HL, Rowe DW. (2005) Skeletal development, bone remodeling, and hematopoiesis. *Immunol Rev*, 208: 7-18.

130. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, Choi Y. (2006) Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol*, 24: 33-63.
131. Gentry SD, Bramblett, CA. (1988) *The Anatomy and Biology of the Human Skeleton*. . Texas A&M University Press, 4.
132. MacLellan LM, Montgomery J, Sugiyama F, Kitson SM, Thummler K, Silverman GJ, Beers SA, Nibbs RJ, McInnes IB, Goodyear CS. (2011) Co-opting endogenous immunoglobulin for the regulation of inflammation and osteoclastogenesis in humans and mice. *Arthritis Rheum*, 63: 3897-3907.
133. Felix R, Cecchini MG, Hofstetter W, Elford PR, Stutzer A, Fleisch H. (1990) Impairment of macrophage colony-stimulating factor production and lack of resident bone marrow macrophages in the osteopetrotic op/op mouse. *J Bone Miner Res*, 5: 781-789.
134. Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW, Jr, Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW, Stanley ER. (1990) Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 4828-4832.
135. Marton N, Baricza E, Géher P, Falus A, Nagy G. (2012) Az osteoclastok aktivitásának humorális és farmakológiai szabályozása. *Immunológiai Szemle*, 4: 11-18.
136. Marton N, Baricza E, Ersek B, Buzas EI, Nagy G. (2015) The Emerging and Diverse Roles of Src-Like Adaptor Proteins in Health and Disease. *Mediators Inflamm*, 2015: 952536.
137. Ross FP, Teitelbaum SL. (2005) α v β 3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol Rev*, 208: 88-105.
138. Blair HC, Robinson LJ, Zaidi M. (2005) Osteoclast signalling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 328: 728-738.
139. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*, 3: 889-901.

140. Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, Tanaka S, Inoue J, Reddy SV, Hata K, Yamashita K, Hiraga T, Watanabe T, Kukita T, Yoshioka K, Rao A, Yoneda T. (2004) Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J Clin Invest*, 114: 475-484.
141. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89: 309-319.
142. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 3597-3602.
143. McHugh KP, Hodivala-Dilke K, Zheng MH, Namba N, Lam J, Novack D, Feng X, Ross FP, Hynes RO, Teitelbaum SL. (2000) Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest*, 105: 433-440.
144. Miyamoto T, Arai F, Ohneda O, Takagi K, Anderson DM, Suda T. (2000) An adherent condition is required for formation of multinuclear osteoclasts in the presence of macrophage colony-stimulating factor and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand. *Blood*, 96: 4335-4343.
145. Kyriakides TR, Foster MJ, Keeney GE, Tsai A, Giachelli CM, Clark-Lewis I, Rollins BJ, Bornstein P. (2004) The CC chemokine ligand, CCL2/MCP1, participates in macrophage fusion and foreign body giant cell formation. *Am J Pathol*, 165: 2157-2166.
146. Sanjay A, Houghton A, Neff L, DiDomenico E, Bardelay C, Antoine E, Levy J, Gailit J, Bowtell D, Horne WC, Baron R. (2001) Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, alpha(v)beta(3) integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility. *J Cell Biol*, 152: 181-195.

147. Faccio R, Teitelbaum SL, Fujikawa K, Chappel J, Zallone A, Tybulewicz VL, Ross FP, Swat W. (2005) Vav3 regulates osteoclast function and bone mass. *Nat Med*, 11: 284-290.
148. Das Subhajit Crockett Julie C (2013) Osteoporosis – a current view of pharmacological prevention and treatment. *Drug Des Devel Ther*, 7: 7: 435–448.
149. Liu P, Ji Y, Yuen T, Rendina-Ruedy E, DeMambro VE, Dhawan S, Abu-Amer W, Izadmehr S, Zhou B, Shin AC, Latif R, Thangeswaran P, Gupta A, Li J, Shnayder V, Robinson ST, Yu YE, Zhang X, Yang F, Lu P, Zhou Y, Zhu LL, Oberlin DJ, Davies TF, Reagan MR, Brown A, Kumar TR, Epstein S, Iqbal J, Avadhani NG, New MI, Molina H, van Klinken JB, Guo EX, Buettner C, Haider S, Bian Z, Sun L, Rosen CJ, Zaidi M. (2017) Blocking FSH induces thermogenic adipose tissue and reduces body fat. *Nature*, 546: 107-112.
150. Kornak U, Kasper D, Bosl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ. (2001) Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*, 104: 205-215.
151. Palokangas H, Mulari M, Vaananen HK. (1997) Endocytic pathway from the basal plasma membrane to the ruffled border membrane in bone-resorbing osteoclasts. *J Cell Sci*, 110 (Pt 15): 1767-1780.
152. Ono T, Takayanagi H. (2016) [Osteoimmunology-overview]. *Clin Calcium*, 26: 661-669.
153. Arron JR, Choi Y. (2000) Bone versus immune system. *Nature*, 408: 535-536.
154. Rho J, Takami M, Choi Y. (2004) Osteoimmunology: interactions of the immune and skeletal systems. *Mol Cells*, 17: 1-9.
155. Wu H, Arron JR. (2003) TRAF6, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and osteoimmunology. *Bioessays*, 25: 1096-1105.
156. Matsuo K, Ray N. (2004) Osteoclasts, mononuclear phagocytes, and c-Fos: new insight into osteoimmunology. *Keio J Med*, 53: 78-84.
157. Lee SK, Surh CD. (2005) Role of interleukin-7 in bone and T-cell homeostasis. *Immunol Rev*, 208: 169-180.
158. Boyce BF, Xing L. (2007) Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*, 9 Suppl 1: S1.

159. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423: 337-342.
160. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. (1999) OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397: 315-323.
161. Itoh K, Udagawa N, Kobayashi K, Suda K, Li X, Takami M, Okahashi N, Nishihara T, Takahashi N. (2003) Lipopolysaccharide promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to lipopolysaccharide is different from that of macrophages. *J Immunol*, 170: 3688-3695.
162. Li H, Hong S, Qian J, Zheng Y, Yang J, Yi Q. (2010) Cross talk between the bone and immune systems: osteoclasts function as antigen-presenting cells and activate CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Blood*, 116: 210-217.
163. Takayanagi H. (2007) Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*, 7: 292-304.
164. Zaiss MM, Axmann R, Zwerina J, Polzer K, Guckel E, Skapenko A, Schulze-Koops H, Horwood N, Cope A, Schett G. (2007) Treg cells suppress osteoclast formation: a new link between the immune system and bone. *Arthritis Rheum*, 56: 4104-4112.
165. Itoh K, Udagawa N, Katagiri T, Iemura S, Ueno N, Yasuda H, Higashio K, Quinn J. M, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T, Takahashi N. (2001) Bone Morphogenetic Protein 2 Stimulates Osteoclast Differentiation and Survival Supported by Receptor Activator of Nuclear Factor-kappaB Ligand. *Endocrinology*, 142: 3656-3662.
166. Csomor P, Liktör B, Liktör B, Szekanecz Z, Sziklai I, Karosi T. (2012) Expression of bone morphogenetic protein 2, 4, 5, and 7 correlates with histological activity of otosclerotic foci. *Acta Otolaryngol*, 132: 624-631.
167. Lean J. M, Murphy C, Fuller K, Chambers TJ. (2002) CCL9/MIP-1gamma and its receptor CCR1 are the major chemokine ligand/receptor species expressed by osteoclasts. *J Cell Biochem*, 87: 386-393.

168. Yang M, Mailhot G, MacKay C. A, Mason-Savas A, Aubin J, Odgren PR. (2006) Chemokine and chemokine receptor expression during colony stimulating factor-1-induced osteoclast differentiation in the toothless osteopetrotic rat: a key role for CCL9 (MIP-1gamma) in osteoclastogenesis in vivo and in vitro. *Blood*, 107: 2262-2270.
169. Ishida N, Hayashi K, Hattori A, Yogo K, Kimura T, Takeya T. (2006) CCR1 acts downstream of NFAT2 in osteoclastogenesis and enhances cell migration. *J Bone Miner Res*, 21: 48-57.
170. Gronthos S, Zannettino AC. (2007) The role of the chemokine CXCL12 in osteoclastogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, 18: 108-113.
171. Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, Suzuki H, Suzuki T, Sato K, Yokochi T, Oda H, Nakamura K, Ida N, Wagner EF, Taniguchi T. (2002) RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature*, 416: 744-749.
172. Gao Y, Grassi F, Ryan MR, Terauchi M, Page K, Yang X, Weitzmann MN, Pacifici R. (2007) IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest*, 117: 122-132.
173. Takahashi N, Mundy GR, Roodman GD. (1986) Recombinant human interferon-gamma inhibits formation of human osteoclast-like cells. *J Immunol*, 137: 3544-3549.
174. Ries WL, Seeds MC, Key LL. (1989) Interleukin-2 stimulates osteoclastic activity: increased acid production and radioactive calcium release. *J Periodontal Res*, 24: 242-246.
175. Cheng J, Liu J, Shi Z, Xu D, Luo S, Siegal GP, Feng X, Wei S. (2011) Interleukin-4 inhibits RANKL-induced NFATc1 expression via STAT6: a novel mechanism mediating its blockade of osteoclastogenesis. *J Cell Biochem*, 112: 3385-3392.
176. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. (2008) Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev*, 29: 403-440.
177. Aguila HL, Mun SH, Kalinowski J, Adams DJ, Lorenzo JA, Lee SK. (2012) Osteoblast-specific overexpression of human interleukin-7 rescues the bone

- mass phenotype of interleukin-7-deficient female mice. *J Bone Miner Res*, 27: 1030-1042.
178. Miyaura C, Onoe Y, Inada M, Maki K, Ikuta K, Ito M, Suda T. (1997) Increased B-lymphopoiesis by interleukin 7 induces bone loss in mice with intact ovarian function: similarity to estrogen deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 9360-9365.
 179. Bendre MS, Gaddy-Kurten D, Mon-Foote T, Akel NS, Skinner RA, Nicholas RW, Suva LJ. (2002) Expression of interleukin 8 and not parathyroid hormone-related protein by human breast cancer cells correlates with bone metastasis in vivo. *Cancer Res*, 62: 5571-5579.
 180. Bendre MS, Margulies AG, Walser B, Akel NS, Bhattacharya S, Skinner RA, Swain F, Ramani V, Mohammad KS, Wessner LL, Martinez A, Guise TA, Chirgwin JM, Gaddy D, Suva LJ. (2005) Tumor-derived interleukin-8 stimulates osteolysis independent of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand pathway. *Cancer Res*, 65: 11001-11009.
 181. Krishnamurthy A, Joshua V, Haj Hensvold A, Jin T, Sun M, Vivar N, Ytterberg AJ, Engstrom M, Fernandes-Cerqueira C, Amara K, Magnusson M, Wigerblad G, Kato J, Jimenez-Andrade JM, Tyson K, Rapecki S, Lundberg K, Catrina SB, Jakobsson PJ, Svensson C, Malmstrom V, Klareskog L, Wahamäa H, Catrina AI. (2016) Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. *Ann Rheum Dis*, 75: 721-729.
 182. Bendre MS, Montague DC, Peery T, Akel NS, Gaddy D, Suva LJ. (2003) Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone*, 33: 28-37.
 183. Kacena MA, Nelson T, Clough ME, Lee SK, Lorenzo JA, Gundberg CM, Horowitz MC. (2006) Megakaryocyte-mediated inhibition of osteoclast development. *Bone*, 39: 991-999.
 184. Owens JM, Gallagher AC, Chambers TJ. (1996) IL-10 modulates formation of osteoclasts in murine hemopoietic cultures. *J Immunol*, 157: 936-940.

185. Girasole G, Passeri G, Jilka RL, Manolagas SC. (1994) Interleukin-11: a new cytokine critical for osteoclast development. *J Clin Invest*, 93: 1516-1524.
186. Amcheslavsky A, Bar-Shavit Z. (2006) Interleukin (IL)-12 mediates the anti-osteoclastogenic activity of CpG-oligodeoxynucleotides. *J Cell Physiol*, 207: 244-250.
187. Djaafar S, Pierroz DD, Chicheportiche R, Zheng XX, Ferrari SL, Ferrari-Lacraz S. (2010) Inhibition of T cell-dependent and RANKL-dependent osteoclastogenic processes associated with high levels of bone mass in interleukin-15 receptor-deficient mice. *Arthritis Rheum*, 62: 3300-3310.
188. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. (1999) IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest*, 103: 1345-1352.
189. Lubberts E, Joosten LA, Chabaud M, van Den Bersselaar L, Oppers B, Coenen-De Roo CJ, Richards CD, Miossec P, van Den Berg WB. (2000) IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion. *J Clin Invest*, 105: 1697-1710.
190. Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, Gillespie MT. (2001) IL-12 alone and in synergy with IL-18 inhibits osteoclast formation in vitro. *J Immunol*, 166: 4915-4921.
191. Kawase Y, Hoshino T, Yokota K, Kuzuhara A, Nakamura M, Maeda Y, Nishiwaki E, Zenmyo M, Hiraoka K, Aizawa H, Yoshino K. (2003) Bone malformations in interleukin-18 transgenic mice. *J Bone Miner Res*, 18: 975-983.
192. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H. (2006) Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*, 203: 2673-2682.
193. Dixit N, Wu DJ, Belgacem YH, Borodinsky LN, Gershwin ME, Adamopoulos IE. (2014) Leukotriene B4 activates intracellular calcium and augments human osteoclastogenesis. *Arthritis Res Ther*, 16: 496.

194. Onodera S, Nishihira J, Iwabuchi K, Koyama Y, Yoshida K, Tanaka S, Minami A. (2002) Macrophage migration inhibitory factor up-regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. Relevance to intracellular signaling pathways. *J Biol Chem*, 277: 7865-7874.
195. Jacquin C, Koczon-Jaremkó B, Aguila HL, Leng L, Bucala R, Kuchel GA, Lee SK. (2009) Macrophage migration inhibitory factor inhibits osteoclastogenesis. *Bone*, 45: 640-649.
196. van't Hof RJ, Ralston SH. (1997) Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *J Bone Miner Res*, 12: 1797-1804.
197. Armour KE, van't Hof RJ, Grabowski PS, Reid DM, Ralston SH. (1999) Evidence for a pathogenic role of nitric oxide in inflammation-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 14: 2137-2142.
198. Ralston SH, Ho LP, Helfrich MH, Grabowski PS, Johnston PW, Benjamin N. (1995) Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. *J Bone Miner Res*, 10: 1040-1049.
199. Sims NA, Quinn JM. (2014) Osteoimmunology: oncostatin M as a pleiotropic regulator of bone formation and resorption in health and disease. *Bonekey Rep*, 3: 527.
200. Houde N, Chamoux E, Bisson M, Roux S. (2009) Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) induces human osteoclast apoptosis by up-regulating Bim. *J Biol Chem*, 284: 23397-23404.
201. Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. (1999) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*, 25: 255-259.
202. Hu Wim Van. (2012) Sclerosing bone disorders: a lot of knowns but still some unknowns. *Bonekey Rep*, 1: 97.
203. Nagy G. A reumatológiai betegségek patogeneze. In: Szekanecz Z (szerk.), *Reumatológia: egyetemi jegyzet*, SpringMed, Budapest, 2011: 33-54.
204. Péntek M, Horváth C, Boncz I, Falusi Z, Tóth E, Sebestyén A, Májer I, Brodszky V, Gulácsi L. (2008) Epidemiology of osteoporosis related fractures in

- Hungary from the nationwide health insurance database 1999–2003. *Osteoporos Int*, 243–249.
205. Cohen A, Liu XS, Stein EM, McMahon DJ, Rogers HF, Lemaster J, Recker RR, Lappe JM, Guo XE, Shane E. (2009) Bone microarchitecture and stiffness in premenopausal women with idiopathic osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 94: 4351-4360.
 206. de Villiers TJ. (2017) The quest for new drugs to prevent osteoporosis-related fractures. *Climacteric*, 20: 103-106.
 207. Borthwick KJ, Kandemir N, Topaloglu R, Kornak U, Bakkaloglu A, Yordam N, Ozen S, Mocan H, Shah GN, Sly WS, Karet FE. (2003) A phenocopy of CAII deficiency: a novel genetic explanation for inherited infantile osteopetrosis with distal renal tubular acidosis. *J Med Genet*, 40: 115-121.
 208. Cheow HK, Steward CG, Grier DJ. (2001) Imaging of malignant infantile osteopetrosis before and after bone marrow transplantation. *Pediatr Radiol*, 31: 869-875.
 209. Marton N, Kovács OT, Baricza E, Királyhidi P. (2016) Vázrendszeri problémák. *Élet és Tudomány*, 71: 1200-1202.
 210. Chen W, Yang S, Abe Y, Li M, Wang Y, Shao J, Li E, Li YP. (2007) Novel pycnodysostosis mouse model uncovers cathepsin K function as a potential regulator of osteoclast apoptosis and senescence. *Hum Mol Genet*, 16: 410-423.
 211. Marton N. (2014) A reumatoid artritisz kutatása. Immunológiai tényezők és csontteroziók. *Élet és Tudomány*, 20: 621-623.
 212. Donáth J, Poór G. (2011) A Paget-kór aktuális kérdései. *Orvosi Hetilap*, 152: 1337-1346.
 213. Hocking L, Slee F, Haslam SI, Cundy T, Nicholson G, van Hul W, Ralston SH. (2000) Familial Paget's disease of bone: patterns of inheritance and frequency of linkage to chromosome 18q. *Bone*, 26: 577-580.
 214. Hocking LJ, Herbert CA, Nicholls RK, Williams F, Bennett ST, Cundy T, Nicholson GC, Wuyts W, Van Hul W, Ralston SH. (2001) Genomewide search in familial Paget disease of bone shows evidence of genetic heterogeneity with candidate loci on chromosomes 2q36, 10p13, and 5q35. *Am J Hum Genet*, 69: 1055-1061.

215. McGowan JP. (1932) On the fundamental nature of parathormone action. *Biochem J*, 26: 1138-1143.
216. Kozlow W, Guise TA. (2005) Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 10: 169-180.
217. Gray RW, Caldas AE, Wilz DR, Lemann J, Jr, Smith GA, DeLuca HF. (1978) Metabolism and excretion of 3H-1,25-(OH)₂-vitamin D₃ in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab*, 46: 756-765.
218. Copp DH, Cameron EC. (1961) Demonstration of a hypocalcemic factor (calcitonin) in commercial parathyroid extract. *Science*, 134: 2038.
219. Deng L, Wang Y, Peng Y, Wu Y, Ding Y, Jiang Y, Shen Z, Fu Q. (2015) Osteoblast-derived microvesicles: A novel mechanism for communication between osteoblasts and osteoclasts. *Bone*, 79: 37-42.
220. Huynh N, VonMoss L, Smith D, Rahman I, Felemban MF, Zuo J, Rody WJ, Jr, McHugh KP, Holliday LS. (2016) Characterization of Regulatory Extracellular Vesicles from Osteoclasts. *J Dent Res*, 95: 673-679.
221. Ekstrom K, Omar O, Graneli C, Wang X, Vazirisani F, Thomsen P. (2013) Monocyte exosomes stimulate the osteogenic gene expression of mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 8: e75227.
222. Qin Y, Wang L, Gao Z, Chen G, Zhang C. (2016) Bone marrow stromal/stem cell-derived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation in vitro and promote bone regeneration in vivo. *Sci Rep*, 6: 21961.
223. Narayanan R, Huang CC, Ravindran S. (2016) Hijacking the Cellular Mail: Exosome Mediated Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*, 2016: 3808674.
224. Solberg LB, Stang E, Brorson SH, Andersson G, Reinholt FP. (2015) Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) co-localizes with receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1)-positive vesicles in rat osteoblasts and osteocytes. *Histochem Cell Biol*, 143: 195-207.
225. Sun W, Zhao C, Li Y, Wang L, Nie G, Peng J, Wang A, Zhang P, Tian W, Li Q, Song J, Wang C, Xu X, Tian Y, Zhao D, Xu Z, Zhong G, Han B, Ling S, Chang

- YZ, Li Y. (2016) Osteoclast-derived microRNA-containing exosomes selectively inhibit osteoblast activity. *Cell Discov*, 2: 16015.
226. Li D, Liu J, Guo B, Liang C, Dang L, Lu C, He X, Cheung HY, Xu L, Lu C, He B, Liu B, Shaikh AB, Li F, Wang L, Yang Z, Au DW, Peng S, Zhang Z, Zhang BT, Pan X, Qian A, Shang P, Xiao L, Jiang B, Wong CK, Xu J, Bian Z, Liang Z, Guo DA, Zhu H, Tan W, Lu A, Zhang G. (2016) Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation. *Nat Commun*, 7: 10872.
 227. Soekmadji C, Russell PJ, Nelson CC. (2013) Exosomes in prostate cancer: putting together the pieces of a puzzle. *Cancers (Basel)*, 5: 1522-1544.
 228. Inder KL, Ruelcke JE, Petelin L, Moon H, Choi E, Rae J, Blumenthal A, Hutmacher D, Saunders N. A, Stow JL, Parton RG, Hill MM. (2014) Cavin-1/PTRF alters prostate cancer cell-derived extracellular vesicle content and internalization to attenuate extracellular vesicle-mediated osteoclastogenesis and osteoblast proliferation. *J Extracell Vesicles*, 3:
 229. Raimondi L, De Luca A, Amodio N, Manno M, Raccosta S, Taverna S, Bellavia D, Naselli F, Fontana S, Schillaci O, Giardino R, Fini M, Tassone P, Santoro A, De Leo G, Giavaresi G, Alessandro R. (2015) Involvement of multiple myeloma cell-derived exosomes in osteoclast differentiation. *Oncotarget*, 6: 13772-13789.
 230. Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. (2005) Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*, 17: 879-887.
 231. Cloutier N, Pare A, Farndale RW, Schumacher HR, Nigrovic PA, Lacroix S, Boilard E. (2012) Platelets can enhance vascular permeability. *Blood*, 120: 1334-1343.
 232. Szekanecz Z. Klinikai Reumatológia, In Béla (szerk.) Klinikai Reumatológia Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 2005: 299-316.
 233. Kurko J, Besenyei T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z. (2013) Genetics of rheumatoid arthritis - a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*, 45: 170-179.
 234. Szodoray P, Szabo Z, Kapitany A, Gyetvai A, Lakos G, Szanto S, Szucs G, Szekanecz Z. (2010) Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in

- association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 9: 140-143.
235. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Menard H. A, Moreland L. W, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G. (2010) 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*, 62: 2569-2581.
 236. Cross M, Smith E, Hoy D, Carmona L, Wolfe F, Vos T, Williams B, Gabriel S, Lassere M, Johns N, Buchbinder R, Woolf A, March L. (2014) The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis*, 73: 1316-1322.
 237. Németh I, Buday I, Molnár É, Nyitrai M, Saáry K, Tarkovác A, Varsányi N, Farbaky Zs. (2008) Rheumatoid arthritises betegek nyaki gerinc-röntgenvizsgálatának jelentősége és módszere a mindennapi gyakorlatban. *Magyar Radiológia*, 82: 5-6.
 238. Szekanecz Z. A rheumatoid arthritis etiopatogeneze. In: Gömör B (szerk.), *Klinikai reumatológia*, Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 2005: 299-316.
 239. McInnes IB, Schett G. (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, 7: 429-442.
 240. Gyorgy B, Toth E, Tarcsa E, Falus A, Buzas EI. (2006) Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 38: 1662-1677.
 241. Peper SM, Lew R, Mikuls T, Brophy M, Rybin D, Wu H, O'Dell J. (2017) Rheumatoid Arthritis Treatment after Methotrexate: Triple Therapy is more Durable than Etanercept. *Arthritis Care Res (Hoboken)*,
 242. Kavanaugh A, Keystone E, Greenberg JD, Reed GW, Griffith JM, Friedman AW, Saunders KC, Ganguli A. (2017) Benefit of biologics initiation in moderate

- versus severe rheumatoid arthritis: evidence from a United States registry. *Rheumatology* (Oxford),
243. Ursini F, Naty S, Bruno C, Grembale RD. (2017) Old But Good: Modified-Release Prednisone in Rheumatoid Arthritis. *Rev Recent Clin Trials*,
 244. Szekanecz Z, Mesko B, Poliska S, Vancsa A, Szamosi S, Vegh E, Simkovics E, Laki J, Kurko J, Besenyei T, Mikecz K, Glant TT, Nagy L. (2013) Pharmacogenetics and pharmacogenomics in rheumatology. *Immunol Res*, 56: 325-333.
 245. Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H. (2006) Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis Rheum*, 54: 2665-2673.
 246. Zlatkovic-Svenda M, Kerimovic-Morina D, Stojanovic RM. (2013) Psoriatic arthritis classification criteria: Moll and Wright, ESSG and CASPAR -- a comparative study. *Acta Reumatol Port*, 38: 172-178.
 247. Mease PJ, Karki C, Palmer JB, Etzel CJ, Kavanaugh A, Ritchlin CT, Malley W, Herrera V, Tran M, Greenberg JD. (2017) Clinical Characteristics, Disease Activity, and Patient-Reported Outcomes in Psoriatic Arthritis Patients With Dactylitis or Enthesitis: Results From the Corrona Psoriatic Arthritis/Spondyloarthritis Registry. *Arthritis Care Res (Hoboken)*,
 248. Gossec L, Smolen JS, Ramiro S, de Wit M, Cutolo M, Dougados M, Emery P, Landewe R, Oliver S, Aletaha D, Betteridge N, Braun J, Burmester G, Canete JD, Damjanov N, Fitzgerald O, Haglund E, Helliwell P, Kvien T. K, Lories R, Luger T, Maccarone M, Marzo-Ortega H, McGonagle D, McInnes IB, Olivieri I, Pavelka K, Schett G, Sieper J, van den Bosch F, Veale DJ, Wollenhaupt J, Zink A, van der Heijde D. (2016) European League Against Rheumatism (EULAR) recommendations for the management of psoriatic arthritis with pharmacological therapies: 2015 update. *Ann Rheum Dis*, 75: 499-510.
 249. D'Angelo S, Tramontano G, Gilio M, Leccese P, Olivieri I. (2017) Review of the treatment of psoriatic arthritis with biological agents: choice of drug for initial therapy and switch therapy for non-responders. *Open Access Rheumatol*, 9: 21-28.

250. Kang EJ, Kavanaugh A. (2015) Psoriatic arthritis: latest treatments and their place in therapy. *Ther Adv Chronic Dis*, 6: 194-203.
251. Mc Ardle A, Flatley B, Pennington SR, Fitzgerald O. (2015) Early biomarkers of joint damage in rheumatoid and psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther*, 17: 141.
252. Veale D. J, Fearon U. (2015) What makes psoriatic and rheumatoid arthritis so different? *RMD Open*, 1: e000025.
253. Marton N, Kovacs OT, Baricza E, Kittel A, Gyori D, Mocsai A, Meier FMP, Goodyear CS, McInnes IB, Buzas EI, Nagy G. (2017) Extracellular vesicles regulate the human osteoclastogenesis: divergent roles in discrete inflammatory arthropathies. *Cell Mol Life Sci*, 74:3599-3611.
254. Sundstrom C, Nilsson K. (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*, 17: 565-577.
255. Jorgensen JH, Smith RF. (1973) Preparation, sensitivity, and specificity of Limulus lysate for endotoxin assay. *Appl Microbiol*, 26: 43-48.
256. Gyori D, Csete D, Benko S, Kulkarni S, Mandl P, Dobo-Nagy C, Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins PT, Mocsai A. (2014) The phosphoinositide 3-kinase isoform PI3Kbeta regulates osteoclast-mediated bone resorption in humans and mice. *Arthritis Rheumatol*, 66: 2210-2221.
257. Baranyai T, Herczeg K, Onodi Z, Voszka I, Modos K, Marton N, Nagy G, Mager I, Wood M. J, El Andaloussi S, Palinkas Z, Kumar V, Nagy P, Kittel A, Buzas EI, Ferdinandy P, Giricz Z. (2015) Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods. *PLoS One*, 10: e0145686.
258. Oliveira MC, Di Ceglie I, Arntz OJ, van den Berg WB, van den Hoogen FH, Ferreira AV, van Lent PL, van de Loo FA. (2017) Milk-Derived Nanoparticle Fraction Promotes the Formation of Small Osteoclasts But Reduces Bone Resorption. *J Cell Physiol*, 232: 225-233.
259. Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. (2013) Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond)*, 124: 423-441.
260. Helwa I, Cai J, Drewry MD, Zimmerman A, Dinkins M. B, Khaled M. L, Seremwe M, Dismuke WM, Bieberich E, Stamer WD, Hamrick MW, Liu Y.

- (2017) A Comparative Study of Serum Exosome Isolation Using Differential Ultracentrifugation and Three Commercial Reagents. *PLoS One*, 12: e0170628.
261. Ibsen SD, Wright J, Lewis JM, Kim S, Ko SY, Ong J, Manouchehri S, Vyas A, Akers J, Chen CC, Carter BS, Esener SC, Heller MJ. (2017) Rapid Isolation and Detection of Exosomes and Associated Biomarkers from Plasma. *ACS Nano*, 11: 6641-6651.
 262. Liu C, Guo J, Tian F, Yang N, Yan F, Ding Y, Wei J, Hu G, Nie G, Sun J. (2017) Field-Free Isolation of Exosomes from Extracellular Vesicles by Microfluidic Viscoelastic Flows. *ACS Nano*, 11: 6968-6976.
 263. Lorincz AM, Timar CI, Marosvari KA, Veres DS, Otrókoci L, Kittel A, Ligeti E. (2014) Effect of storage on physical and functional properties of extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes. *J Extracell Vesicles*, 3: 25465.
 264. Grigor'eva AE, Dyrkheeva NS, Bryzgunova OE, Tamkovich SN, Chelobanov BP, Ryabchikova EI. (2017) [Contamination of exosome preparations, isolated from biological fluids]. *Biomed Khim*, 63: 91-96.
 265. Sucur A, Jajic Z, Artukovic M, Matijasevic MI, Anic B, Flegar D, Markotic A, Kelava T, Ivcevic S, Kovacic N, Katavic V, Grcevic D. (2017) Chemokine signals are crucial for enhanced homing and differentiation of circulating osteoclast progenitor cells. *Arthritis Res Ther*, 19: 142.
 266. Juhasz P, Mester A, Biro A. J, Hejj G, Poor G. (2014) Clinical and radiological dissociation of anti-TNF plus methotrexate treatment in early rheumatoid arthritis in routine care: results from the ABRAB study. *BMC Musculoskeletal Disord*, 15: 251.
 267. Rossini M, Viapiana O, Adami S, Idolazzi L, Fracassi E, Gatti D. (2016) Focal bone involvement in inflammatory arthritis: the role of IL17. *Rheumatol Int*, 36: 469-482.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1. Az értekezéshez felhasznált közlemények listája

- **Marton N**, Kovács OT, Baricza E, Kittel Á, Győri D, Mócsai A, Meier FMP, Goodyear CS, McInnes IB, Buzás EI, Nagy G. (2017) Extracellular vesicles regulate the human osteoclastogenesis: divergent roles in discrete inflammatory arthropathies. Cell Mol Life Sci, 74:3599-3611.

IF: 5,788

- Baranyai T, Herczeg K, Onódi Z, Voszka I, Módos K, **Marton N**, Nagy G, Mäger I, Wood MJ, El Andaloussi S, Pálinkás Z, Kumar V, Nagy P, Kittel Á, Buzás EI, Ferdinandy P, Giricz Z. (2015) Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods. PLoS One, 10: e0145686.

IF: 3,057

Értekezéshez felhasznált közlemények kumulatív impakt faktora: **8,845**

Ebből elsőszerezős impakt faktor: **5,788**

11.2. Az értekezéshez fel nem használt cikkek listája

- Baricza E, Tamási V, **Marton N**, Buzás EI, Nagy G. (2016)
The emerging role of aryl hydrocarbon receptor in the activation and differentiation of Th17 cells. Cell Mol Life Sci, 73/1:95-117.
IF: 5,788

- **Marton N**, Kovács OT, Baricza E, Királyhidi P. (2016)
Vázrendszeri problémák. Élet és Tudomány, 38:1200-1202.

- Baricza E, **Marton N**, Királyhidi P, Kovács OT. (2016)
Régi ismerős új szerepben. Élet és Tudomány, 27:848-850.

- **Marton N**, Baricza E, Érsek B, Buzás EI, Nagy G. (2015)
The Emerging and Diverse Roles of Src-Like Adaptor Proteins in Health and Disease. Mediators Inflamm, 2015: 952536.
IF: 3,418

- **Marton N**, Marcsa B, Pap I, Szikossy I, Karlinger K, Törő A, Törő K. (2015)
Forensic Evaluation of Crania Exhibiting Evidence of Sharp Force Trauma Recovered from Archaeological Excavations. Austin J Forensic Sci Criminol, 2/2: 1016.

- Kovács OT, Mong N, **Marton N**, Buzás EI, Nagy G. (2015)
Az antitestek új generációja: a bispecifikus antitestek. Immunológiai Szemle, 7/4: 13-19.

- **Marton N**. (2014)
A reumatoid artritisz kutatása. Immunológiai tényezők és csonteróziók. Élet és Tudomány, 20:621-623.

- **Marton N**, Géher P, Buzás EI, Nagy G. (2012)
Az osteoclastok aktivitásának humorális és farmakológiai szabályozása.
Immunológiai Szemle, 4/2: 11-15.
- **Marton N**, Marcsa B, Pap I, Szikossy I, Karlinger K, Fehér Sz, Törő K. (2011)
Koponyasérülések igazságügyi orvostani értékelése régészeti ásatások során feltárt koponyákon. Medicus Universalis, 44/4: 177- 182.
- Marcsa B, **Marton N**, Dunay G, Törő K. (2011)
Tömegközlekedési eszközök okozta halálos kimenetelű gyalogos balesetek Budapest területén (1994-2008). Medicus Universalis, 44/3: 139-144.

Összes közlemény kumulatív impakt faktora: **18,051**.

Ebből elsőszerzős impakt faktor: **9,206**.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Legfőképp köszönöm dr. Nagy Györgynek az elmúlt 7 év közös munkáját, a sok-sok támogatást és ösztönzést, valamint a lehetőséget, hogy előbb tudományos diákkörös, majd PhD hallgatóként részt vehettem projektjeiben. Dr. Nagy György minden pályázatomban, hazai és külföldi konferenciákon való szereplésemben, tanulmányi útjaim megszervezésében kimagaslóan támogatott, lehetővé tette humán biológiai minták beszerzését, emellett még a legextrémebb időpontokban is elérhető volt és készséggel segített, amikor kérdéssel fordultam felé.

Kiemelten köszönöm prof. Buzás Editnek, a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt, és Immunbiológiai Intézet igazgatójának a sok jó ötletet és észrevételt, amivel munkámat segítette, valamint, hogy támogatta PhD hallgatói pályafutásomat. Köszönöm emellett prof. Falus Andrásnak, az SE GSI Intézet korábbi igazgatójának, hogy lehetővé tette, hogy diákkörös hallgatóként tanulhassak, becsatlakozhassak a tudományos munkába valamint, hogy cikkírára ösztönzött.

Hálás vagyok munkacsoportunk tagjainak: Baricza Eszternek, dr. Kovács Orsolya Tündének és Királyhidi Pannának az együttműködésért, a jókedvű konferenciákért. Orsolyának külön köszönöm, hogy diákkörös hallgatómként részt vett a mérésekben, Eszternek, hogy sok-sok adminisztrációs dologban segített.

Köszönöm dr. Molnár-Érsek Barbarának, dr. Molnár Viktornak és Pálóczi Krisztinának, hogy megtanították nekem a laboratóriumi munka alapjait, hasznos ötletekkel láttak el.

Nagyon köszönöm dr. Baranyai Tamásnak és dr. Giricz Zoltánnak, hogy részt vehettem a munkájukban.

Köszönöm prof. Mócsai Attilának és dr. Győri Dávidnak, hogy beavattak az oszteoklaszt differenciáltatás rejtjelmeibe, valamint mindig készségesen segítettek, amikor kérdéssel fordultam feléjük.

Köszönöm prof. Iain McInnesnek, hogy lehetővé tette, hogy EULAR ösztöndíjam keretében az általa igazgatott intézetben (Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow) végezhessek kutatómunkát. Dr. Carl Goodyearnek, hogy részt vehettem munkacsoportja életében. Florian Meiernek a mintagyűjtést, illetve mindhármuknak az értékes észrevételeket, amivel munkámat segítették.

Köszönettel tartozom dr. Kittel Ágnesnek az elektronmikroszkópiás felvételekért, dr. Drahos Lászlónak és dr. Turiák Lillának a tömegspektrometriás vizsgálatokért.

Továbbá köszönöm az SE GSI Intézet összes dolgozójának (kiemelten Bencsik Andrásnak, dr. Kutszegi Nórának és Lupsa Nikolettnek), hogy segítették munkámat, illetve jó hangulatban teltek a közösen töltött évek.

Emellett köszönöm dr. Törő Klárának, korábbi tudományos diákkörös témavezetőmnek a munkáját, hogy lehetővé tette és ösztönözte elsőéves orvostanhallgató koromtól kezdve diákkörös kutatásomat. Köszönöm dr. Marcsa Boglárkának a közös TDK munkát.

Valamint köszönöm dr. Bohák Ágnesnek, jelenlegi főnökömnek a lehetőséget, hogy elengedett konferenciákra, támogatott doktori értekezésem írásában.

A végezetül pedig nagyon hálás vagyok családom ösztönzéséért, köszönöm édesanyámnak, édesapámnak, nagyszüleimnek, a sok-sok lelki és anyagi támogatást, amivel segítették kutatói pályafutásomat.