

A több évtizedes testedzés hatása a humán vérből izolált extracelluláris vezikulák tartalmára

Doktori értekezés

György Bernadett

Magyar Testnevelési és Sporttudományi Egyetem
Sporttudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Koltai Erika tudományos főmunkatárs, PhD

Hivatalos bírálók: Dr. Martos Éva c. egyetemi tanár, CSc

Dr. Vannay Ádám tudományos főmunkatárs, PhD

Budapest

2025

Tartalom

Rövidítésjegyzék	4
Ábrajegyzék	6
Táblázatok jegyzéke	8
1. Bevezetés, irodalmi áttekintés	9
1.1. Extracelluláris vezikulák általános jellemzése és típusai	9
1.2. Extracelluláris vezikulák izolálása, detektálási módszerei	11
1.2.1. Izolálás	11
1.2.2. Detektálási módszerek, analízis	12
1.2.3. Extracelluláris vezikulák tömegspektrometriás vizsgálata	13
1.3. Extracelluláris vezikulák biológiai funkciói és terápiás lehetőségei	14
1.4. Az extracelluláris vezikulák és a testmozgás kapcsolata	16
1.5. A hosszútávú testedzés hatása a szervezetre	17
1.5.1. A hosszútávú testedzés hatása az öregedési folyamatokra	19
1.6. Az epigenetika	21
1.6.1. A DNS-metiláció szerepe	23
1.6.2. Az epigenetikai órák	24
2. Célkitűzések	26
3. Anyag és módszer	28
3.1. Vizsgálat alanyai	28
3.2. Terhelésélettani, antropometriai és kognitív vizsgálatok	30
3.3. Vérvétel, biokémiai és hematológiai paraméterek vizsgálata	31
3.4. DNS izolálás, metilációs vizsgálatok, epigenetikai órák	32
3.5. A trombocita-mentes plazma preanalitikai vizsgálata	33
3.6. A kis méretű extracelluláris vezikulák izolálásának lépései	34
3.7. A kis méretű extracelluláris vezikulák jelenlétének validálási módszerei	36
3.7.1. A részecskeszám meghatározása nanorészecske-nyomkövetéses analízissel	36
3.7.2. Spektrofotometria	37
3.7.3. Western blot	37
3.7.4. Transzmissziós elektronmikroszkópia	38

3.8. Tömegspektrometriás vizsgálatok	40
3.9. Statisztikai analízis	40
3.10. EV-Track	41
4. Eredmények	45
4.1. A trombocita-mentes plazma preanalitikai vizsgálatának eredményei.....	45
4.2. Metodikai protokoll beállítási és validálási eredményei.....	46
4.2.1. A 35 nm-es és 70 nm-es oszlopokon izolált kis méretű extracelluláris vezikulák karakterizálása	46
4.2.2. A 70 nm-es oszlopon friss és fagyasztott trombocita-mentes plazmából izolált kis méretű extracelluláris vezikulák karakterizálása	55
4.3. Az edzettség mértékének hatása a vezikulákra	58
4.3.1. Az izolált kis méretű extracelluláris vezikulák analízise metodikai megfelelőség szempontjából	60
4.3.2. Az izolált kis méretű extracelluláris vezikulákban található fehérjék tömegspektrometriás analízisének eredményei	66
5. Megbeszélés	75
5.1. A metodikai protokoll beállításának és validálásának megbeszélése	75
5.1.1. Trombocita-mentes plazma preanalitikai eredményének megbeszélése.....	75
5.1.2. A 35 nm-es és 70nm-es oszlopokon izolált kis méretű extracelluláris vezikulák mennyiségi és minőségi elemzésének a megbeszélése.....	76
5.1.3. A 70nm-es oszlopon a fagyasztott és friss trombocita-mentes plazma mintákból izolált kis méretű extracelluláris vezikulák mennyiségi és minőségi elemzésének a megbeszélése.....	79
5.1.4. A korlátozó tényezők megbeszélése	80
5.2. Az eltérő edzettségi szintű csoportok eredményeinek megbeszélése	80
5.2.1. Az izolált kis méretű extracelluláris vezikulák karakterizálásának megbeszélése	81
5.2.2. A kis méretű extracelluláris vezikula minták proteomikai eredményeinek és az öregedésnek a kapcsolata.....	82
5.2.3. A kis méretű extracelluláris vezikula minták proteomikai eredményeinek és a szervezet szabályozási folyamatainak kapcsolata	83
5.2.4. A kis méretű extracelluláris vezikula minták proteomikai eredményeinek és a fizikai aktivitásnak a kapcsolata.....	84
5.2.5. A korlátozó tényezők megbeszélése	86

6. Következtetések	87
6.1. Új tudományos eredmények és gyakorlati használhatóság.....	90
7. Összefoglalás	92
8. Summary	93
9. Irodalomjegyzék	94
10. Saját publikációk jegyzéke	118
11. Köszönetnyilvánítás.....	119
Függelék.....	121

Rövidítésjegyzék

AFM	Atomic force microscopy – Atomi erő mikroszkópia
AIM	Apoptosis inhibitor of macrophage – Apoptózist gátló makrofág faktor
ATP	Adenosine triphosphate – Adenozin-5'-trifoszfát
BMI	Body mass index – Testtömegindex
CA	Cellulose acetate – Cellulóz-acetát
C4BPA	C4b-binding protein alpha-chain – C4b kötőfehérje alfa-láncának
CHD	Coronary heart disease – Szívkoszorúér-betegség
CKD	Chronic kidney disease – Krónikus vesebetegség
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 – Citotoxikus T-limfocita antigén 4
CVD	Cardiovascular diseases – Kardiovaszkuláris betegségek
DC	Dendritic cell – Dendritikus sejt
DNMT	DNA methyltransferase – DNS-metiltranszferáz
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay –Enzimhez kötött immunszorbens assay
EV	Extracellular vesicle – Extracelluláris vezikula
FCM	Flow cytometry – Áramlási citometria
FLS	Fibroblast-like synoviocytes – Fibroblaszt-szerű szinoviociták
FSC	Forward scatter –Előre irányú fényszórás
GAD65	Glutamate decarboxylase 65 – Glutamát-dekarboxiláz 65
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase – Gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
GO	Gene Ontology – Génontológia
HDL	High-density lipoprotein – Nagy sűrűségű lipoprotein
ISEV	The International Society for Extracellular Vesicles – Extracelluláris Vezikulák Nemzetközi Társasága
ISTH	International Society on Thrombosis and Haemostasis – Nemzetközi Trombózis és Hemosztázis Társaság

LTL	Leukocyte telomere length – Leukocita telomerhossz
LDL	Low-density lipoprotein – Alacsony sűrűségű lipoprotein
mEV	Medium extracellular vesicle –Közepes méretű extracelluláris vezikula
MS	Mass spectrometry –Tömegspektrometria
NCDs	Noncommunicable diseases – Nem fertőző betegségek
NK-sejtek	Natural killer cells– Természetes ölósejt
NTA	Nanoparticle tracking analysis – Nanorészecske-nyomkövetéses analízis
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma – Hasnyálmirigy duktális adenokarcinóma
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1 – Programozott sejthalál ligandum 1
PEG	Polyethylene glycol – Polietilénlikol
PFP	Platelet-free plasma – Trombocita-mentes plazma
PLP	Plasma lipoprotein particles – Plazma lipoprotein részecske
PPP	Platelet-poor plasma – Trombocita-szegény plazma
PSEA	Protein Set Enrichment Analysis –Fehérjekészlet-gazdagodási elemzés
RA	Rheumatoid Arthritis – Reumatoid arthritis
ROS	Reactive oxygen species – Reaktív oxigén származékok
sEV	Small extracellular vesicle – Kis méretű extracelluláris vezikula
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis – Nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis
SEC	Size Exclusion Chromatography – Méretkizárásos kromatográfia
SSC	Side Scatter – Oldal irányú fényszórás
T1D	Type 1 diabetes – Egyes típusú cukorbetegség
T2D	Type 2 diabetes – Kettes típusú cukorbetegség
TEM	Transmission electron microscopy – Transzmissziós elektronmikroszkópia
UC	Ultracentrifuge – Ultracentrifuga
WB	Western blot

Ábrajegyzék

1. ábra: A mintavételi csövekből végzett vizsgálatok sematikus ábrázolása	33
2. ábra: sEV izolálás lépéseinek sematikus ábrázolása	36
3. ábra: A módszertan kidolgozásához és validálásához tartozó mintaszámok eloszlásának sematikus ábrázolása	43
4. ábra: A funkcionális vizsgálatokhoz tartozó mintaszámok eloszlásának sematikus ábrázolása a metodikai soron levezetve.....	44
5. ábra: A SEC-oszlopokon (35 nm: 1–3. frakció; 70 nm: 2–4. frakció) elválasztott sEV-k karakterizálása.	47
6. ábra: A 35 nm-es (kék) és a 70 nm-es (rózsaszín) oszlopon SEC módszerrel izolált sEV-k karakterizálása.	48
7. ábra: A 35 nm-es (1-4 frakció) és 70 nm-es (2-5 frakció) oszlopokon izolált sEV-kben az (A) albumin, a (B) nehézláncú immunglobulinok és a könnyűláncú immunglobulinok WB-eredményei	49
8. ábra: SEC módszerrel izolált sEV-k „vezikuláris” fehérjéinek tömegspektrometriás adatelemzése 35 nm-es (kék) és 70 nm-es (rózsaszín) oszloponról.	50
9. ábra: SEC módszerrel izolált sEV-k „PLP” fehérjéinek tömegspektrometriás adatelemzése 35 nm-es (kék) és 70 nm-es (rózsaszín) oszloponról.	51
10. ábra: A „vezikuláris” fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatok klaszterelemzése... 52	
11. ábra: SEC izolált sEV-k „nem-vezikuláris” fehérjéi: tömegspektrometriás adatelemzés 35 nm (kék) és 70 nm (rózsaszín) oszloponról.	53
12. ábra: Albumin és immunglobulin aránya az összes fehérjéhez képest 35 nm (kék) és 70 nm (rózsaszín) oszlopokon.....	54
13. ábra: (A) Venn-diagram, valamint (B) a mintákban nagyobb mennyiségben előforduló, lehetséges „vezikuláris” fehérjék száma az egyéni listák alapján.	55
14. ábra: A SEC 70 nm-es oszlopról izolált sEV-k karakterizálásának átlag eredményei fagyasztott (narancssárga) és friss (sárga) PFP-minták esetén.....	56
15. ábra: A SEC 70 nm-es oszlopról izolált sEV-k karakterizálása (B, D, F) friss és (A, C, E) fagyasztott PFP esetében egyaránt.	57
16. ábra: A SEC 70 nm-es oszlopról izolált sEV-k MS-adatainak elemzése fagyasztott (narancssárga) és friss (sárga) PFP-mintákban.....	58
17. ábra: A High-fit (piros) és a Med-Low-fit (zöld) csoportokból izolált sEV minták elemzése.....	62
18. ábra: A High-fit és a Med-Low-fit csoportokból izolált sEV minták vezikula markereinek elemzése.....	63
19. ábra: A vizsgált fehérjék sejtszintű eloszlását mutató GO analízis eredményei.	64
20. ábra: A kizárólag (A) High-fit egyénekben kimutatott fehérjék, és (B) a DNAmFitAge-akcelerációhoz (AgeAccelFit) kapcsolódó fehérjék dúsulási elemzése 65	
21. ábra: A fehérje MS normalizált intenzitásváltozói és a fiziológiai markerek közötti korrelációt ábrázoló hő térkép.	67

22. ábra: Összefüggés a biológiai öregedés becslőjével, a DNAmFitAge-akcelerációval (években ábrázolva), és a normalizált log ₂ -transzformált fehérje-mennyiségekkel.	68
23. ábra: Az MS-el kimutatott vezikuláris fehérjék jellemzői.	69
24. ábra: A (A, B) DNAmFitAge-akcelerációhoz (AgeAccelFit) kapcsolódó fehérjék dúsulási elemzése	70
25. ábra: High-fit egyéneknél kimutatott fehérjék dúsulási elemzése (A, B)	71
26. ábra: Hőtérkép, amely a fehérje MS normalizált intenzitásváltozók és az életmódbeli markerek közötti korrelációt ábrázolja.	73

Táblázatok jegyzéke

1. táblázat: Western blot során használt antitestek	38
2. táblázat: High-fit és Med-Low-fit alanyok terhelésélettani, antropometriai és kognitív eredményeinek átlagértékei és szórásai statisztikai különbségekkel	60
3. táblázat: Egy vagy több High-fit alanyban mintáiban detektált fehérjék.....	72

1. Bevezetés, irodalmi áttekintés

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) a sejtek közötti kommunikáció kulcsszereplőiként az elmúlt évtizedekben az egészségtudományi kutatások fókuszába kerültek. Szerepük az egészséges élettani folyamatoktól kezdve a különféle kóros állapotok kialakulásáig egyre szélesebb körben ismertek. Az EV-k molekuláris jellemzői és felszabadulásuk módja sejtípusonként és szövetenként eltérő, ami megalapozza alkalmazásukat diagnosztikai biomarkerekként és potenciális terápiai célpontként.

A disszertáció célja, hogy átfogó képet nyújtson az EV-k humán mintákon történő vizsgálatának két kulcsterületéről. Az első rész az EV-k izolálásához és jellemzéséhez kapcsolódó módszertani megközelítéseket tekinti át, különös figyelemmel a humán biológiai mintákból történő megbízható kinyerés kihívásaira. A második rész a testedzés vezikulákra gyakorolt hatásának vizsgálatára fókuszál, különös tekintettel a molekuláris összetételének változásaira és azok élettani jelentőségére.

Ez a két kutatási irány szorosan összefonódik: a pontos metodikai alapok elengedhetetlenek a releváns funkcionális következtetések levonásához. A következő irodalmi áttekintés célja, hogy ezen két aspektust rendszerezve mutassa be az EV-k kutatásának jelenlegi állását, és megágyazzon a disszertáció saját eredményeinek értelmezéséhez.

1.1. Extracelluláris vezikulák általános jellemzése és típusai

Az EV-k felfedezése a fokozatos tudományos fejlődés eredményének köszönhető, hiszen körülbelül az 1996-os évig még sejtörmelékként, szennyeződésként hivatkoztak rájuk, azóta azonban már tudjuk, hogy membránnal körülvett struktúrákról van szó. Még ebben az évben Raposo és mtsai publikálták úttörő tanulmányukat a vezikulák antigén prezentáló hatásáról (Raposo és mtsai 1996). Ezután a figyelem egyre jobban rájuk irányult, és a vizsgálatoknak köszönhetően egyértelművé vált, hogy funkcionális fehérjék

mellett nukleinsavak szállítását is végzik. Mára már elmondható, hogy a vezikulák különböző típusai kulcsszerepet játszanak a sejtek közötti kommunikációban, és a biológiai folyamatok szabályozásában (Rai és mtsai 2024).

Az EV-k minden sejtípusban jelen vannak, morfológiájukat tekintve kettős foszfolipid membránnal határolt, hólyagszerű struktúrák (Yáñez-Mó és mtsai 2015, Zaborowski és mtsai 2015). Méretük általában 50-1000 nm között változik. Jelentős mennyiségben található meg különböző biológiai folyadékokban, mint például a vér, a nyál, a vizelet vagy az anyatej. Számos biológiai molekulát, például fehérjéket, nukleinsavakat és lipideket tartalmaznak, amelyek alapvető szerepet játszanak a sejtek közötti kommunikációban (Bebelman és mtsai 2018, Doyle és Wang 2019). Az EV-k felszínén előforduló fehérjék közé tartoznak a CD9, CD63 és CD81 tetraspanin család tagjai, amelyeket vezikula markerekként tartunk számon (Jankovicova és mtsai 2020), rajtuk kívül az EV-k további adhéziós, transzport és hősokek fehérjéket is hordozhatnak (Alix, TSG-101, flotillin-1, HSP-70) (Théry és mtsai 2018, Welsh és mtsai 2024). A fehérje korona egy több biomolekulából, főként fehérjékből álló komplex, amely nanoméretű részecskékhez, például exoszómákhoz és egyéb nanorészecskékhez kapcsolódik (Heidarzadeh és mtsai 2023). Tóth és mtsai-nak tanulmányuk során (Tóth és mtsai 2021) mindamelllett, hogy bizonyítékot találtak a vezikuláris fehérjekorona kialakulására, munkájuk továbbá rávilágított az EV-k felszíni kölcsönhatásainak eddig nem ismert dimenzióira is.

Az EV-k biogenezisük alapján két fő típusra oszthatók: exoszómákra és ektoszómákra. Az exoszómák endoszomális eredetűek, vagyis a sejten belüli endoszómákból képződnek, míg az ektoszómák közvetlenül a plazmamembránból származnak. Méretük szerint az EV-k tovább kategorizálhatóak. A kis méretű extracelluláris vezikulák (small EVs - sEV-k) általában 50-150 nm átmérőjűek. Ezen kívül a sejtek közepes méretű EV-eket (medium EVs - mEV-k) is kibocsátanak, amelyek mérete 200-800 nm között változik, valamint nagy EV-eket, amelyek átmérője 1000 nm vagy annál nagyobb is lehet (Buzas 2023).

Jelen tanulmányunk nem arra irányult, hogy kifejezetten a biogenezisük alapján azonosítsuk az exoszómákat, ezért nem tudjuk pontosan, hogy az általunk vizsgált sEV-k hány százaléka volt exoszóma, ektoszóma vagy más típusú vezikula (Buzas 2023).

Ezért a legpontosabbnak találtuk, ha az Extracelluláris Vezikulák Nemzetközi Társasága (International Society for Extracellular Vesicles – ISEV) által kiadott MISEV2023 (Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles) irányelveket követve az 50-150 nm méretű vezikulákat sEV-ként hívjuk, amely lényegében gyűjtőfogalom ezekre a vezikulákra, függetlenül a biogenezisüktől (Welsh és mtsai 2024), így a továbbiakban eszerint hivatkozom majd rájuk.

1.2. Extracelluláris vezikulák izolálása, detektálási módszerei

Még nincs egységesen kialakult konszenzus a különböző méretű EV-k izolálásával és analizisével kapcsolatban, de az ISEV alapos munkát végez azért, hogy a megfelelő iránymutatásokkal lássa el a kutatókat (Théry és mtsai 2018, Welsh és mtsai 2024). Az ISEV által közzétett iránymutatások továbbá rámutatnak, és próbálnak segítséget nyújtani azokhoz a kihívásokhoz, amelyekkel a vizsgálatok során szembesülhetünk. Ilyen nehézség például a humán plazmából izolált vezikulák tisztítása a különböző lipoproteinektől, amelyek jelentősen zavarhatják az izolálás és a karakterizálás folyamatát (Sódar és mtsai 2016). A kihívást tovább növeli az EV-k apró mérete, a méret- és összetételbeli változatosságuk, az univerzális azonosítási módszerek hiánya, valamint a legtöbb mérési technika EV-specifikusságának korlátai. Emiatt egyetlen mérési technika sem elegendő az EV-k teljeskörű vizsgálatához, így olyan kiegészítő, egymástól független módszerek alkalmazása ajánlott, amelyek különböző mérési szempontokat biztosítanak (Welsh és mtsai 2024).

1.2.1. Izolálás

A leggyakrabban használt izolálási módszerek közé tartozik a differenciálcentrifugálás, a sűrűséggradiens centrifugálás és a méretkizárásos kromatográfia (Size Exclusion Chromatography - SEC). A SEC egy kíméletes és hatékony módszer az EV-k méret szerinti izolálására és tisztítására, melyhez leggyakrabban a kereskedelemben kapható oszlopokat használják (pl.: Izon qEV original

SEC oszlopok). Maga a módszer különböző pórusméretű gyantával töltött oszlopokkal valósítható meg, amelyek a nanorészecskéket méretük alapján választják el, így a mátrix pórusméreténél nagyobb vezikulák hatékonyan eluálnak az oszlopról a kisebb szennyezőkkel, például fehérjékkel és lipoproteinekkal szemben, miközben megőrzik biológiai integritásukat (Xu és mtsai 2016, Sidhom és mtsai 2020, Turner és mtsai 2022). A polietilén-glikol (PEG) kicsapást is használják EV-k izolálására, és bár hatékony az sEV-k szeparálásában, azonban gyakran együtt izolál olyan szennyeződések, például lipoproteineket, ami alacsonyabb tisztaságot eredményez, mint más módszerek (pl.: SEC, sűrűséggradiens centrifugálás). A PEG továbbá elnyomhatja a fontos peptidok ionizációját, növelheti a háttérzajt és ezáltal zavarhatja az adatelemzést, ezért proteomikai vizsgálatra szánt minták esetén nem ajánlott módszer (Keller és mtsai 2008, Rider és mtsai 2016, Ludwig és mtsai 2018, Pavani és mtsai 2020).

1.2.2. Detektálási módszerek, analízis

Következő lényegi lépés az izolált vezikuláris tartalmú minták detektálása, analízise. Ehhez a fentebb is hivatkozott, az ISEV által közzétett MISEV2018 és MISEV2023 iránymutatásokat vettük alapul. Morfológiai vizsgálatok közül leggyakrabban az olyan nagy felbontású képalkotó eljárásokat alkalmazzák, mint a transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM), ahol az izolált EV-k méretéről, alakjáról kaphatunk pontosabb képet. Amennyiben a mintákat specifikus antitestekkel immunjelöljük, úgy a TEM módszert alkalmazva még pontosabban tudjuk beazonosítani az EV-ket (Corona és mtsai 2023). Az atomi erőmikroszkópia (AFM) olyan technika, amely rendkívül részletes, szinte atomi szintű képet ad a biológiai felszínekről. Ezzel a módszerrel megvizsgálhatóak a sejtek, biológiai molekulák és vezikulák szerkezetei, kémiai összetételük és fizikai tulajdonságaik is (Sharma és mtsai 2011, Parisse és mtsai 2017, Skliar és mtsai 2019). Az EV-k fizikai és kémiai jellemzőinek vizsgálatához olyan kvantitatív vagy szemikvantitatív módszereket alkalmaznak, mint például a nanorészecske-nyomkövetéses analízis (NTA), az áramlási citometria (Flow cytometry – FCM), Western blot (WB) vagy az enzimhez kötött immunszorbens assay (ELISA) módszer. Az NTA módszer segítségével megadhatjuk a vezikulák koncentrációját

partikula/ml mértékegységben, továbbá a méreteket is nanométerben kifejezve (Carnell-Morris és mtsai 2017). FCM módszer lehetővé teszi másodpercenként akár több ezer részecske különböző paramétereinek egyidejű meghatározását. Ez különösen alkalmas teszi a módszert az EV-k mennyiségi, illetve minőségi vizsgálatára (Lässer és mtsai 2012, Erdbrügger és Lannigan 2016, Morales-Kastresana és Jones 2017). Az EV-mintában található teljes fehérjemennyiség többféle módszerrel is meghatározható, például kolorimetriás, illetve fluorometriás vizsgálatokkal, nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE), vagy abszorbancia méréssel (pl.: NanoDrop készüléken). Ezek a módszerek mind különböző mértékű érzékenységet és pontosságot kínálnak, így a megfelelő eljárás kiválasztása attól függ, milyen részletességű mérés szükséges (Vergauwen és mtsai 2017).

Az EV-k izolálását és detektálását legtöbbször azért végzik a kutatók, hogy utána a molekuláris tartalmukat vizsgálhassák tovább. Természetesen a mai napig jelennek meg metodikai publikációk és magával a vezikulák struktúrájával foglalkozó kutatások, de ettől függetlenül számos esetben valóban azt szeretnék jobban megvizsgálni a kutatók, hogy mi rejlik például a terápiás lehetőségeikben. Az EV-k molekuláris profilja tehát nemcsak az alapkutatásban, hanem biomarkerek azonosításában és terápiás célpontok fejlesztésében is fontos szerepet játszik. Ehhez leggyakrabban proteomikai, lipidomikai vagy RNS-analízist használnak (Rontogianni és mtsai 2019, Fischer és Deindl 2021, Lischnig és mtsai 2022, Sun és mtsai 2022).

1.2.3. Extracelluláris vezikulák tömegspektrometriás vizsgálata

Az EV-kben található fehérjék vizsgálatához az egyik legelterjedtebb módszer a tömegspektrometria (MS), mivel magas érzékenységgel és felbontóképességgel rendelkezik. A technika az ionizált részecskék tömegének és töltésének arányát (m/z) méri, hogy azonosítsa és kvantifikálja az összetevőket. A folyamat során az anyag molekulái ionizálódnak, majd egy mágneses vagy elektromos tér segítségével szétválasztják őket tömegük alapján. A szétválasztás után a detektor rögzíti az ionok tömeg-töltés arányát és intenzitását, amelyből tömegspektrum készül, lehetővé téve a

molekulák azonosítását, szerkezetük meghatározását és mennyiségi elemzésüket (Pocsfalvi és mtsai 2016).

Az EV-k proteomikai elemzése így mára kulcsfontosságú eszközzé vált az általuk közvetített biológiai funkciók és mechanizmusok feltárásában, mivel lehetővé teszi komplex fehérjeösszetételük és biogenezisük vizsgálatát. Számos proteomikai tanulmány feltárta a különböző sejttípusok által, eltérő körülmények között felszabadított EV-k fehérjeprofilióját, mellyel jelentősen hozzájárultak az EV-k biológiai szerepének megértéséhez (Greening és mtsai 2017, Mallia és mtsai 2020, Lim és mtsai 2021). Ezek közé a tanulmányok közé tartozik például a veseátültetés hatásának vizsgálata a vizeletben található EV-k összetételére (Braun és mtsai 2020), továbbá annak a lehetősége, hogy a transzplantáció során felszabaduló donor-specifikus exoszómák elemzése biomarker platformként szolgáljon a kilökődés monitorozására (Vallabhajosyula és mtsai 2017). Ezen túlmenően, a plazma exoszómák proteomikai elemzése HIV-fertőzött betegek esetében, valamint ezek immunológiai válasz- és oxidatív stresszmarkerekkel való összefüggésének vizsgálata jelentős előrelépést képvisel (Chettimada és mtsai 2018). Továbbá, a proteomikai eredmények ígéretes jelölt markereket azonosítanak mind a hasnyálmirigy duktális adenokarcinómájából (PDAC), mind az egészséges kontroll organoidokból származó EV populációkban, amelyek a tumorigén és egészséges állapotok eltérő jellemzőit tükrözik (Buenafe és mtsai 2022).

1.3. Extracelluláris vezikulák biológiai funkciói és terápiás lehetőségei

Az EV-k kiemelkedő szerepet töltenek be mind az egészséges, mind a kóros folyamatokban. Hozzájárulnak az immunrendszer szabályozásához, a szövetek regenerálásához, valamint a daganatok kialakulásához és előrehaladásához. Sokoldalú funkcióik miatt különösen fontosak a sejtek közötti kommunikációban, és a betegségek kialakulásának mechanizmusában. Az EV-k kutatása az elmúlt években egyre nagyobb figyelmet kapott, és számos bizonyíték támasztja alá, hogy jelentős potenciállal bírnak mind a diagnosztika, mind a terápia területén (Kodam és Ullah 2021, Kumar és mtsai 2024).

Terápiás lehetőségeiket tekintve képesek megváltoztatni a befogadó sejtek viselkedését azáltal, hogy bioaktív molekulákat juttatnak el hozzájuk. Az adott sejttípus által kibocsátott EV-k működhetnek egy specifikus mikro környezetben, de képesek távoli hatásokat is kiváltani. A sejtek közötti információcsere gyakran kétirányú, mivel az EV-k mind a származási sejt, mind a célsejt számára információt hordoznak. Mivel az EV-k tartalmazzák a származási sejt jellemző molekuláit, potenciálisan biomarkerként is alkalmazhatók (Tetta és mtsai 2013). A gyógyszerhordozásban is ígéretes szerepük van, mivel természetes membránjuknak köszönhetően stabil, jól tolerált rendszerek, amelyekeken keresztül specifikus gyógyszereket, mint például kemoterápiás szereket vagy genetikai terápiás anyagokat (mRNS, siRNS) közvetlenül célba lehet juttatni (Pedrioli és mtsai 2021, Uddin és mtsai 2024). Felszínükön számos olyan molekulát azonosítottak, amelyek szerepet játszanak az immunszabályozásban. Ezek közé tartoznak az immun "checkpoint" molekulák, mint a citotoxikus T-limfocita antigén 4 (CTLA-4) és a programozott sejthalál ligandum 1 (PD-L1), az apoptózist indukáló FASL ligandum (más néven CD95L), valamint a CD39 és CD73 ektoenzimek, amelyek adenzin-5'-trifoszfátból (ATP-ből) immunszuppresszív adenzint termelnek (Hofmann és mtsai 2020, Buzas 2023). A tumorból származó EV-k szabályozzák az immunsejtek, így a dendritikus sejtek (DC-k), CD8⁺ T-sejtek, CD4⁺ T-sejtek, makrofágok és természetes ölüsejtek (NK-sejtek) differenciálódását, érését, proliferációját és működését, hozzájárulva ezzel a melanoma progressziójának szabályozásához. Gyógyszerhordozó eszközként működhetnek az immunsejtek számára, szerepet játszhatnak a neoantigén alapú tumorvakcinák fejlesztésében, és részt vehetnek az immun „checkpoint” blokkoló terápia szabályozásában (Zhou és mtsai 2022). Az EV-k fontos szerepet játszanak a reumatoid arthritis (RA) patogenezisében az immunkomplexek képződésében, az antigén prezentációban, a mikroRNS-ek szállításában, a fibroblaszt-szerű szinovociták (FLS) aktiválásában és az extracelluláris mátrix lebontásában. Az FLS-ből származó EV-k citrullinált fehérjéket, például apoptózist gátló makrofág faktort (AIM-et) tartalmaznak, amelyek elősegítik az immunkomplexek kialakulását, és kimutatták, hogy a komplementrendszer kulcsszerepet játszik az RA-ban (Skriner és mtsai 2006, Cloutier és mtsai 2013, Jeon és mtsai 2019). Az egyes típusú cukorbetegség (T1D) esetén proinflammatorikus faktorok hatására a hasnyálmirigy β -sejtjei exoszómákat szabadítanak fel, amelyek elősegítik a környező sejtek apoptózisát és súlyosbítják a

gyulladást. Az exoszómák szerepet játszanak a szigetsejtek autoimmun válaszáinak elindításában azáltal, hogy autoantigéneket, például Glutamát-dekarboxiláz 65-öt (GAD65-öt) és proinzulint tartalmaznak, amelyek aktivált DC-eket vesznek fel, ezáltal aktiválva az autoreaktív T- és B-sejteket. Az exoszómák így nemcsak a T1D patogenezisében vesznek részt, hanem ígéretes diagnosztikai markerek is lehetnek (Cianciaruso és mtsai 2017). A kórokozókkal fertőzött sejtek, valamint más beteg sejtek által kibocsátott EV-k olyan változásokat idézhetnek elő a sejtek működésében, amelyek hozzájárulhatnak daganatok kialakulásához, immunszuppresszióhoz és szövetkárosodáshoz, különösen szepszis esetén. Továbbá, kimutatták, hogy a szepszisben szenvedő betegek aktivált polimorfonukleáris leukocitái fokozottan termelnek adhéziós molekulákban gazdag EV-eket. Ezek az EV-k képesek befolyásolni az érrendszeri endotélium működését, ami endotéliumkárosodáshoz, végső soron pedig szervi diszfunkcióhoz vezethet (Sanwlani és Gangoda 2021).

Azon tulajdonságuk révén, miszerint az EV-k specifikus molekulákat szállítanak, diagnosztikai eszközként is felhasználhatók. Az irodalomban gyakran beszámolnak arról, hogy különböző betegségekkel összefüggésben kialakuló krónikus és akut gyulladások hatására az EV-k mennyisége megemelkedik a véráramban. Az EV-k vérben történő azonosítása és monitorozása jelentős áttörést jelenthet biomarkerként való alkalmazásukban (Ciferri és mtsai 2021, Kumar és mtsai 2024).

1.4. Az extracelluláris vezikulák és a testmozgás kapcsolata

Az elmúlt évek során vizsgálatok kimutatták, hogy a többi sejthez hasonlóan, a vázizomzat is képes EV-eket kibocsátani a keringésbe edzés hatására (Denham és Spencer 2020, Vechetti és mtsai 2021).

Frühbeis és mtsai 2015-ben elsők között vizsgálták az sEV-k keringésben lévő szintjét és tulajdonságait az akut és regenerációs fázisban, kerékpáros és futóedzés protokoll hatására. Azt feltételezték, hogy a rendszeres testmozgás egészségvédő hatásai – amelyek bizonyos mértékig az edzés abbahagyását követően is fennmaradhatnak – összefüggésben állnak a keringésbe kerülő EV-k által közvetített jelekkel, amelyek

kulcsszerepet játszanak a fizikai aktivitásra adott fiziológiai adaptációs folyamatok szabályozásában. Azt a konklúziót vonták le, hogy a keringésben megfigyelhető megnövekedett EV-k szintje az edzés során a szervezet fiziológiai aktiváltsági állapotát tükrözi (Frühbeis és mtsai 2015). Safdar és mtsai részletes review-ban elemezték az állóképességi edzésből származó exoszómák anyagcsere-betegségek kezelésében történő lehetőségeit (Safdar és mtsai 2016). Whitham és mtsai kvantitatív proteomikai technikák és intravitalis képalkotó kísérletek alkalmazásával jellemezték az EV-kben található fehérjék edzés által kiváltott szekrúcióját. Kutatásuk számos új myokin-jelöltet azonosított, amelyek a klasszikus szekrúciós útvonalaktól függetlenül jutnak a keringésbe (Whitham és mtsai 2018). Brahmer és mtsai egészséges férfi atléták véréből az edzés hatására keletkező EV-eket fenotipizálta multiplex áramlási citometriás módszer segítségével, ahol feltárták a sejtfelszíni markerek mintázatát. Származási sejtnek limfocitákat (CD4, CD8), monocitákat (CD14), vérlemezkéket (CD41, CD42, CD62P), endotélsejteket (CD105, CD146) és antigénprezentáló sejteket (MHC-II) azonosítottak. Eredményeink arra utalnak, hogy a keringési rendszerhez kapcsolódó különböző sejttípusok hozzájárulnak egy heterogén EV „pool” kialakulásához, amelyek szerepet játszhatnak a testmozgással kapcsolatos jelátviteli mechanizmusokban és a szövetek közötti kommunikációban (Brahmer és mtsai 2019).

Ennek kapcsán számos tanulmány jelent meg arról, hogy a testedzés hatására keletkező vezikulák, azon belül is az endoszómális úton keletkező sEV-k szerepet játszhatnak például az anyagcsere eredetű betegségek kezelésében. Ebben az esetben endokrinszerű intercelluláris kommunikációs vezikulákról beszélünk, amelyek fehérjéket, miRNS-t és más nukleinsavakat szállítanak a sejtek és szövetek között, és elősegítik ezáltal a szervek közötti kommunikációt (Darragh és mtsai 2021).

1.5. A hosszútávú testedzés hatása a szervezetre

Az elmúlt évszázad során a nyugati országok többsége jelentős demográfiai átalakuláson ment keresztül, amelynek következtében folyamatosan emelkedik azon idős korúak aránya, akik egészségügyi és funkcionális kihívásokkal, valamint életkor-specifikus, ám gyakran már fiatalabb életkorban kialakuló betegségekkel szembesülnek

(Paffenbarger 2004). A nem fertőző betegségek (noncommunicable diseases - NCD-k), mint például az elhízás, a szívkoszorúér-betegség (cardiovascular heart diseases - CHD) és a 2-es típusú cukorbetegség (T2D), elsősorban az egészségtelen életmódhoz kapcsolódnak, mint a helytelen táplálkozás, a mozgásszegény életmód, a túlzott alkoholfogyasztás és a dohányzás. Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization - WHO) ezeket a betegségeket a nyugati társadalmak legfőbb egészségügyi problémái közé sorolja, ahol az elhízás és az inaktivitás kiemelt szerepet játszik a CHD és a cukorbetegség kialakulásában (Reiner és mtsai 2013).

Számos bizonyíték támasztja alá a rendszeresen végzett testedzés emberi szervezetre gyakorolt pozitív hatását, amely az élettani rendszerek széles körét érinti, beleértve a szív- és érrendszert, a mozgató szervrendszert, az anyagcserét és a mentális egészséget (Warburton és Bredin 2016). Chakravarty 2008-as tanulmányában 21 éven keresztül követték 50 év feletti futók, illetve az ülő életmódot folytató kontrollok egészségi állapotát. Vizsgálatukban kimutatták, hogy a futóknál mind az öszhalálozás, mind a mozgásszervi problémák mértéke alacsonyabb volt.. Az edzéssel kapcsolatos kérdőívek alapján a futók egészségi állapota jobb volt, mint az ülő életmódot folytató kontrolloké (Chakravarty 2008). Woodcock és mtsai 2011-es metaanalízisükben 22 tanulmányt elemeztek, amelyek közel 1 millió felnőtt személy adatait tartalmazták, hogy megvizsgálják a könnyű vagy közepes fizikai aktivitás hatását a minden okból fakadó halálra. Azt találták, hogy heti 2,5 óra testmozgás 19%-kal csökkenti a halálozási kockázatot a nem mozgáshoz képest, míg heti 7 órára emelve ez a csökkenés 24%-ra nőtt (Woodcock és mtsai 2011).

A különböző típusú fizikai aktivitás hatása a későbbi kardiovaszkuláris betegségekre (CVD) szintén fontos lehet. Az életkor előrehaladtával sok idősebb felnőttél csökkenhet a nagyobb intenzitású fizikai aktivitás végzésének képessége, így a könnyű és mérsékelt testmozgás, például a gyaloglás, nagyobb jelentőséggel bírhat a javasolt aktivitási szint elérésére (Lee 2010, Shiroma és Lee 2010).

Számos longitudinális vizsgálat vizsgálta a gyermekkori fizikai aktivitás szerepét a serdülőkori elhízás kialakulásában, ismételten mért objektív fizikai aktivitás-adatok felhasználásával (Johnson és mtsai 2000, Moore és mtsai 2003, Bandini és mtsai 2004, Kwon és mtsai 2013). Ezek a vizsgálatok vegyes eredményeket hoztak, legfeljebb minimális hatásmérettel (Wilks és mtsai 2011). Kwon és mtsai-nak eredményei azonban

azt mutatják, hogy az aktív életmód (napi 45 perc közepes és erős intenzitású fizikai aktivitás végzése, amit gyorsulásmérővel mértek) gyermek- és serdülőkorban megelőzheti az elhízás kialakulását fiatal felnőttkorban (Kwon és mtsai 2015).

A krónikus vesebetegség (CKD) gyakori az idősebb felnőttek körében. Az életkor előrehaladtával a szarkopénia, az izomtömeg és az izomerő korral járó csökkenése is egyre gyakoribbá válik (Moreno-Gonzalez és mtsai 2020). A szarkopénia kockázata fokozódhat a CKD egyidejű jelenlétével, mivel a CKD-s betegek körében ismert a katabolikus izomvesztés (Wang és Mitch 2013). A testmozgás csökkentheti a fizikai funkciók elvesztését, vagy akár javíthatja is azokat idős felnőttek körében, akik CKD-ben szenvednek (Fielding és mtsai 2017); azonban a CKD-s idősebb felnőttek körében végzett legtöbb vizsgálat kis mintavételi mérettel, viszonylag rövid időtartammal rendelkezik, és jellemzően vagy dialízis alatt álló egyéneket, vagy a CKD korábbi szakaszaiban lévő betegeket vizsgáltak (Castaneda és mtsai 2001, Watson és mtsai 2015, Barcellos és mtsai 2018). Weiner és mtsai (Weiner és mtsai 2023) randomizált vizsgálatban figyelték meg egy 12 hónapos edzésprogram hatását a kardiorespiratórikus fittségre, valamint a fizikai teljesítményre az 55 éves vagy annál idősebb, előrehaladott (G3b-G4 stádiumú) CKD-ban szenvedő felnőttek változatos mintájában. Az edzésprogram 6 hónap elteltével javította a mért aerob terhelhetőséget, és megállapította, hogy az edzésprogram biztonságos, megvalósítható és hatékony a fizikai teljesítmény javításában a G3b és G4 stádiumú CKD-ben szenvedő betegeknél.

A diéta által kiváltott fogyás javítja a béta-sejtek működését a T2D-ben szenvedőknél. Legaard és mtsai azt találták, hogy a diéta által kiváltott fogyás mellett a mozgásintervenció hozzáadása javítja a glükóz-stimulált béta-sejt funkciót az újonnan diagnosztizált T2D-ben szenvedőknél, a mozgás dózistól függő módon (Legaard és mtsai 2023).

1.5.1. A hosszútávú testedzés hatása az öregedési folyamatokra

A vázizomzat plaszticitása révén gyorsan reagál a fizikai aktivitásra, és kulcsszerepet játszik az anyagcsere szabályozásában. Az edzés molekuláris adaptációi, beleértve a DNS-, nem kódoló RNS- és hiszton-módosításokat, epigenetikai módosítások formájában szabályozzák a génexpressziót. Kimutatták, hogy a magasabb szintű fizikai

fittség összefügg a betegségek csökkenő előfordulásával és az öregedés lassabb ütemével (Radák és mtsai 2024a).

A rendszeres testmozgás bizonyítottan növeli az élettartamot, miközben serkentő hatású tényezőként is működhet, mivel hosszú távon csökkenti az oxidatív stresszhez kapcsolódó betegségek előfordulását. Az edzés során ugyan nő a reaktív oxigénfajok (ROS) termelődése, de ez az alkalmazkodás eredményeként aktiválja az antioxidáns rendszert, javítja az oxidatív károsodások eltávolítását és módosítja a redox-érzékeny gének expresszióját, valamint a fehérjék struktúráját (Radák és mtsai 2008).

Érdemes megemlíteni, hogy az idősebb életkorban elkezdett testmozgással kapcsolatban is pozitív eredményeket mutattak ki az agy öregedésének késleltetésében. Egy 2011-ben megjelent úttörő tanulmányban például a szerzők azt találták, hogy 1 évig tartó mérsékelt intenzitású testmozgás (40 perc időtartam, 3 nap/hét) egészséges idősebb egyéneknél növelte a hippocampusz méretét, valamint a térbeli memóriát (Erickson és mtsai 2011).

A fizikailag aktív életmód és a kognitív hanyatlás kockázata közötti fordított kapcsolat széles körben dokumentált, és az aerob edzés volt a legszélesebb körben alkalmazott lehetőség a fizikai aktivitás hatásának tanulmányozására az öregedés kognitív funkciókra gyakorolt negatív hatásának enyhítésében (Laurin és mtsai 2001, Sofi és mtsai 2011). Az első bizonyítékokat az 1970-es években publikálták, amikor kimutatták, hogy a középkorú sportolók jobb választ adtak a pszichomotoros komponenset tartalmazó kognitív feladatokban, mint az ülő életmódot folytató, hasonló korú alanyok (Spiriduso és Clifford 1978). Hosszabb aerob edzésprogramok (3 éves időtartam) az ülő életmódot folytató, idős nőknél javulást mutattak ki a reakcióidőben, a motoros funkciókban és a kognitív feldolgozási sebességben, ami azt jelzi, hogy a testmozgás hatékonyan visszafordítja vagy legalábbis lassítja a motoros teljesítmény és a kognitív feldolgozás sebességének korral járó csökkenését (Rikli és Edwards 1991). A fizikailag aktívabb emberek tehát jobb kognitív működéssel rendelkeznek, és az életkorral kevesebb kognitív hanyatlást tapasztalnak, mint a kevésbé aktív emberek (Blondell és mtsai 2014, Cunningham és mtsai 2020). Emellett mind a strukturált, hosszútávú fizikai aktivitási beavatkozások (Northey és mtsai 2018), mind a rövidtávú, egyszeri edzések (Lambourne és Tomporowski 2010, Chang és mtsai 2012, Basso és Suzuki 2017) pozitív hatással vannak a kognitív működésre. Ugyanakkor nem minden edzésprogram mutatja ki ezt a

hatást, és ez a kognitív feladat típusától függően változhat. A fizikai aktivitás kognitív hatásainak rövid és hosszútávú mechanizmusai között viselkedéses, neurofiziológiai és neurokémiai folyamatok is szerepet játszhatnak (Basso és Suzuki 2017, Ratey, és Loehr 2011).

A rövid leukocita telomerhossz (LTL) az emberi öregedés jellemzője (Blackburn 2000, Lin és mtsai 2012, López-Otín és mtsai 2013), amelyet szisztémás oxidatív stressz és gyulladás jelezhet, és számos kardiometabolikus betegséggel társul (Aviv és mtsai 2001, Fitzpatrick és mtsai 2006, Terai és mtsai 2013). A fizikai aktivitás csökkentheti az életkorral összefüggő betegségek előfordulását, mivel korábbi kutatások (Cherkas 2008, Werner és mtsai 2009, Garland és mtsai 2014) szerint a fizikailag aktív felnőttek átlagosan hosszabb LTL-lel rendelkeznek.

A vázizomzat öregedését számos strukturális és funkcionális változás jellemzi, amelyek fokozott fizikai korlátokkal és a betegségek kockázatával járnak. Az izomtömeg és -funkció fokozatos csökkenése, a szarkopéniának nevezett állapot vagy folyamat (Rosenberg 1997, Cruz-Jentoft és mtsai 2010) régóta elismert, hogy e változások közül az egyik legjelentősebb és legkárosabb. A testmozgás és a fizikai aktivitás jelentősen mérsékelheti, vagy bizonyos esetekben meg is előzheti az izomanyagcsere és az izomfunkció csökkenését. A vázizomzat az öregedés során részben megőrzi a testmozgásra adott plaszticitását, ami meggyőző bizonyítékot szolgáltat arra, hogy az izomfunkció és az anyagcsere számos, az életkorral összefüggő negatív változását az öregedéshez másodlagosan kapcsolódó életmódbeli változások, különösen a fizikai inaktivitás okozza (Distefano és Goodpaster 2018).

1.6. Az epigenetika

A huszadik század első felében a fejlődésbiológia és a genetika különálló tudományágak voltak. Az epigenetika szót Waddington alkotta meg a két terület összekapcsolására (Holliday 2006). Riggs és mtsai az epigenetikát úgy definiálták, és ma már általánosan elfogadott fogalom, mint „a génműködésben bekövetkező, mitotikusan és/vagy meiotikusan öröklődő, a DNS-szekvencia változásával nem járó változások tanulmányozása” (Wu és mtsai 2001). Ez azt jelenti, hogy a gének kifejeződése vagy

elnémítása nem a DNS közvetlen módosításával (mutációval), hanem más mechanizmusokon keresztül történik.

Az epigenetika az egyik mechanizmus, amely összekapcsolja a környezeti tényezőket a megváltozott génaktivitással, ezáltal nyilvánvaló kapcsolatot teremt a táplálkozási szokások gyors változásai és a megfigyelt elhízás fenotípusok között. Az elhízás jelensége óriási terhet ró az emberi egészségre világszerte, és fontos kockázati tényező számos betegség, például a szív- és érrendszeri betegségek (El-Atat és mtsai 2003, Poirier és mtsai 2006), a T2D (Rathmann és Giani 2004) és bizonyos rákfajták (Anderson és Caswell 2009), mint a mell- (Morimoto és mtsai 2002) és vastagbélrák (Larsson és Wolk 2007) kialakulásában. Mint tipikus, gyakori, komplex betegség, az elhízás a külső (környezeti) és belső (genetikai) tényezők kölcsönhatásának eredménye. Az epigenetikát gondolják annak a molekuláris mechanizmusnak, amely közvetíti ezt a kölcsönhatást.

Kutatások arra utalnak, hogy az epigenetikai változások elindíthatják a premalignus sejtek terjedését a daganatképződés korai szakaszaiban. A főbb daganattípusok, például a vastagbél-, tüdő- és prosztaták fejlődésének legkorábbi lépései során ezen premalignus sejtek egy alcsoportja genetikai változásokon megy keresztül, amelyek lehetővé teszik számukra a daganatprogresszió és növekedés közvetítését. Az ezen sejtekben bekövetkező korai epigenetikai változások meghatározhatják a későbbi genetikai változásokat, és ezáltal elősegíthetik ezen klónok progresszióját (Lachner és mtsai 2003, Hake és mtsai 2004).

Az epigenetikai mechanizmusok különböző fiziológiai és patológiai folyamatokat manipulálnak úgy, hogy a megfelelő gének expresszióját szabályozzák az epigenetikai kódok helyi és globális szintű hozzáférhetőségének megváltoztatásával (Baylin és Ohm 2006, Kouzarides 2007). Három alapvető epigenetikai kódot tanulmányoztak alaposan, amelyek közé tartozik a DNS-metiláció, a hisztonmodifikációk és a nem kódoló RNS-ek (ncRNS). Az epigenetika gyors fejlődése következtében nőtt az érdeklődés az új technológiák iránt, amelyek lehetővé teszik az egészségi állapotot és betegségeket befolyásoló epigenetikai jelek dekódolását. Ezen technikák, mint a magas minőségű antitestek, kromatin funkcionális próbák és nagy áteresztőképességű szekvenálás,

lehetővé teszik a kromatin állapotának többdimenziós vizsgálatát és a genom széleskörű elemzését (Li 2021).

1.6.1. A DNS-metiláció szerepe

A DNS-metiláció az eukariótákban fontos epigenetikai módosítás, amely szabályozza a génexpressziót. Létfontosságú az embrionális fejlődésben, és olyan folyamatokra van hatással, mint a genomiális imprinting, az X-kromoszóma inaktiváció vagy az ismétlődő DNS elnémítása (Schübeler 2015).

A DNS-metiláció a legalaposabban tanulmányozott epigenetikai mechanizmus. A leggyakoribb DNS-metilációs minta, az 5mC, magában foglalja egy metilcsoport (-CH₃) átvitelét a citozin-C5 pozíciójára a CpG dinukleotidokon belül, egy enzimes folyamat révén, amelyet a DNS-metiltransferázok (DNMT-k) csoportja végez el (Chen és mtsai 2016). Sok CpG dinukleotid gyakran csoportosul egy adott szabályozó régióban, például a gén promóter régiójában, és CpG szigeteket alkot, amelyek gyakran részt vesznek a gén transzkripció szabályozásában (Bird 1986). A DNS-metiláció kulcsszerepet játszik különböző fiziológiai és patológiai folyamatok szabályozásában, és a rendellenes DNS-metiláció gyakran kapcsolódik betegség kialakulásához. A biológiai folyamatok DNS-metiláció általi befolyásolásának leggyakoribb módja a génexpresszió szabályozása, amely a specifikus gén szabályozó régiójában található CpG szigetek metilációs állapotának dinamikus szabályozásán keresztül történik (Robertson és Wolffe 2000).

Számos rákos sejtre jellemző a fiziológias sejtekhez képest az abnormális metilációs mintázat. Jól ismert, hogy a promóter régiók hipermetilációja (azaz a metiláció magasabb aránya) bizonyos tumorszupresszor gének transzkripció elnémításához vezethet, és hozzájárul számos szabályozó fehérje és enzim működésének szabályozásához is. Ezzel szemben a hipometiláció (azaz a metiláció alacsonyabb aránya) a rákfejlődés nagyon korai szakaszában a genomi instabilitás elősegítésével és a sejtek átalakulásával hozható összefüggésbe (Kulis és Esteller 2010). A DNS-hipometiláció aktiválhat olyan géneket, amelyek a hipermetilált promóter régiók következtében elcsendesedtek. Például a MAGEA génklaszterből származó gének (melanóma-asszociált antigén A) csak a spermatogonialis sejteken expresszálódnak, nem pedig más szomatikus

szövetekben. Azonban ezek a gének újra expresszálódhatnak különböző rákos megbetegedésekben, mivel a promóterük demetilálódik (Colemon és mtsai 2020). Ennek megfelelően a MAGEA gének rendellenes expressziója a mell-, tüdő- és vastagbél daganatok agresszivitásának és malignitásának fokozódásával hozható összefüggésbe (Poojary és mtsai 2020). A szabad sejtmentes DNS (cfDNS) metilációja a közelmúltban ígéretes eredményeket mutatott több rákos megbetegedés korai felismerésében (Qiao és mtsai 2021).

Az egészséges öregedés számos biomarkerét javasolták az elmúlt években, köztük a DNS-metilációs méréseken alapuló epigenetikai órákat, amelyek egyre pontosabban jelzik előre az egyéni biológiai életkort (Fiorito és mtsai 2021).

1.6.2. Az epigenetikai órák

Az öregedést, mint bonyolult folyamatot, különböző változások jellemzik sejtes, szubcelluláris és nukleáris szinteken, amelyek közül az egyik az epigenetikai öregedés. Ahogy egyre nagyobb figyelmet kap az epigenetikai változások szerepe az öregedésben, a DNS-metilációs mintázatok mércéjévé váltak a biológiai életkor meghatározásának, melyet jelenleg epigenetikai óráként emlegetnek (Duan és mtsai 2022).

Míg az első generációs órák, mint például Horvath pan tissue órája (összes-szöveti óra) (Horvath 2013) vagy Hannum és mtsai vér alapú órája (Hannum és mtsai 2013) a biológiai életkort becsülik, addig a második generációs órák a halálzási kockázatot, például a halálzási kockázati pontszám (Zhang és mtsai 2017), a DNAmPhenoAge (Levine és mtsai 2018), a DNAmGrimAge (Lu és mtsai 2019), és a longitudinális adatokon alapuló órák, mint a DunedinPoAm (Belsky és mtsai 2020) és a DunedinPACE (Belsky és mtsai 2022).

A DNAmGrimAge alapja egy olyan algoritmus, amely az egyén DNS metilációs adatainak több mint 100 jellemzőjét használja fel, és figyelembe veszi a halálzási kockázattal összefüggő tényezőket, mint például a szív- és érrendszeri betegségek, a rák és más, öregedéssel összefüggő egészségi problémák (Lu és mtsai 2022). Ez az eszköz

különösen hasznos a betegségekkel és az öregedéssel kapcsolatos kutatásokban, mivel segíthet a jövőbeli egészségügyi kockázatok és a várható élettartam előrejelzésében.

A DNAmPhenoAge különlegessége, hogy nemcsak a biológiai életkort méri, hanem figyelembe veszi az egyén egészségi állapotát is. Az óra az epigenetikai adatok mellett olyan klinikai és fiziológiai markereket is használ, mint a vérnyomás, a testsúly és a gyulladási szint, hogy pontosabb előrejelzést adjon a várható élettartamról és az egészségügyi kockázatokról (Levine és mtsai 2018). Ez az eszköz tehát nemcsak az öregedés ütemét mutatja, hanem azt is, hogy az egyén milyen mértékben van kitéve az öregedéssel összefüggő betegségeknek és egyéb kockázatoknak.

Nemrégiben kifejlesztettünk egy új öregedési órát, a DNAmFitAge-t, amely biológiai életkormutatóként szolgál a fizikai erőnlét olyan mérőszámainak integrálásával, mint a $VO_2\text{max}$ és a kézi szorítóerő. Ez az óra azzal a céllal került kifejlesztésre, hogy összekapcsolja az epigenetikát az edzettséggel, különös figyelmet fordítva arra, hogy a fittség hogyan befolyásolja az öregedési folyamatokat (McGreevy és mtsai 2023).

2. Célkitűzések

Kutatásunk során azt a célt tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a több évtizedes testedzés hatását a humán vérben keringő sEV-kre. Szerettük volna látni, hogy találunk-e különbséget elsősorban az edzettséghez kapcsolódó vizsgált paraméterekben a két csoport adatai között.

Mivel nem állt rendelkezésünkre egységes protokoll a vezikulákkal való munkához, így első lépés egy megfelelő izolálási protokoll megalkotása és validálása volt, amely a későbbi MS vizsgálatokhoz is alkalmas mintát szolgáltat, és megfelel az ISEV által közzétett MISEV iránymutatásoknak mind technikai, mind pedig nevezéktani oldalról tekintve. Tanulmányunkban olyan reprodukálható, megbízható és hozzáférhető módszerrel kívántunk dolgozni, amely a jövőben akár diagnosztikai területeken is alkalmazható. A módszer megalkotásakor fontos kritérium volt, hogy minél kevesebb mennyiségű kontaminációt tartalmazó sEV mintát tudjunk szolgáltatni.

Ezután felvetődött bennünk a kérdés, hogy van-e érdemi különbség a frissen levett trombocita-mentes plazmából (PFP-ből), és a hosszabb ideig fagyaszttva tárolt PFP-ből izolált sEV-k között. Az irodalomban találtunk adatokat, ahol a tárolás hatását vizsgálták a plazmára vagy a már izolált vezikulákra, de a mi általunk vizsgálni tervezett, hosszabb időtartamhoz és módszerhez hasonló vizsgálatot nem találtunk, ezért fontosnak tartottuk, hogy ezzel a kérdéssel is foglalkozzunk.

A metodikai kérdések tisztázása után az volt a célunk, hogy a megalkotott módszerrel sEV-eket izoláljunk a két csoport PFP mintáiból, majd elvégezzük azok proteomikai vizsgálatát. Célunk volt, hogy feltárjuk az összefüggéseket a fittség, az epigenetikai öregedés és bizonyos klinikai markerek között, hogy jobban megértsük a testedzéshez kapcsolódó szisztémás alkalmazkodásokat.

Kutatási eredményeinkkel célunk az volt, hogy bővítsük a tudományos ismereteket egy viszonylag új kutatási területen, amely a sport és a fizikai aktivitás hatását vizsgálja az sEV-kre. E kutatási irány feltárása nemcsak a sportélettani, sejtbiológiai és orvosi tudományok szorosabb összekapcsolására nyújt lehetőséget, hanem hozzájárulhat új biomarkerek és terápiás célpontok azonosításához is.

Hipotézisek

1. A módszertan kidolgozásához kapcsolódó hipotézisek:

1.1: Feltételeztük, hogy a minták alapos preanalitikai vizsgálata segít az sEV izolálásra legalkalmasabb minták kiválasztásában.

1.2: Feltételeztük, hogy a 70 nm-es pórusnagyságú oszlop kisebb kontaminációval, hatékonyabban izolál sEV-eket tömegspektrometriás mérésre, mint a 35 nm-es oszlop.

1.3: Feltételeztük, hogy a frissen levett vérből készült PFP, és a hosszabb távon fagyasztva tárolt PFP egyaránt alkalmas az sEV izolálásra.

2. Az edzettségi szint és a kis méretű extracelluláris vezikulák (sEV) kapcsolatának vizsgálatára vonatkozó hipotézisek:

2.1: Feltételeztük, hogy az sEV minták proteomikai elemzése során kapcsolatot találunk a vezikulákban található fehérjék, és az epigenetikai öregedés üteme között.

2.2: Feltételeztük, hogy szignifikáns különbség mutatható ki az edzettségi szint függvényében az sEV mennyiségi meghatározásában.

2.3: Feltételeztük, hogy szignifikáns különbség mutatható ki a fehérjeszintek és a fiziológiai fittségi mutatók között az edzettségi szint függvényében.

3. Anyag és módszer

3.1. Vizsgálat alanyai

A vizsgálatot megelőzően etikai kérvényt nyújtottunk be, melyet az Egészségügyi Tudományos Tanács, Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (TUKÉB) hagyott jóvá a 25167-6/2019/EÜIG engedélyszám alatt. Ez az engedély megfelel a Helsinki Nyilatkozatnak és a Magyarországon érvényes szabályozásoknak is (György és mtsai 2025).

A kutatásba csak olyan önkéntesek vettek részt, akik nem feleltek meg az alábbi kizárási kritériumoknak: kardiovaszkuláris vagy mozgásszervi betegségek, amelyek megakadályozzák a fizikai megterhelést; akut vagy krónikus állapotok, amelyek a veséket, a májat vagy az emésztőrendszert érintik; fertőző betegségek, beleértve a lázas állapotokat; anyagcsere- vagy endokrin rendellenességek; vérzési rendellenességek vagy koagulációs zavarok; rák; autoimmun betegségek; asztma; pszichológiai vagy mentális betegségek; korlátozott fizikai vagy kommunikációs képességek; krónikus alkoholfogyasztás; vagy rendszeres dohányzás előzményei. A résztvevőket tájékoztattuk a kutatás menetéről, és írásban beleegyeztek a részvételbe. A vérvétel és a fittség tesztelése előtt a résztvevők kitöltötték egy kérdőívet, amely az edzési előzményekről, edzésgyakoriságról és alapvető étrendi szokásokról gyűjtött információkat (György és mtsai 2025).

A mintavétel és a tesztek időpontja és helyszíne a 2019-es velencei Evezős Masters Világbajnokság volt, ahol előre elkészített szórólapokkal, és személyes jelenléttel toboroztunk összesen 194 szenior versenyzőt (edzett férfi $n = 114$ fő, átlagéletkor (év) = $60,8 \pm 11,3$; edzett nő $n = 80$ fő, átlagéletkor (év) = $57,6 \pm 8,5$). Következő célunk a szenior versenyzők életkorának és nemének megfelelő kontroll csoport felállítása volt, így néhány hónappal később, Budapesten megismételtük a mintavételt és a teszteket a 109 főből álló csoporton (kontroll férfi $n = 35$ fő, átlagéletkor (év) = $59,3 \pm 13,9$; kontroll nő = 74 fő, átlagéletkor (év) = $64,3 \pm 11,5$). A két csoport

résztevőinek száma összesen 303 fő volt, a nemek megoszlási aránya pedig közel 50% volt (49% férfi, 51% nő).

Mivel a kérdőívek alapján mindkét csoportban eltérő információk voltak a heti szintű sportolást illetően, és a kontrollcsoport sem alkotott homogén, inaktív mintát, a vizsgálatban a résztvevőket különböző fitsségi csoportokba soroltunk a $VO_2\max$ szint alapján, amely a kardiovaszkuláris fittséget jelöli, továbbá a sportolók fizikai teljesítőképességének egyik legjobb mutatójának tekintik. A korcsoportjukra vonatkozó 75% feletti $VO_2\max$ becslésekkel rendelkező egyéneket magas fittségűnek (High-fit: férfi $n = 93$, átlagéletkor (év) = $60,0 \pm 10,6$; női $n = 91$, átlagéletkor (év) = $59,0 \pm 10,6$), míg az alatta lévőköt közepesen alacsony fittségűnek (Med-Low-fit: férfi $n = 50$, átlagéletkor (év) = $63,0 \pm 12,4$; női $n = 62$, átlagéletkor (év) = $63,0 \pm 12,5$) jelöltük. A magas és közepesen alacsony kategóriákat korcsoportokra lebontott normatív adatok (Kaminsky és mtsai 2015, Jokai és mtsai 2023) alapján állapítottuk meg. Az eredeti, 303 fős mintából 294 fő esetében álltak rendelkezésre teljes adatok, így az ismételt csoportosítás során kizárólag az ő adataikat használtuk fel, míg a fennmaradó 7 fő elemzését a hiányzó adatok miatt nem tudtuk elvégezni.

Az edzettség mértékének vizsgálatához végül 40 női PFP mintát választottunk, amelyekből a későbbiekben izoláltuk a sEV-eket. A férfi résztvevők preanalitikai eredményei alapján nem állt rendelkezésre elegendő elemszám az sEV izoláláshoz, így csak a női minták kerültek bevonásra. Az $n=80$ (50 fő High-fit, 30 fő Med-Low-fit) rendelkezésre álló női minta közül előre meghatározott szempontok szerint történt a kiválasztás: figyelembe vettük a korcsoportokat, valamint a teljes körű vizsgálati adatok meglétét, így biztosítva a High-fit ($n=20$) és Med-Low-fit ($n=20$) csoportok életkori és adateloszlásának összehasonlíthatóságát.

A lényegi mintafeldolgozás előtt szükség volt a pilot vizsgálatához való mintavételre - a protokoll beállítása miatt -, ahol összesen 8 nőtől (átlagéletkor (év) = $36,3 \pm 8,9$) és 11 férfitől (átlagéletkor (év) = $34,6 \pm 10,4$) gyűjtöttünk vérmintát Budapesten. Összesen 37 PFP mintát gyűjtöttünk, mivel egyes alanyoktól több vérminta is rendelkezésre állt. Mivel a vizsgálat célja a laboratóriumi eljárásfejlesztés volt, nem pedig csoportok közötti összehasonlítás, a résztvevők neme és a minták ismétlődése nem befolyásolta a vizsgálat érvényességét. A 11-ből 6 férfi esetében volt egy második

vérvétel is egy későbbi időpontban, hogy a fagyasztva tárolt, és a frissen levett minták közötti eltéréseket később vizsgálni tudjuk. A pilot vizsgálat alanyaihoz tartozó követelmény az egy időben vett éhgyomri vérvétel és az egészséges állapot volt, heti 3-4 óras mozgással kiegészítve. A beleegyező nyilatkozat és a kérdőív kitöltése itt is megtörtént, tudomásunk szerint senki nem szenvedett semmilyen akut vagy krónikus betegségben (György és mtsai 2024).

3.2. Terhelésélettani, antropometriai és kognitív vizsgálatok

Az edzett és a felállított kontroll csoport alanyaitól való mintavételt közvetlenül megelőzte a helyszínen végzett többrészes teszt sorozat. Minden felmérést ugyanazok a személyek végeztek, így biztosítva azt, hogy a kivitelezés megegyezzen minden vizsgálati alannál. Az antropometriai vizsgálatok során testmagasság és testtömeg mérést végeztünk, majd BF214 testösszetétel monitorral (Omron, Japán) meghatároztuk az alanyok testtömeg-indexét. A terhelésélettani teszt sorozat négy vizsgálatból: maximális kézi szorítóerő mérésből, maximális felugrásból, Chester-step tesztből és kognitív tesztből állt (Jokai és mtsai 2023).

1. A maximális kézi szorítóerő mérést egy kézi dinamométerrel (Camry EH 101, USA) vizsgáltuk három kísérletben a domináns kézzel, majd a legmagasabb értéket (GripMax) rögzítettük és normalizáltuk a testtömeggel (Oksuzyan és mtsai 2010, Bohannon 2019, Eika és mtsai 2019).
2. Az alsó test robbanékony erejét a maximális függőleges felugrás magasságával mértük egy linear encoder (Muscle Lab, Norvégia) nevű készülék segítségével. Az alanyoknak csípőre tartott kézzel a lehető legmagasabbra kellett ugraniuk, amit összesen ötször ismételték meg (Tillaar és mtsai 2020).
3. A VO_2 max fizikai fittség mutató becsléséhez a Chester-step tesztet használtuk (Buckley és mtsai 2004). A vizsgálat alatt az alanyoknak egy 15 cm magas fitness step padra kellett maximum 5x2 percen keresztül fel-le lépcsőzniük csípőre tett kézzel. A 2 perces időintervallumokat egy rövid, 5 másodperces szünet követte, majd a lépések üteme egyre gyorsult. Egy digitális metronóm segített abban, hogy

az ütemet tartani tudják az alanyok. Addig kellett ezt a feladatot végrehajtaniuk, amíg a pulzus értékük el nem érte az egyénileg, a Tanaka protokoll szerint (208-0,7×életkor) becsült maximális pulzus 80%-át, vagy véget nem ért a teszt.

4. A munkamemória értékelésére a számterjedelem tesztet alkalmaztuk, melyet eredetileg Jacobs dolgozott ki 1887-ben, és ami a Wechsler-féle intelligencia tesztben is szerepel (Jacobs 1887, Leung és mtsai 2011). A nagyobb számjegyű értékek jobb memóriát jeleznek. A teszt során az alanyoknak, négy darab 3-9 számjegyből álló számsorozat visszamondását kellett teljesíteniük. Ennek eredménye 3-tól 9-ig terjedhet, annak megfelelően, hogy mennyi számból álló számsorozatot sikerült hibátlanul visszamondaniuk.

Mivel a pilot vizsgálat magát a vezikula izolálási protokollt validálta a vezikulák jelenlétének kimutatásával, ezért ebben a vizsgálatban résztvevő alanyok (8 nő, 11 férfi) esetében nem volt szükség a 3.2. alfejezetben részletezett vizsgálatok elvégzésének.

3.3. Vértétel, biokémiai és hematológiai paraméterek vizsgálata

A mintavétel során szakképzett személyek az alanyok könyökvénájából K2-EDTA (lila kupak), ACD-A (sárga kupak) és szeparátor gélt tartalmazó szérumos csövekbe (piros kupak) vették le (BD Vacutainer vérvételi rendszer) a vérmintákat.

- A K2-EDTA tartalmú csövek közül az egyikből a levétel után 2-4 órán belül vérkép elemzés történt hematológiai automata segítségével. A másik cső tartalmát ketté osztottuk, egy része rögtön szárazjégre került (DNS metilációs vizsgálat), a másikat pedig levétel után pár perccel a helyszínen lecentrifugáltuk (1600g, 15 perc, 4°C) Eppendorf 5804R (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) centrifugát használva. Ezután pipetta segítségével óvatosan leszívtuk a vérplazmát mikrocentrifuga csövekbe szétosztva, szárazjégre tettük néhány órára, majd ultramélyhűtőben -80°C-on tároltuk feldolgozásig.
- Mindkét ACD-A tartalmú csövet levétel után 45 percen belül lecentrifugáltuk kétszer 2500g-n, 15 percig (Lacroix és mtsai 2012). Az első centrifugálás után keletkezik a trombocita-szegény plazma (PPP), majd a plazmát másodszor is lecentrifugálva kapjuk a PFP-t, amire szükség van ahhoz, hogy a mintából

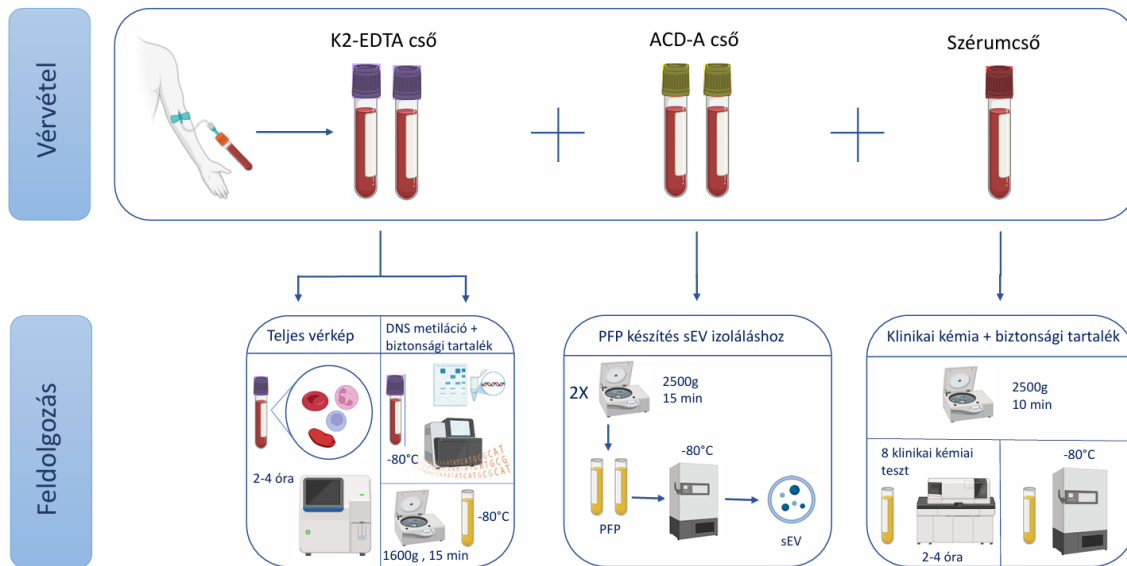
vezikulát tudjunk izolálni később. Az így keletkezett PFP-t mikrocentrifuga csövekbe osztottuk szét, majd szárazjégre tétel után a felhasználásig -80°C -on tároltuk.

- A szérumos mintavételi csöveket lecentrifugáltuk (2500g, 10perc), majd pipetta segítségével kettéosztottuk a keletkező szérumot. Egyik részét hűtőszekrényben $+4^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk, majd néhány órán belül 8 kémiai paramétert vizsgáltunk meg belőle (glükóz, koleszterin, LDL, HDL, triglicerid, GOT, GPT, gamma GT). A szérum másik részét először szárazjégen, majd -80°C -on ultramélyhűtőben tároltuk.

A mintavételi csövekből végzett vizsgálatok sematikus ábrázolását az **1.ábra** mutatja be. A mintavétel minden esetben a Chester-step teszt előtt történt, ennek egyik lényeges oka az volt, hogy mozgás hatására a vérben lévő vezikulák száma jelentősen megnő, ami befolyásolta volna a vizsgálat eredményét (Frühbeis és mtsai 2015, Zhang és mtsai 2021).

3.4. DNS izolálás, metilációs vizsgálatok, epigenetikai órák

A vizsgálatokat követően laboratóriumunkban, a fagyasztott K2-EDTA alvadásgátlóval kezelt mintát szobahőmérsékleten felolvasztottuk, majd lecentrifugáltuk. Az így keletkezett sejtes elemeiből, azon belül is a fehérvérsejteket tartalmazó „buffy coat” részéből DNS-t izoláltunk (Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit, Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA). A DNS-metiláció 85 000 helye epigenom szinten került mérésre az Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA) segítségével, a gyártó protokolljának megfelelően. A DNS-metiláción alapuló biológiai órákat, beleértve a DNAmFitAge, PhenoAge és GrimAge akcelerációkat, a McGreevy és mtsai által leírtak szerint számítottuk ki (Levine és mtsai 2018, Lu és mtsai 2019, McGreevy és mtsai 2023).



1. ábra: A mintavételi csövekből végzett vizsgálatok sematikus ábrázolása

3.5. A trombocita-mentes plazma preanalitikai vizsgálata

A PFP minőségének ellenőrzésére azért volt szükség, hogy a vezikula izolálási folyamatot zavaró tényezőket azonosítani tudjunk, ehhez pedig preanalitikai vizsgálatokat végeztünk. Azokat a mintákat, amelyek szemmel láthatóan lipémiásnak vagy hemolitikusnak tűntek, azonnal kizártuk a további feldolgozásból (Fliser és mtsai 2012). A trombocita- és hemoglobinszinteket Sysmex XE2100 hematológiai analizátorral (Sysmex Corp., Kobe, Japán) mértük, míg az abszorbanciát különböző hullámhosszokon néztük LabSystems Multiskan ELISA (Thermo/LabSystems, Vantaa, Finnország) olvasóval.

A preanalitikai vizsgálatok során a következő kizárási kritériumokat vettük figyelembe. A hemolízist 540 nm-en detektáltuk, és az előzetes mérések alapján a 0,150 alatti abszorbanciákat nem hemolitikusnak tekintettük. A hemolízis referenciapaletta (https://www.cdc.gov/vector-borne-diseases/media/pdfs/hemolysis_palette_reference_to-ol-p.pdf?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/nczid/dvbd/pdf/Hemolysis_Palette_Bookmark-P.pdf) segítségével a 100 mg/dl alatti minták kerültek bevonásra. Az ikterusos mintákat 450 nm és 492 nm hullámhosszon mértük, az elfogadási határértékeket 0,400 és 0,340 alatti abszorbanciánál állapítottuk meg. A lipémiát 620 nm és 690 nm hullámhosszon vizsgáltuk, és a 0,150 és 0,120 abszorbancia alatti határértékeket tartalmazó mintákat dolgoztuk fel. Az 1 g/l alatti hemoglobinszinteket tekintettük

elfogadhatónak. Ha a minta meghaladta az 5 millió sejt/l trombocita koncentrációt, további centrifugálási lépésen ment keresztül, mivel az 5 millió sejt/l jelentette a határértéket (György és mtsai 2024). Fontos megjegyezni, hogy a vezikula izolálás 0,8 µm-es szűrési lépését követően ajánlott a trombocitaszám mérésének ismétlése. A preanalitikai mérések eredményeit Excel-táblázatban soronként összesítettük. A minták kizárását egy saját pontozási rendszer alapján végeztük, amely figyelembe vette a meghatározott kizárási kritériumokat és a klinikai kémiai mérési eredményeket.

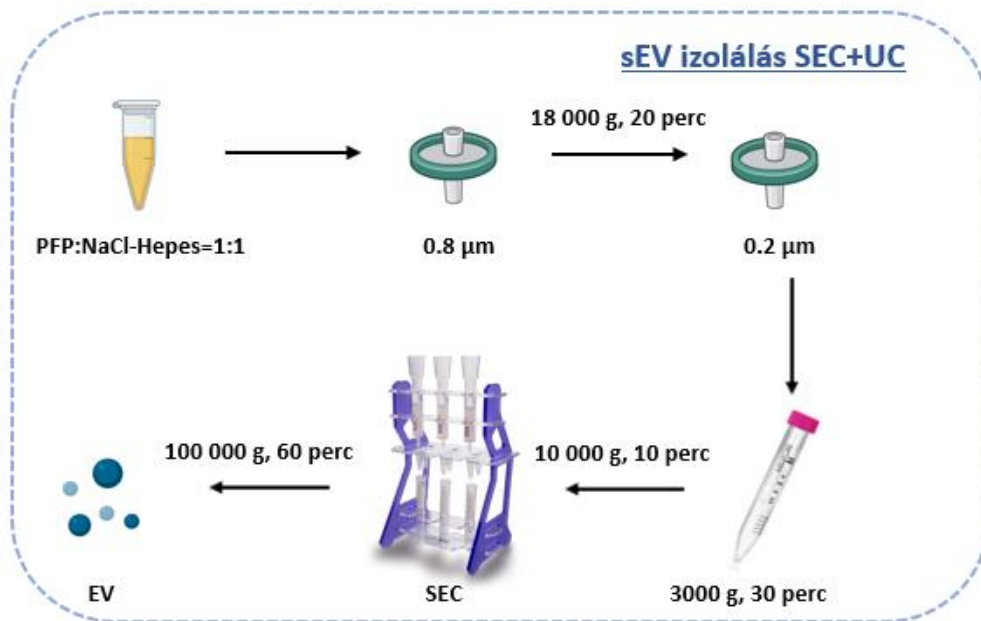
3.6. A kis méretű extracelluláris vezikulák izolálásának lépései

Legelőször a pilot kísérlet mintáit izoláltuk, hogy a metodikai protokollt sikeresen beállítsuk. A High-fit és Med-Low-fit alanyoktól származó 40 minta csak ezután került izolálásra a beállított és validált metodikát alkalmazva. Minden vizsgálati eljárás az sEV-k izolálásával kezdődött 2,5 ml kiindulási PFP-ből. Azért volt szükség minden résztvevőtől két ACD-A cső vér gyűjtésére, mivel a plazmából viszonylag kisebb mennyiségű vezikulát lehet izolálni, és szükség volt még a validációs kísérletek elvégzésére is. Ezek a vizsgálatok a 3.7. alfejezetben kerülnek részletezésre.

A fagyasztott mintákat minden esetben az izolálást megelőzően szobahőmérsékleten olvasztottuk ki. A PFP-mintákat (2,5 ml) 5 ml-re hígítottuk 0,2-0,1 µm-es tandemszűrűsű NaCl-Hepes pufferrel, majd 0,8 µm-es steril cellulóz-acetát (CA) fecskendőszűrőn keresztül hidrosztatikus nyomás segítségével megszűrtük a visszamaradt nagyobb részecskék eltávolítása érdekében (György és mtsai 2014, Gaspar és mtsai 2020). A leszűrt PFP-mintákat 18 000g-n 20 percig centrifugáltuk (5810R Eppendorf centrifuga), hogy sEV-ben gazdag felülúszót kapjunk. A felülúszót tovább tisztítottuk egy 0,2 µm pórusátmérőjű CA fecskendőszűrővel, majd egy 100 kDa (Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit; Merck, New York, NY, USA) ultrafiltrációs csővel (3000g, 30 perc; 5804R Eppendorf, Eppendorf AG, Hamburg, Németország) a mintákat 1000-1500 µl-re koncentráltuk. Annak érdekében, hogy a minták azonos térfogatúak legyenek, 1500 µL-ig töltöttük fel őket pufferrel, majd 10 percig 10 000g-n centrifugáltuk

őket (Z216MK Hermle centrifuga, HermLe Labortechnik GmbH, Wehingen, Németország) az aggregátumok eltávolítása érdekében (György és mtsai 2024).

A méretkizárásos kromatográfia (SEC) használható a fehérjék és a lipoprotein részecskék eltávolítására a plazmából, ez a módszer azonban csak az vezikula minták fehérje- és a "plazma lipoprotein részecske" („PLP”) szennyezettségét csökkenti (Brennan és mtsai 2020). A pilot vizsgálatokban két különböző pórusméretű SEC-oszlopot (35 nm és 70 nm qEV-original; IZON Science, Cambridge, MA, USA) használtunk, mivel szeretnénk volna összehasonlítani az sEV izolálás hatékonyságát. Ez a két pórusméret kifejezetten EV izolálásra alkalmas, amelyet a gyártói kézikönyv (<https://files.izon.com/hubfs/manuals-technical-notes-and-customer-support/qev-columns/qevoriginal-user-manual-TN-DQ-002.pdf>) és a szakirodalom is megerősít (Yang és mtsai 2021, Bracht és mtsai 2024, Robinson és mtsai 2024). A pilot mintákat tehát párhuzamosan izoláltuk mind a 35 nm-es, mind a 70 nm-es pórusméretű oszlopok használatával, a fagyasztott és friss minták összehasonlításához pedig 70 nm-es pórusméretű oszlopot használtunk. A mintákat (1500 µl) a SEC-oszlop szűrőjére pipettáztuk, majd az elúcióhoz NaCl-HEPES puffert használtunk. Az oszlopról lejövő frakciókat a következőképpen gyűjtöttük: hulladékfrakció (3 ml), majd 1-10. frakció (0,5 ml/frakció). A 35 nm-es oszlop esetében 1-3. frakcióból, a 70 nm-es oszlop esetében pedig 2-4. frakcióból állítottuk elő a sEV-ket tartalmazó pool frakciót. A SEC-frakciókat (1-8) és a poolozott mintákat UC csőbe (#:344619; Beckman Coulter, Brea, CA, USA) pipettáztuk, ezután NaCl-Hepes pufferrel feltöltöttük, és 100 000g-n 60 percig centrifugáltuk (Type-100, Beckman Coulter centrifuga). A felülúszó leszívása után a kapott, sEV-ket tartalmazó pelletet 15-20 µl NaCl-Hepes pufferben szuszpendáltuk fel, majd -80 °C-on tároltuk a későbbi tömegspektrometriás vizsgálatig (**2. ábra**).



2. ábra: sEV izolálás lépéseinek sematikus ábrázolása (György és mtsai 2024)

3.7. A kis méretű extracelluláris vezikulák jelenlétének validálási módszerei

3.7.1. A részecskeszám meghatározása nanorészecske-nyomkövetéses analízissel

A részecskék méreteloszlását és koncentrációját egy ZetaView Z nanopartikula számláló műszerrel (Particle Metrix GmbH, Inning am Ammersee, Németország) mértük. Meg kell jegyezni, hogy ez a módszer nem képes különbséget tenni a „vezikuláris” és a „nem vezikuláris” részecskék között. Ez utóbbihoz tartoznak például a fehérjekomplexek, fehérjeaggregátumok és „PLP”-k (Filipe és mtsai 2010). A sEV-k méreteloszlásának és koncentrációjának meghatározásához a SEC-frakciókból (1-8) és az UC előtti pool frakciókból különböző hígításokat (50-800×) készítettünk. Az poolozott minták esetében az 1×10^9 részecske/ml alatti részecskékonzentrációjú mintákat kizártuk az elemzésből. A mintákhoz használt beállítások a következők voltak: automatikus expozíció, gain: 28,8, offset: 0, shutter: 100 és érzékenység: 80. A kapott adatokat a ZetaView Analysis 8.05.10 szoftverrel elemeztük, és mintánként legalább 8 pozíciót használtunk az elemzéshez (György és mtsai 2024).

3.7.2. Spektrofotometria

A teljes fehérjetartalmat egy NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) műszerrel vizsgáltuk. A minták abszorbanciáját 280 nm-es hullámhosszon mértük, vak mintaként NaCl-Hepes puffert használtunk. A pilot vizsgálat mintáinál 1-től 10-ig egyesével vizsgáltuk a frakciókat, a többi minta esetében pedig pooloztuk őket, és úgy vizsgáltuk. A minták térfogata 1,5 µl volt, a mérést háromszor ismételtük. Mindkét oszlopról származó minták esetében az elfogadási kritérium a 0,75 mg/ml koncentráció alatti mintákat jelentette (György és mtsai 2024).

3.7.3. Western blot

Az ISEV ajánlásának megfelelően Western blot módszert is alkalmaztunk, hogy megerősítsük a vezikulák jelenlétét az izolált mintákban úgy, hogy a vezikulákra jellemző specifikus fehérjét vizsgáltuk. Az UC után a sEV pelletet 30 µl proteáz inhibitorokat (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail; Roche F. Hoffmann-La AG, Basel, Svájc) tartalmazó lízispufferben (CellLytic; Sigma, Darmstadt, Németország) felfuszpendáltuk, miközben végig jégen dolgoztunk. A protokoll validálása érdekében a SEC-frakciókat (1-8) mindkét oszloptípus esetében külön-külön elemeztük, zsebenként 15 µl fehérje lizátumból kiindulva. A gélelektroforézis előtt minden mintát 60 µl-re hígítottunk ki ugyanazzal a lízispufferrel, és 6 µl-t használtunk a mikro BCA-méréshez. Ezután 16 µl 5× Laemmli puffert (0,5 M Tris-HCL, 45 v/v% glicerin, 5 m/m% SDS, 0,25% brómfenol-kék, 12,5% béta-merkaptóetanol) adtunk a mintákhoz, hogy a fehérjét 95 °C-on 5 percig denaturáljuk, majd a mintákat a gél (Criterion TGX 8-16%, 26 lyuk; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) lyukakba pipettáztuk. Az elektroforézist jégűtött folyófürdőben 10 percig 170 V-on, majd 60 percig 160 V-on végeztük. A fehérjét ezután polivinilidén-fluorid (Immun-Blot PVDF Membrane, 0,2 µm pórusméret; Bio-Rad) membránra (wet transfer, Trans-Blot® Cell; Bio-Rad) blottoltuk 3,5 órán keresztül 80 V-on metanol transzfer pufferrel (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20 v/v% metanol; pH

8,3). A gélben lévő fehérjéket Sypro Ruby (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) festékkel (fluoreszcens festék az összes fehérjékhez) 15 percig billegtetően festettük, kétszer 5 percig 1× TBST-vel (10× TBS 100 ml, MQ 900 m, TWEEN20 500 µl) mostuk, majd fényképeket készítettünk a gélről. A membránokat ezután SuperBlock (TBS) blokkoló oldattal (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) blokkoltuk szobahőmérsékleten 1 órán át. Ezt követően a mintákat egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk anti-humán elsődleges antitestekkel, melyek nyúlból és egérből származtak. Másnap 30 perces inkubációt végeztünk kecskéből származó poliklonális anti-nyúl és anti-egér HRP-vel jelölt másodlagos antitestekkel (Abcam, Cambridge, UK). A kemilumineszcens jelhez Clarity Max Western ECL szubsztrátot (Bio-Rad) használtunk. A detektálást Imager ChemiDoc XRS+ Gel Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segítségével végeztük, a kiértékelést pedig ImageLab (Bio-Rad szoftver 6.1-es verziója) segítségével (György és mtsai 2024). A vizsgálatban használt antitesteket az **1. táblázat** tartalmazza.

1. táblázat: Western blot során használt antitestek

Antitest név	Gyártó	Katalógusszám	Koncentráció (mg/mL)	Hígítás
Anti-CD81	Sigma	HPA0072340	0.300	1:1000
Anti-ALIX	Sigma	HPA011905	0.200	1:1000
Anti-ApoA1	Abcam	AB52945	0.159	1:750
Anti-rabbit IgG-HRP	Abcam	ab205718	2.000	1:25000
Anti-mouse IgG-HRP	BioRad	1705047	0.800	1:30000
Anti-Albumin	Abcam	ab207327	0.643	1:2000
Anit-hu-IgGAM-HRP	Invitrogen	31418	0.800	1:10000

3.7.4. Transzmissziós elektronmikroszkópia

Az sEV-k vizuális kimutatása Théry és mtsai által kidolgozott protokoll szerint történt (Théry és mtsai 2018). Az immun TEM során kisebb módosításokat hajtottunk

végre (Théry és mtsai 2006, Koncz és mtsai 2023). A vezikula tartalmú mintákat (5 µl) formvarral bevont nikkelrácsra (SPI Supplies, West Chester, PA, USA) vittük fel. A 10 perces szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a felesleges folyadékot szűrőpapírral történő blottolással távolítottuk el. Az EV-eket 4%-os paraformaldehiddel (PFA) 10 percig szobahőmérsékleten fixáltuk. Ezt követően háromszor 5 percig desztillált vízzel mostuk őket. A nem specifikus kötődés megakadályozása érdekében 2%-os szacharóz (Molar Chemicals, Halásztelek, Magyarország) foszfáttal pufferolt sóoldatot (PBS) használtunk blokkolásra, 1 órás inkubációs idővel szobahőmérsékleten (Koncz és mtsai 2023). Az elsődleges antitestekhez 2%-os szacharóz-PBS oldatot használtunk, és egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk őket. Másnap három 5 perces mosást végeztünk szobahőmérsékleten, 2%-os szacharózoldattal. A másodlagos antitesteket 2%-os szacharózoldatban 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A szarvasmarha szérumalbumin (BSA) helyett 2%-os szacharózoldatot használtunk, hogy elkerüljük a nem specifikus fehérjekötődést a formvar bevonathoz, és csökkentjük a BSA-val szembeni nem specifikus immunreaktivitást. A másodlagos antitestek felvitele után a nem kötött antitesteket háromszoros mosással távolítottuk el (5 perc, szobahőmérséklet). A maradék szacharózt PBS oldattal távolítottuk el, három alkalommal 5 percig, szobahőmérsékleten. Ezt követően a mintákat 2%-os glutáraldehid oldattal (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Németország) posztfixáltuk, majd három alkalommal 5 percig desztillált vízzel mostuk (Koncz és mtsai 2023). Immunoarany jelölést követően pozitív-negatív kontrasztképzést végeztünk. A mintákat JEOL 1011 transzmissziós elektronmikroszkóppal (JEOL, Tokió, Japán) elemeztük. Az EV-k átmérőjét az ImageJ szoftver 1.8.0 verziójának felhasználásával mértük.

A CD9 vezikula marker (Théry és mtsai 2018) kimutatásához nyúlból származó anti-CD9 IgG antitestet (kat: ab92726; Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) használtunk. Másodlagos antitestként poliklonális kecske anti-nyúl IgG-t alkalmaztunk, amely 5 nm-es arany részecskékkel (kat: G7277; Sigma, Darmstadt, Németország) volt jelölve (György és mtsai 2024).

3.8. Tömegspektrometriás vizsgálatok

Az izolált vezikula mintákat fagyasztási-olvasztási ciklusoknak vetettük alá (Turiák és mtsai 2011). Ezután kilencszeres térfogatnyi jéghideg etanolt adtunk a fehérjék egy éjszakán át, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő kicsapásához. A pelletet kétszeri mosást követően $20\text{ }\mu\text{l}$ 8 M karbamid és 50 mM ammónium-bikarbonát oldatban felfuszpendáltuk. Ditiotreitolt adtunk hozzá 5 mM koncentrációban, és az oldatokat $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk 30 percig, majd a mintákat 10 mM jódetamid jelenlétében 30 percig sötétben, szobahőmérsékleten alkileztük. Az oldatokat 50 mM ammónium-bikarbonáttal tízszeresére hígítottuk. Az oldatban történő emésztést először Lys-C/tripszin keverékkel végeztük $1:100$ tömegarányban $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 1 órán keresztül, majd tripszinnel $1:10$ tömegarányban $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on egy éjszakán át. Az emésztést $1\text{ }\mu\text{l}$ hangyasav hozzáadásával állítottuk le, majd a mintákat megszáritottuk és fordított fázisú C18 oszlopon tisztítottuk a korábban leírtak szerint (Bugyi és mtsai 2022). A mintákat $0,1\%$ FA + 2% ACN-ben oldottuk, majd $1\text{ }\mu\text{g}$ fehérjét injektáltunk a készülékbe. A méréseket egy Bruker Maxis II Q-TOF tömegspektrométeren végeztük CaptiveSpray nanoBooster ionforrással, amelyhez egy Dionex Ultimate 3000 RSLC nanoUHPLC-t kapcsoltunk Acquity M-Class BEH130 C18 analitikai kapilláris oszlop (Tóth és mtsai 2021) segítségével. A peptideket és fehérjéket a Swiss-Prot humán adatbázisban kerestük a Byonic (Bern és mtsai 2012) segítségével. A tömegtűrést a prekursorionok esetében 10 ppm -re, míg a fragmentumionok esetében 20 ppm -re állítottuk be, engedélyezve 2 kihagyott hasadási helyet. A karbamidometilációt fix módosításként, míg a deamidációt és oxidációt változó módosításként kezeltük. A 2 -nél nagyobb LogProb értékkel rendelkező fehérjéket és legalább 2 egyedi peptidet fogadtunk el (György és mtsai 2024). A fehérjék mennyiségi meghatározását a MaxQuant 1.6.17.0 szoftver LFQ algoritmusának segítségével végeztük.

3.9. Statisztikai analízis

Az sEV-k statisztikai elemzését a GraphPad Prism 9.4.1 szoftverrel végeztük. A csoportátlagok közötti varianciák összehasonlítására ANOVA-t használtunk, míg a

fizikai fittségi mutatók és a fehérjetartalom közötti összefüggéseket Pearson-korrelációval elemeztük, amelyet az R 4.4.1 verziójában a nortest, lmtest és WGCNA csomagokkal valósítottunk meg (Langfelder és Horvath 2008). A homoszkedaszticitást és a normalitást a Breusch-Pagan-teszttel és a Lilliefors-teszttel vizsgáltuk. Amennyiben valamelyik feltétel sérült, a Pearson-korreláció helyett Spearman-korrelációt alkalmaztunk. A többszörös tesztekben adódó hibák szabályozására q-értékeket számítottunk, az FDR szintet pedig 0,05-re állítottuk. Az LFQ nyers értékeket log₂ transzformáltuk a normáleloszlás közelítése érdekében, és a további elemzések során ezeket az átalakított értékeket használtuk. A korrelációs elemzésekbe csak azokat a fehérjéket vontuk be, amelyek legalább a minták 90%-ában jelen voltak.

A fehérjekészlet-gazdagodási elemzést (PSEA) a PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships - fehérjék elemzése evolúciós kapcsolatokon keresztül) osztályozási keretrendszer segítségével végeztük el (Mi és mtsai 2013). A UniProt azonosítókat a Gene Ontology (geneontology.org) online felületére küldtük be, a PANTHER túlreprezentáltsági tesztet (v20240807) alkalmazva. Az annotáció verziója és megjelenési dátuma DOI: 10.5281/zenodo.12173881 és 2024-06-17 volt. A referencialistát Homo sapiens-re állítottuk (n = 20580). Az elemzéseket három fő génontológiai (Gene Ontology - GO) doménre—celluláris komponens (CC, GO:0005575), biológiai folyamat (BP, GO:0008150) és molekuláris funkció (MF, GO:0003674) - valamint a PANTHER fehérjeosztályokra (verzió: 19.0) végeztük. A túlreprezentáltságot Fisher-féle egzakt teszttel és FDR korrekcióval teszteltük (György és mtsai 2025).

3.10. EV-Track

Az EV kísérletek értelmezésének és megismétlésének megkönnyítése érdekében nagyobb átláthatóságra van szükség. Ennek elérése érdekében létrehoztak egy tudásbázist (<http://evtrack.org>), amely központosítja az EV biológiát és módszertant azzal a céllal, hogy ösztönözze a szerzőket, a bírálókat, a szerkesztőket és a finanszírozókat a kísérleti irányelvek gyakorlati megvalósítására (Van Deun és mtsai 2017). Ennek megfelelően metodikai kísérleteink összes releváns adatát benyújtottuk az EV-TRACK tudásbázisba (EV-TRACK ID: EV240007).

A módszertan kidolgozásának és validálásának, valamint a funkcionális vizsgálatok mintáinak bemutatását és elosztását a teljes mérési soron a **3. és 4. ábra** szemlélteti.

Módszertan kidolgozásának és validálásának vizsgálatai

Vizsgálat alanyai 6 férfi esetében egy 2. vérvétellel kiegészítve	Férfi	Nő		
	11 fő	8 fő		
PFP előkészítés utáni mintaszám	Összesen 37 PFP mintát készítettünk elő a 19 résztvevő véréből			
Prealitika Hematológia, abszorbancia és klinikai kémiai paraméterek	Mind a 37 PFP minta megfelelt a kritériumoknak			
sEV izolálás 21 mintát párhuzamosan izoláltunk a két oszlopon, továbbá 2 minta csak 35 nm, 8 minta csak 70 nm	35 nm oszlop	70 nm oszlop	Fagyasztott minta	Friss minta
	23 izolálás	29 izolálás	Nem izoláltunk külön	6 izolálás
sEV karakterizálás TEM és immun TEM vizsgálathoz felhasznált minták száma az izolált minták közül	35 nm oszlop	70 nm oszlop	Fagyasztott minta	Friss minta
	4 minta	4 minta	2 minta 70 nm-es oszlopról	2 minta
sEV karakterizálás NTA, NanoDrop vizsgálathoz felhasznált minták száma az izolált minták közül	35 nm oszlop	70 nm oszlop	Fagyasztott minta	Friss minta
	23 minta	29 minta	5 minta adatai 70 nm-es oszlopról	6 minta
sEV karakterizálás Western blot vizsgálathoz felhasznált minták száma az izolált minták közül	35 nm oszlop	70 nm oszlop	Fagyasztott minta	Friss minta
	4 minta	4 minta	-	-
sEV karakterizálás Tömegspektrometriás vizsgálatok az izolált mintákból	35 nm oszlop	70 nm oszlop	Fagyasztott minta	Friss minta
	9 minta	9 minta	6 minta 70 nm-es oszlopról	6 minta

3. ábra: A módszertan kidolgozásához és validálásához tartozó mintaszámok eloszlásának sematikus ábrázolása

Funkcionális vizsgálatok				
Vizsgálat alanyai Nemek szerinti csoportbeosztás a résztvevők számával	Edzett Férfi	Kontroll Férfi	Edzett Nő	Kontroll Nő
	114 fő	35 fő	80 fő	74 fő
Helyszíni vizsgálatok Terhelésélettani, antropometriai és kognitív vizsgálatok	114 fő	35 fő	80 fő	74 fő
Preanalitika Hematológia, abszorbanca és klinikai kémiai paraméterek	114 fő	35 fő	80 fő	74 fő
Fittségi besorolás 75% feletti és alatti VO ₂ max becslések alapján	High-fit Férfi	Med-Low-fit Férfi	High-fit Nő	Med-Low-fit Nő
	93 fő	50 fő	91 fő	62 fő
DNS izoláció, metilációs vizsgálatok, epigenetikai órák	93 fő	50 fő	91 fő	62 fő
Preanalitikai vizsgálatok után sEV izolálásra alkalmas minták	56 fő	10 fő	50 fő	30 fő
sEV izolálás Csak a női résztvevőkből	-	-	20 fő	20 fő
sEV izolálás validálása NTA, NanoDrop, Western blot, TEM, tömegspektrometria	-	-	20 fő	20 fő
Tömegspektrometriás vizsgálatok és statisztika	-	-	20 fő	20 fő

4. ábra: A funkcionális vizsgálatokhoz tartozó mintaszámok eloszlásának sematikus ábrázolása a metodikai soron levezetve

4. Eredmények

4.1. A trombocita-mentes plazma preanalitikai vizsgálatának eredményei

A módszertanban meghatározott kizárási kritériumok alapján 37 PFP mintát választottunk ki a pilot vizsgálatokhoz, amelyek célja a módszertan kidolgozása és validálása volt. A funkcionális vizsgálatokhoz összesen 303 mintán végzett preanalitikai vizsgálatok és a fittségi besorolás alapján 56 High-fit férfi és 10 Med-Low-fit férfi minta lett volna alkalmas a vizsgálatba, míg a nők közül 50 High-fit és 30 Med-Low-fit minta felelt meg. Mivel a férfi résztvevőkből nem tudtunk volna megfelelő elemszámú csoportot készíteni ($n=20$), ezért úgy döntöttünk, hogy 20-20 női mintával folytatjuk tovább a vizsgálatokat, így összesen 40 női PFP mintát használtunk fel a kutatás során. A következő bekezdésben együtt értékelem a pilot ($n=37$) és funkcionális ($n=40$) vizsgálatra kiválasztott PFP mintának preanalitikai eredményeit, azonban a többi vizsgálat eredményét külön értékelem a 4.2 (metodikai vizsgálatok) és 4.3 (funkcionális vizsgálatok) alfejezetben.

A 77 előkészített PFP mintából mintánként $500\ \mu\text{l}$ -t használtunk fel a preanalitikai mérésekhez. A trombocitaszámot (millió sejt/l; átlag \pm szórás = $1,00 \pm 1,57$) és a hemoglobin szintet (g/l; átlag \pm szórás = $0,35 \pm 0,48$) hematológiai analizátorral (Sysmex XE2100) megmértük. Az sEV izolálása során alkalmazott $0,8\ \mu\text{m}$ -es szűrés után a trombocitaszámot ugyanazzal a hematológiai analizátorral ismét megmértük. Az eredmények azt mutatták, hogy a trombocitaszám minden mintában nulla millió sejt/l volt ($n = 77$). Második lépésként egy ELISA olvasót használtunk, amely öt különböző hullámhosszon (450 nm, 492 nm, 540 nm, 620 nm és 690 nm) mérte az abszorbanciát, hogy kiküszöböljük a lipémia, hemolízis és ikterusz esetleges interferenciáit az izolálás során. Hemolízist 540 nm-en detektáltunk (átlag \pm szórás = $0,091 \pm 0,026$). Az ikterikusos mintákat 450 nm-en (átlag \pm szórás = $0,339 \pm 0,073$) és 492 nm-en (átlag \pm szórás = $0,258 \pm 0,055$) mértük. A lipémiát 620 nm-en (átlag \pm szórás = $0,062 \pm 0,023$) és 690 nm-en (átlag \pm szórás = $0,059 \pm 0,017$) értékeltük. Az eredmények alapján minden kiválasztott minta valóban alkalmas volt az sEV izolálásra ($n = 77$).

4.2. Metodikai protokoll beállítási és validálási eredményei

A következő részben először az izolálási protokoll beállításának és validálásának eredményei kerülnek bemutatásra, amelyek célja az adott módszer megbízhatóságának és reprodukálhatóságának biztosítása. A részletes leírásra azért van szükség, hogy a kutatási eredmények pontosak, összehasonlíthatók és tudományosan megalapozottak legyenek.

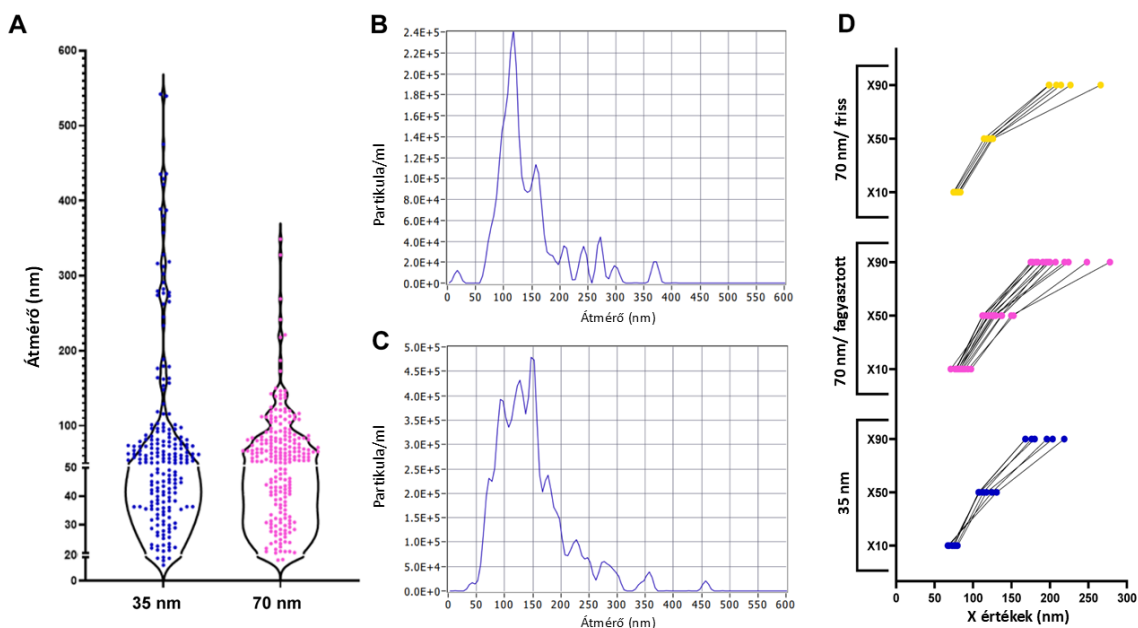
4.2.1. A 35 nm-es és 70 nm-es oszlopokon izolált kis méretű extracelluláris vezikulák karakterizálása

A 37-ből, 31 PFP mintából izoláltunk a 35 nm-es vagy a 70 nm-es oszlopok segítségével sEV-ket. Összesen 21 PFP mintát izoláltunk egyszerre mind a 35 nm-es, mind a 70 nm-es oszlopokon az összehasonlításhoz, 2 mintát kizárólag a 35 nm-es oszlopon, és 8 mintát kizárólag a 70 nm-es oszlopon. Az utóbbi 10 mintát felhasználtuk kvantifikálás céljából a tömegspektrometriás méréseknél is, valamint 6 minta 70 nm-es oszlopról kapott eredményét felhasználtuk a fagyasztott és friss minták összehasonlításánál.

A sEV-ek morfológiáját és méretét TEM-mel vizsgáltuk (n=8) a SEC után ultracentrifugált és egyesített mintákban mind a 35 nm-es (pool: 1–3; n = 210; min [nm] = 13,24; max [nm] = 542; átlag [nm] \pm szórás = $98,594 \pm 107,2$) és a 70 nm-es (pool: 2–4; n = 221; min [nm] = 17,58; max [nm] = 348,8; átlag [nm] \pm szórás = $70,83 \pm 47,96$) oszlopokon, ahol a min, max és átlag az sEV-k átmérőjét jelöli. A vezikulák alakjában tapasztalható különbségeket a mintaelőkészítés technikai sajátosságai eredményezik (György és mtsai 2024). A TEM és NTA képek részecskeszámlálása alapján három enyhén átfedő populációt különböztettünk meg: „PLP”, sEV és mEV (**5. A-C ábra**).

A **5. D ábra** a 35 nm-es (n=6) és 70 nm-es (n=13) oszlopokon izolált fagyasztott sEV-k méreteloszlását mutatja (X10, X50, X90), valamint a frissen izolált sEV-ket (n=6) 70 nm-es oszlopokon, NTA alapján értékelve. A "PLP-k" a véráramban lévő komplex

struktúrák, amelyek feladata a lipidek (beleértve a koleszterint és a triglicerideket) szállítása a testben.



5. ábra: A SEC-oszlopokon (35 nm: 1–3. frakció; 70 nm: 2–4. frakció) elválasztott sEV-k karakterizálása.

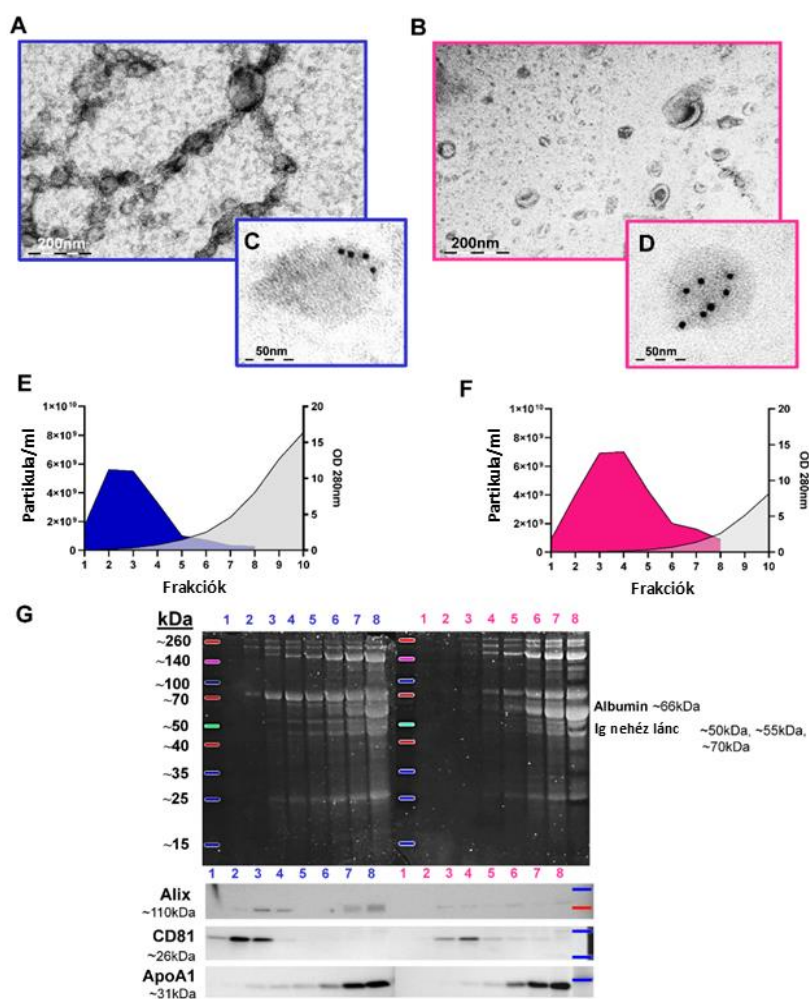
(A) Az sEV-k és részecskék méreteloszlása a 35 nm-es és 70 nm-es oszlopokon, TEM képek alapján, ImageJ szoftverrel mérve. (B) NTA kép az sEV-k és részecskék 35 nm-es oszlopról és a (C) 70 nm-es oszlopról gyűjtött frakciójáról. (D) Az NTA méreteloszlása (X10, X50, X90) a fagyasztott sEV-k esetében, amelyeket 35 nm-es és 70 nm-es oszlopokon izoláltunk, valamint frissen izolált sEV-k esetében, amelyeket 70 nm-es oszlopokon készültünk (György és mtsai 2024).

Morfológiai és immun TEM képeket is készítettünk anti-CD9 (Abcam, Cambridge, UK) EV marker elleni antitesttel, hogy azonosítsuk az EV-eket a mintában (n = 4) (**6. A–D ábra**). Az NTA eredményeket átlagoltuk és a **6. E–F ábrán** ábrázoltuk. A 70 nm-es oszlopon (n = 29) a plazmafehérjék jelenléte már a 4. frakciótól (abszorbancia > 0,100) volt kimutatható, míg a 35 nm-es oszlopon (n = 23) már a 2. frakcióban megjelentek.

Az első 4 frakció összevonásával megállapítottuk, hogy a 70 nm-es oszlop 1,24-szer több részecskét tartalmazott milliliterenként, mint a 35 nm-es oszlop. Az utolsó frakcióban (frakció 10) az átlagos abszorbancia 280 nm-en 16,394 volt a 35 nm-es oszlopnál és 8,155 a 70 nm-es oszlopnál.

A SEC után minden frakcióból 1-8-ig UC-t csináltunk, majd az ismertett mintaelőkészítés és gélelektroforézis után a gélben lévő fehérjéket SYPRO Ruby gél-

vagy membránfestéssel elemeztük (n = 8). WB elemzést végeztünk az Alix és CD81 EV markerek, valamint az ApoA1 nagy sűrűségű lipoprotein (HDL) marker esetében (**6. G ábra**). A 35 nm-es oszlopnál a fehérjék már a második frakcióban jól láthatóak voltak, míg a 70 nm-es oszlopnál inkább a 3–4. frakciók környékén jelentek meg a gélfestés alapján. Az Alix EV marker a 35 nm-es oszlop esetén 2–4. frakciókban volt erőteljesen látható, míg a 70 nm-es oszlopnál 3–6. frakciókban jelent meg. Az enyhén felhős sávok a 7. és 8. frakciókban valószínűleg nem specifikus jelet jelentenek, mivel ezekben a frakciókban magas a plazmafehérjék, például albumin és más „PLP-k” szintje. A CD81 EV marker erős jelet mutatott a 35 nm-es oszlopnál az 1–3. frakciókban és a 70 nm-es

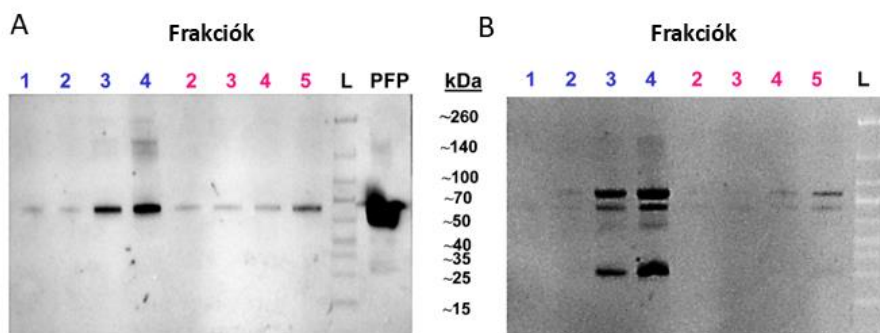


6. ábra: A 35 nm-es (kék) és a 70 nm-es (rózsaszín) oszlopon SEC módszerrel izolált sEV-k karakterizálása.

TEM-képek az sEV-k morfológiájáról (A) 35 nm-es és (B) 70 nm-es oszlopon. Immun-TEM képek az sEV-kről (C) 35 nm-es és (D) 70 nm-es oszlopon. Az sEV-k jellemzésének átlagos eredményei, amelyeket (E) 35 nm-es és (F) 70 nm-es oszlopokon izoláltunk. (G) Elektroforézis és Western blot eredmények az sEV frakciók (1–8) teljes fehérjetartalmáról (György és mtsai 2024).

oszlopnál a 3–6. frakciókban. A mintában lévő „PLP” tartalom/szennyezés kiemelésére az ApoA1 marker jelenlétét vizsgáltuk, az ApoA1 immunopozitív sávok az 35 nm-es oszlopnál a 3. frakciótól, a 70 nm-es oszlopnál pedig a 4. frakciótól kezdődően jelentek meg (György és mtsai 2024).

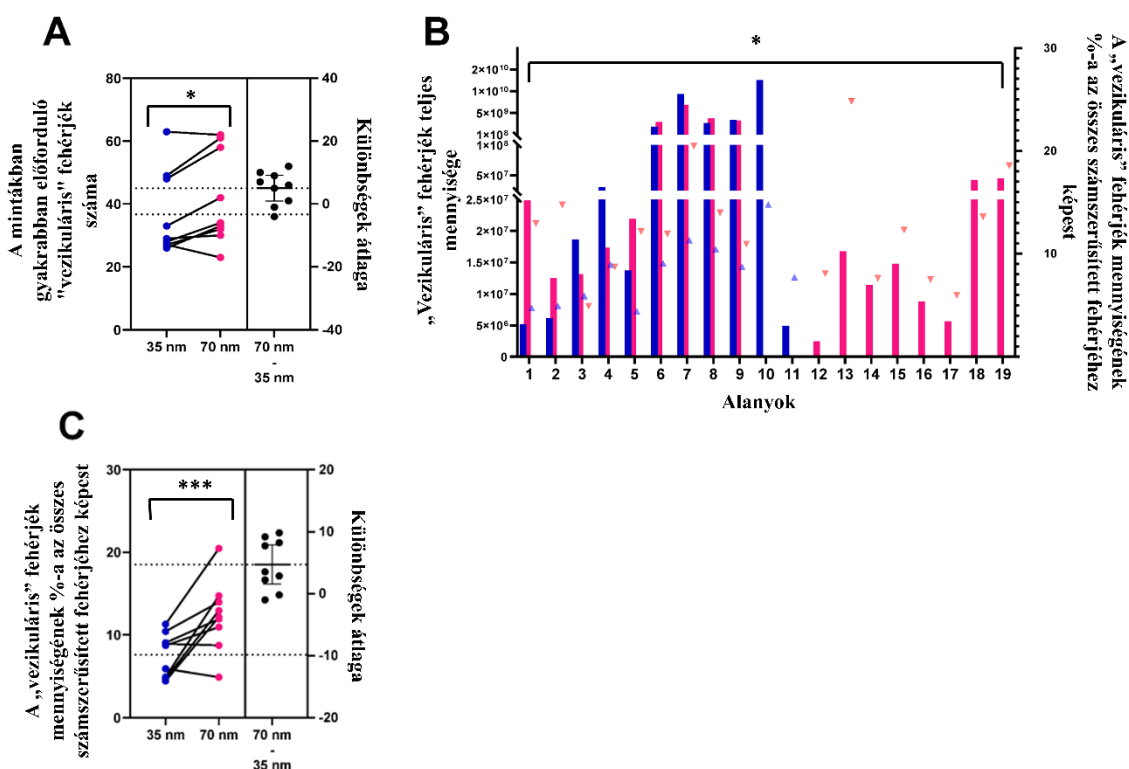
A **7. ábra** mutatja a WB eredményeket az albuminról (A), a nehéz láncú immunglobulinokról és a könnyű láncú immunglobulinról (B) a 35 nm-es (1–4. frakciók) és 70 nm-es (2–5. frakciók) oszlopokon izolált sEV-kben.



7. ábra: A 35 nm-es (1-4 frakció) és 70 nm-es (2-5 frakció) oszlopokon izolált sEV-kben az (A) albumin, a (B) nehézláncú immunglobulinok és a könnyűláncú immunglobulinok WB-eredményei (György és mtsai 2024)

MS-alapú proteomikai vizsgálatokat végeztünk kilenc alany mintáin, amelyeket mind a 35 nm-es, mind a 70 nm-es SEC-oszlopokon elválasztottunk (összesen $n = 18$), majd ultracentrifugáltunk. A kvantifikálás pontosságának növelése érdekében további 10 mintát is bevontunk az elemzésbe (2 minta a 35 nm-es, 8 minta a 70 nm-es oszlopról). A 35 nm-es és 70 nm-es SEC oszlopok esetében az 1–3, illetve a 2–4 frakciók "pool" mintáit használtuk. Jelölés nélküli kvantitatív proteomikai elemzést végezve összesen 74 fehérjét kvantifikáltunk, amelyek az ExoCarta Top100 exoszóma fehérje között szerepelnek, valamint 539 „nem-vezikuláris” fehérjét. Az eredményeket páronként összehasonlítottuk (**8. A, C ábra, 9. A ábra, 11. A és 13. B ábra**) a mintában gazdagabban jelenlévő fehérjék száma, valamint a kvantifikált „vezikuláris”, „nem-vezikuláris” és „PLP” fehérjék össz mennyisége alapján. A kvantifikált „vezikuláris” fehérjék száma 20 és 63 között mozgott, míg a kvantifikált „nem-vezikuláris” fehérjék száma 114 és 381 között változott az összes vizsgált mintában (**8. A ábra és 11. A ábra**). Hat „vezikuláris” fehérje (A2M, ANXA1, ANXA2, CD5L, GAPDH és LGALS3BP) minden mintában kimutatható volt (**Függelék A**). Az elemzés azt mutatta, hogy a 70 nm-es oszlopon a „vezikuláris” fehérjék

menyisége magasabb volt, mint az összes kvantifikált fehérjének (8. B ábra), és az arányok megoszlása $8,27\% \pm 3,18$ a 35 nm-es oszlopon, és $12,31\% \pm 5,27$ a 70 nm-es oszlopon (György és mtsai 2024). A statisztikai elemzés a két oszlop összehasonlításánál szignifikáns különbséget mutatott minden adatunkban az eltérő minták összehasonlításánál (8. B ábra, jobb oldal). Továbbá, egy páros t-teszt kilenc pár esetben szignifikáns különbséget mutatott (8. C ábra).

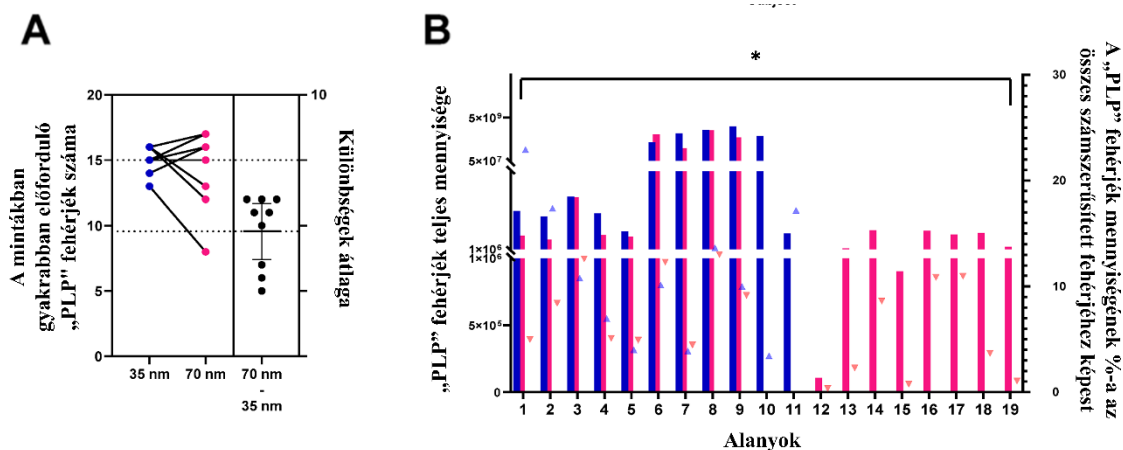


8. ábra: SEC módszerrel izolált sEV-k „vezikuláris” fehérjéinek tömegspektrometriás adatelemzése 35 nm-es (kék) és 70 nm-es (rózsaszín) oszlopokról.

(A) A „vezikuláris” fehérjék (* $p < 0,05$) száma a mintákban. (B) Bal y tengelyen a „vezikuláris” fehérjék teljes mennyisége a mintákban, és jobb y tengelyen a „vezikuláris” fehérjék mennyiségének %-a az összes számszerűsített fehérjéhez képest (* $p < 0,05$). (C) Az ábra a „vezikuláris” fehérjék arányát (%) szemlélteti az összes számszerűsített fehérjéhez viszonyítva (** $p < 0,001$). A vonalak az ugyanazon alanyok mintáit kötik össze (György és mtsai 2024).

Nem voltak különbségek az azonosított „PLP” (APOA, APOA1, APOA2, APOA4, APOB, APOC1, APOC2, APOC3, APOC4, APOD, APOE, APOF, APOL1, APOM és APOH) fehérjék számában (9. A ábra). Az elemzés azt mutatta, hogy a 70 nm-es oszlophoz képest a „PLP” fehérjék aránya az összfehérjéhez viszonyítva nagyobb volt a 35 nm-es oszlopon (9. B ábra). Az arányok a következők voltak: $10,94\% \pm 6,34$ a 35 nm-es oszlopon és $6,68\% \pm 4,36$ a 70 nm-es oszlopon. Az eredmények azt mutatják, hogy

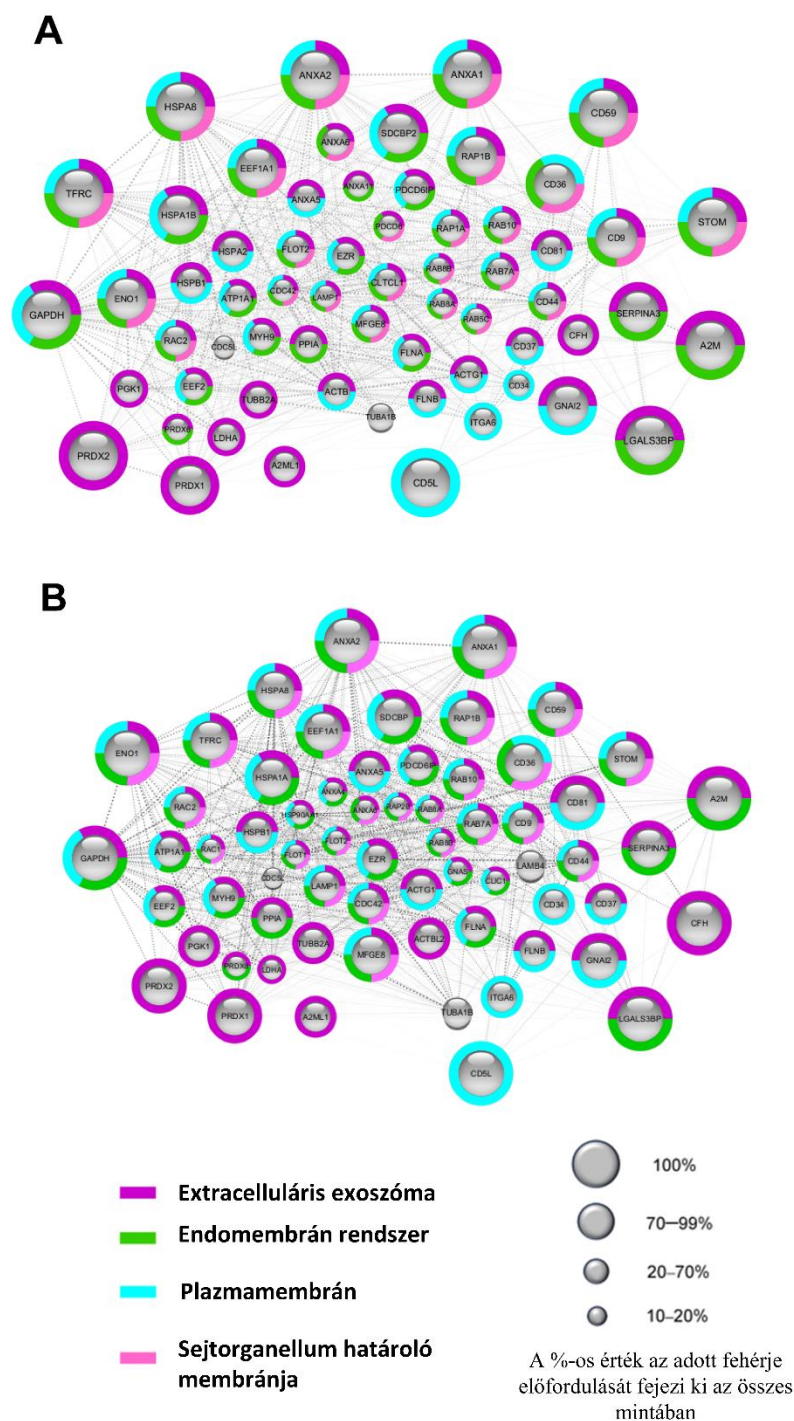
a 35 nm-es oszlopon végzett izolálás során ugyanazon típusú, azonban nagyobb mennyiségű "PLP" részecske maradt a mintákban, mint a 70 nm-es oszlop alkalmazása esetén.



9. ábra: SEC módszerrel izolált sEV-k „PLP” fehérjéinek tömegspektrometriás adatelemzése 35 nm-es (kék) és 70 nm-es (rózsaszín) oszlopokról.

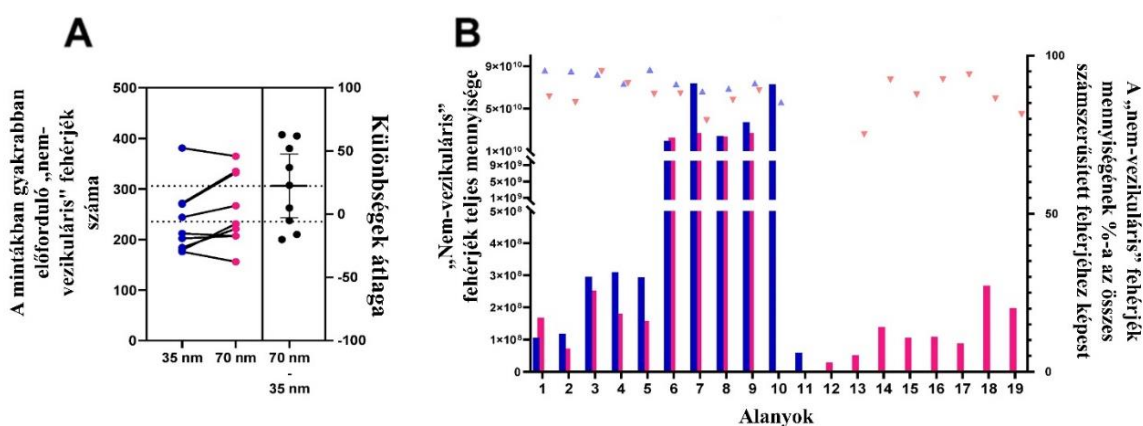
(A) A „PLP” fehérjék száma a mintákban. (B) Bal y tengelyen a „PLP” fehérjék teljes mennyisége a mintákban, és jobb y tengelyen a „PLP” fehérjék mennyiségének %-a az összes számszerűsített fehérjéhez képest (*p < 0,05) (György és mtsai 2024).

A **10. A, B ábrák** a 35 nm-es és 70 nm-es oszlopokon talált „vezikuláris” fehérjéket mutatják. A **Függelék B** a „nem-vezikuláris” fehérjéket ábrázolja, a 35 nm-es oszlopról kvantifikált fehérjéket felhasználva. A „vezikuláris” fehérjék STRING elemzése tipikus vezikulákkal kapcsolatos biológiai folyamatokat és sejt szerkezeti GO annotációkat azonosított, például „extracelluláris exoszómák” lila színnel jelölve (GO:0070062), „endomembrán rendszer” zöld színnel jelölve (GO:0012505), „plazma membrán” kék színnel jelölve (GO:0058865) és „sejtorganelum határoló membránja” rózsaszínnel jelölve (GO:0098588). A 74 azonosított „vezikuláris” fehérjéből 71 rendelkezett annotációval. Az ábra csak a 10%-os küszöbértéket meghaladó találatokat mutatja (minimálisan két mintában kvantifikált), így a 35 nm-es oszlop esetében 62, míg a 70 nm-es oszlop esetében 66 fehérjét ábrázol (**10.A, B ábra**). A keresési eredmények teljes listája a **Függelék A, C és D táblázatokban** található (György és mtsai 2024).



10. ábra: A „vezikuláris” fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatok klaszterelemzése.
 A STRING adatbázisból származó fehérjehálózatokat a Cytoscape szoftver StringApp alkalmazásával nyertük ki. Minden pont egy fehérjét reprezentál, és a pontozott vonalak jelzik a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat. A gráfban a „vezikuláris” fehérjék pontjainak mérete arányos a mintákban való előfordulásával, a főbb csoportokat színek jelölik. A „vezikuláris” eredet fehérjéket (A) 35 nm-es és (B) 70 nm-es oszlopokon izoláltuk (a 10%-os küszöbértéket meghaladó eredmények kerültek bemutatásra: minimálisan két mintában kvantifikált) (György és mtsai 2024).

Másrésről, a „nem-vezikuláris” fehérjéken végzett hálózatelemzés azt mutatta, hogy specifikus fehérjecsoportok, például „PLP” és immunglobulinok („immunoglobulin komplex” GO:0019814) kiemelkedő mértékben voltak jelen a „vezikuláris” fehérjékkel együtt, ami biológiai kapcsolatot vagy analitikai hasonlóságot jelez a csoportok között. A tisztaság és egyszerűség érdekében ábránkon csak az immunglobulin csoportokat tüntettük fel. Az összes fehérjét tekintve a „nem-vezikuláris” fehérjék (11. ábra) a 35 nm-es oszlop esetében a fehérjék 91,73% ± 3,04-át, míg a 70 nm-es oszlop esetében 87,69% ± 5,12-át tették ki (amelyből a 35 nm-es és 70 nm-es oszlopok esetében 48,72% ± 19,08, illetve 44,21% ± 16,15 immunglobulin volt) (12. ábra).

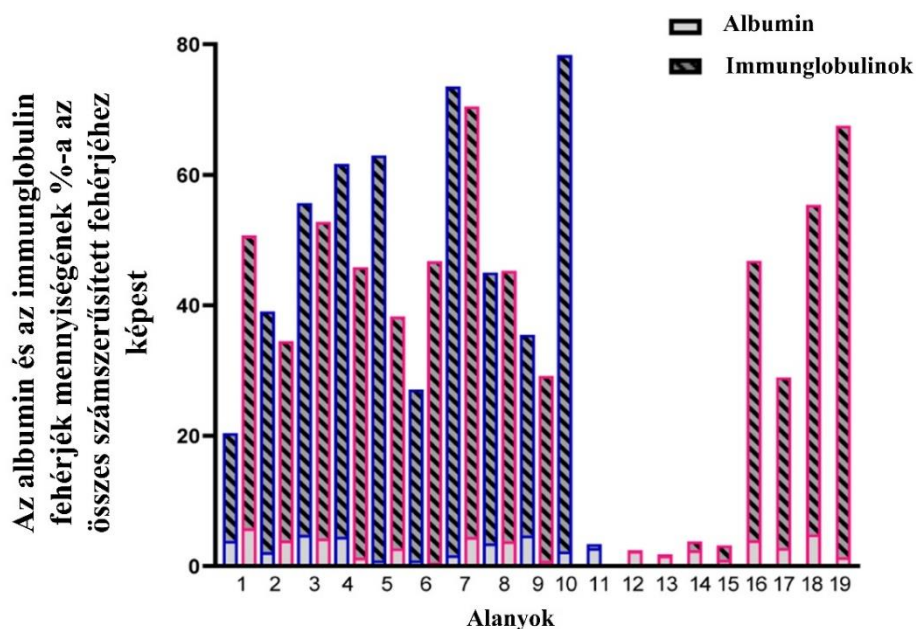


11. ábra: SEC izolált sEV-k „nem-vezikuláris” fehérjéi: tömegspektrometriás adatelemzés 35 nm (kék) és 70 nm (rózsaszín) oszlopkról.

(A) A „nem-vezikuláris” fehérjék száma a mintákban. (B) Bal y tengelyen a „nem-vezikuláris” fehérjék teljes mennyisége a mintákban, és jobb y tengelyen a „nem-vezikuláris” fehérjék mennyiségének %-a az összes számszerűsített fehérjéhez képest. A vonalak az ugyanazon alanyok mintáit kötik össze (György és mtsai 2024).

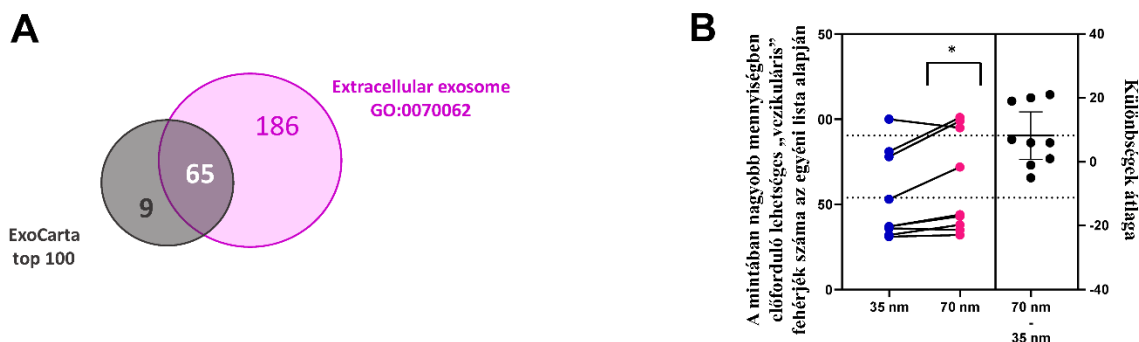
A második leggyakoribb fehérjecsoport, amelyet „PLP-nek” (GO:0034358) kategorizálunk, a „nem-vezikuláris” fehérjék 11,82% ± 6,35-át, és 7,51% ± 4,62-át tette ki a 35 nm-es és a 70 nm-es oszlopok esetében (György és mtsai 2024). Ezenkívül a „komplement rendszer” (CL:18846) és a „hemosztázis, valamint vérrög feloldása” (CL:18731) fehérjéi is azonosításra kerültek. A **Függelék B** ábrán kiemeltük azokat az összetevőket, amelyek rózsaszín színnel vannak jelölve, és amelyek az EV-k koronájának részét képezhetik, mint például a lipid kettősréteg, amely az EV-k meghatározó komponense („sejtorganellum határoló membránja” GO:0098588) és az albumin (fekete színnel kiemelve). Az albumin az EV felületéhez kötődik, és az anyagcsere részeként integrált komponensévé válik. Ugyanakkor jelentős plazma eredetű kontaminánsként is megjelenik jelentős mennyiségben. A kettő közötti specifikus arány még nem ismert. Bár

az ExoCarta Top100-as fehérje listáján szerepel az albumin is a fent említett okokból külön szerepeltették az elemzésben. A plazma membrán fehérjék és a sejt felszíni fehérjék világoskék színnel vannak jelölve. Megjegyzendő, hogy az EV koronához tartozó összetevőket még nem sorolták fel az ExoCarta Top100-as „vezikuláris” fehérjei között.



12. ábra: Albumin és immunglobulin aránya az összes fehérjéhez képest 35 nm (kék) és 70 nm (rózsaszín) oszlopokon (György és mtsai 2024)

Összehasonlítottuk az ExoCarta Top100 által azonosított fehérjéket az „extracelluláris exoszómákkal” (GO:0070062) kapcsolatos fehérjékkel, ahogy azt a **Függelék A** tartalmazza. Az összehasonlító elemzést Venn diagramon ábrázoltuk (**13. A. ábra**). Összesen 186 fehérjét kaptunk, amelyek szerepeltek a GO listán (**Függelék E**). Ebből a "PLP", immunglobulin-, hemosztázis- és komplement fehérjék kizárásra kerültek. Bár biológiailag relevánsak lehetnek az EV-koronában, jelen vizsgálatunk célja az EV-specifikus fehérjék feltérképezése volt, ezért szükségesnek tartottuk a szűrésüket. Továbbá, kizártuk azokat a fehérjéket, amelyek csak egyszer szerepeltek mindkét oszlopban, így egy végső, 130 fehérjéből álló listát kaptunk, amely a mi egyéni, szűkített listánkat képezi (**Függelék C, D**). A páros t-tesztet erre a 130 fehérjére elvégezve (**13. B. ábra**) magasabb találati arányt mutattunk ki a 70 nm-es oszlop esetében. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a 70 nm-es oszlop esetén a „vezikuláris” fehérjék magasabb találati aránnyal fordultak elő, mint a 35 nm-es oszlop esetében, ami arra utal, hogy a 70 nm-es oszlopból származó mintákban több EV-fehérje volt kimutatható (György és mtsai 2024).



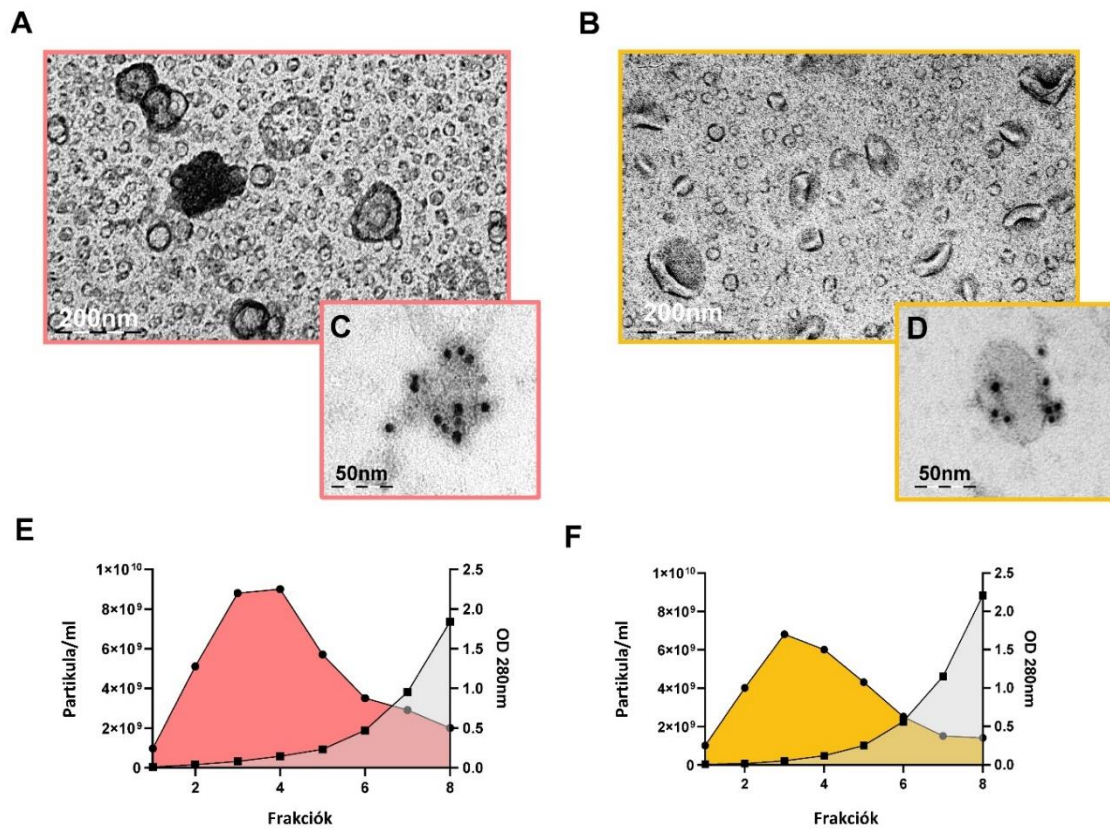
13. ábra: (A) Venn-diagram, valamint (B) a mintákban nagyobb mennyiségben előforduló, lehetséges „vezikuláris” fehérjék száma az egyéni listák alapján. Az adatok a 35 nm-es (kék) és a 70 nm-es (rózsaszín) frakcióból izolált sEV-kből származnak (* $p < 0,05$) (György és mtsai 2024).

4.2.2. A 70 nm-es oszlopon friss és fagyasztott trombocita-mentes plazmából izolált kis méretű extracelluláris vezikulák karakterizálása

Szerettük volna összehasonlítani a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on több mint 2,5 évig tárolt fagyasztott PFP-ből ($n = 6$), valamint a frissen vett vérből ($n = 6$) izolált sEV-eket. A fagyasztott minta adataihoz ($n = 6$) a 70 nm-es oszlop eredményeit használtuk. Az előző elemzésünkben, a 35 nm-es és 70 nm-es SEC-oszlopok összehasonlítása során azt találtuk, hogy a 70 nm-es oszlopból származó mintákban több EV-fehérje volt kimutatható, miközben a lipoproteinek aránya alacsonyabb volt. A lipoproteinek egy része azonban a vezikulák protein/lipid koronájához kapcsolódhat, így nem minden "PLP" tekinthető valódi kontaminációnak. Ennek megfelelően a további vizsgálatokhoz a 70 nm-es oszlopot választottuk, és az 1–8. frakciókat izoláltuk.

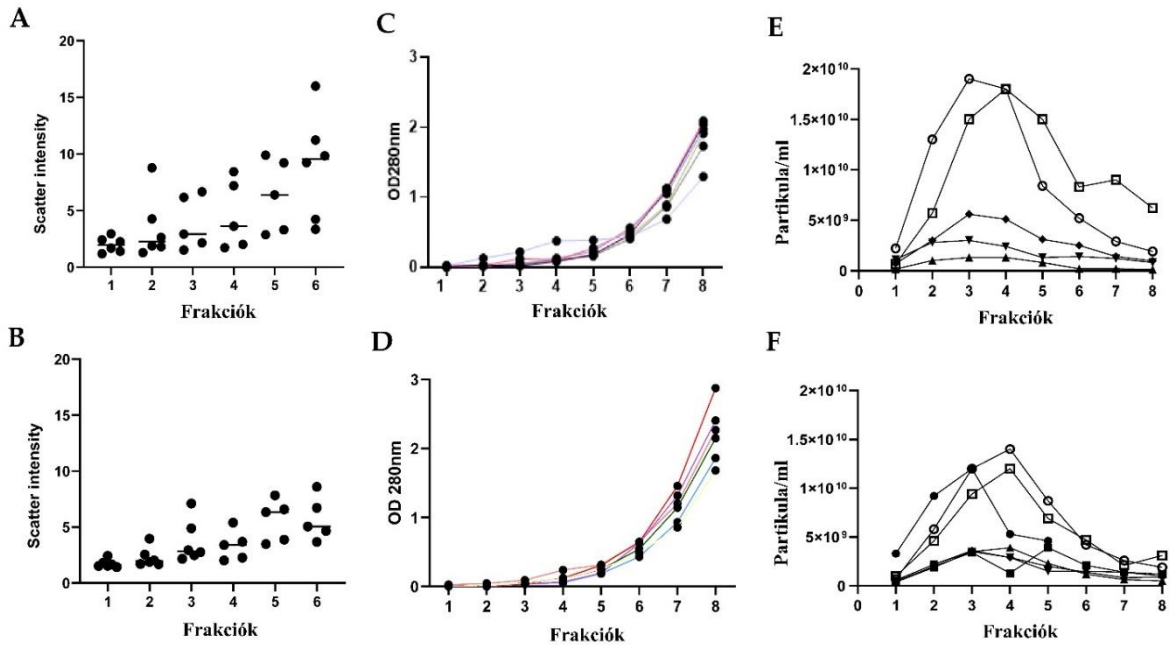
A fagyasztott (2–4 frakciók "poolja") és friss (2–4 frakciók "poolja") mintákból származó sEV-eket TEM segítségével vizsgáltuk, az eredmények a **14.A–D ábrán** találhatóak. A minták „poolozása” előtt megmértük a frakciókban lévő részecskeszámot NTA-val (részecske/ml), a fehérjeabszorbanciát 280 nm-en pedig NanoDrop műszerrel. A mérésekhez tartozó eredmények átlagolt adatai a **14. E, F ábrán** kerülnek bemutatásra.

Az előző mérések nem átlagolt adatait a **15. A-F ábra** mutatja. Nem volt különbség a két mintatípus között. Hasonlóan nem találtunk különbséget a Scatter Intensity-ben az 1–6 frakciók között a fagyasztott (n = 5) és friss (n = 5) mintákban (**15. A, B ábra**). Azt feltételezzük, hogy a NTA-val mért Scatter Intensity összefüggésben állhat a mintában jelen lévő "PLP" kontaminációval (György és mtsai 2024).



14. ábra: A SEC 70 nm-es oszlopról izolált sEV-k karakterizálásának átlag eredményei fagyasztott (narancssárga) és friss (sárga) PFP-minták esetén.

TEM-képek az sEV-k morfológiájáról (A) fagyasztott és (B) friss mintákból. Immun-TEM képek az sEV-kről (C) fagyasztott és (D) friss mintákból. Az sEV-k jellemzésének átlagos eredményei (E) fagyasztott és (F) friss mintákból izolálva (György és mtsai 2024).

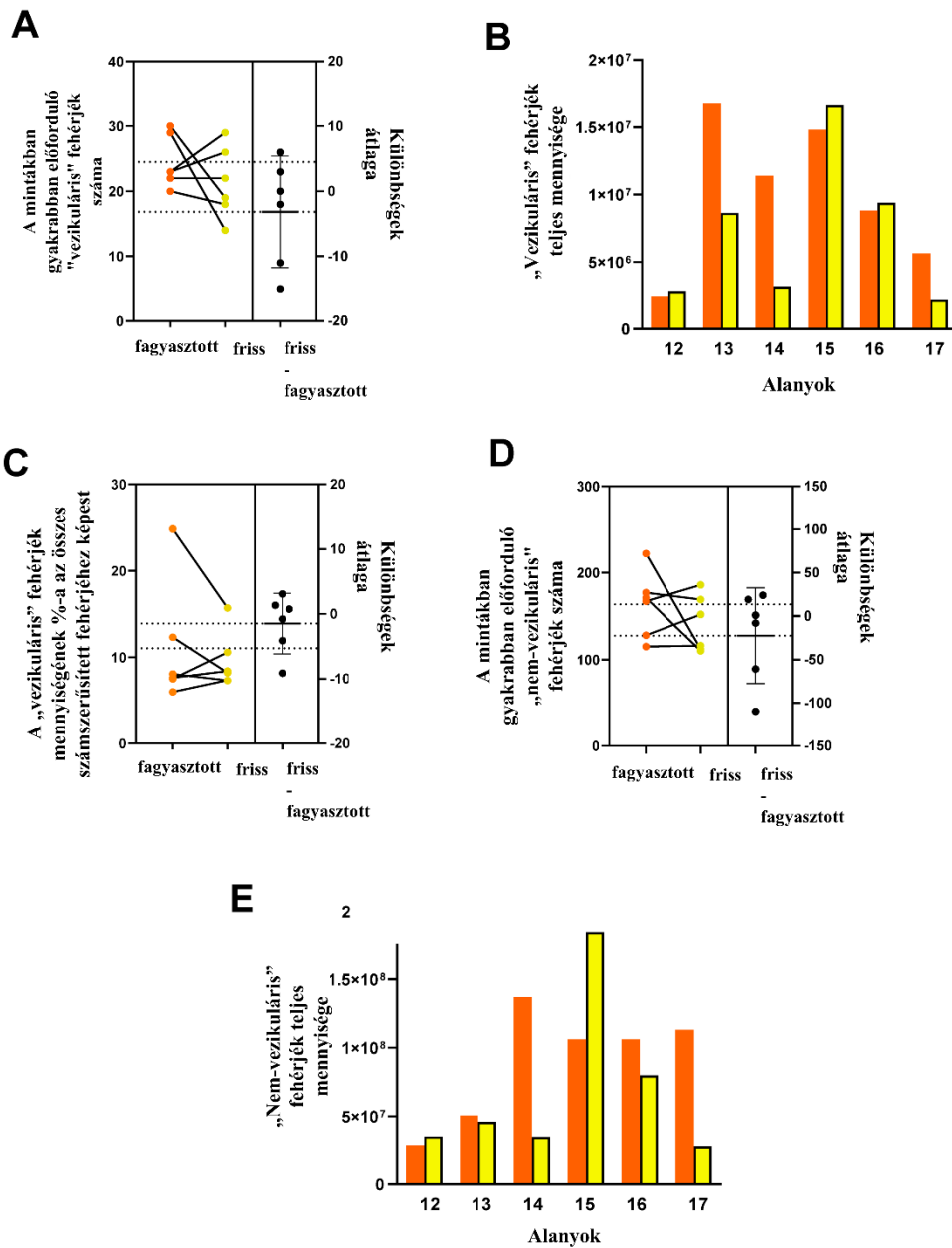


15. ábra: A SEC 70 nm-es oszlopról izolált sEV-k karakterizálása (B, D, F) friss és (A, C, E) fagyasztott PFP esetében egyaránt.

(A-B): A grafikon x-tengelye az 1-6 frakciókat mutatja, míg az y-tengely a Scatter intensityt, az NTA (ZetaView) műszerrel mért paramétert. (C-D): A grafikon x-tengelye az 1-8 frakciókat mutatja, míg az y-tengely a Nanodrop készülékkel 280 nm-en mért abszorbanciát ábrázolja. (E-F): Az y-tengelyen az NTA műszerrel mért sEV frakciók koncentrációit (részesecske/ml), az x-tengelyen pedig az 1-8 frakciókat ábrázoljuk (György és mtsai 2024).

Összesen 35 “vezikuláris” és 279 “nem-vezikuláris” fehérjét kvantifikáltunk. A “vezikuláris” fehérjék száma 14 és 30 között változott, míg a “nem-vezikuláris” fehérjék száma 110 és 222 között volt mintánként (16. A, D ábra).

Az 16. B és E ábrák a “vezikuláris” és “nem-vezikuláris” fehérjék összes mennyiségét mutatják hat pár minta esetén. A hat párra végzett páros t-teszt elemzés eredménye alapján a “vezikuláris” fehérjék összes számszerűsített fehérjéhez viszonyított arányában nem találtunk szignifikáns eltérést a két csoport között (16. C ábra), ami arra utal, hogy a vezikuláris fehérjeprofил hasonló a két csoportban. Az eredmények tehát azt sugallják, hogy nincs egyértelmű kapcsolat a proteomikai profil és a minta eredete (friss vs. fagyasztott) között. Ezért a fagyasztott minták ugyanolyan alkalmasak további elemzésre (György és mtsai 2024).



16. ábra: A SEC 70 nm-es oszlopról izolált sEV-k MS-adatainak elemzése fagyasztott (narancssárga) és friss (sárga) PFP-mintákban.

A vonalak az ugyanazon alanyok mintáit kötik össze. (A) Az „vezikuláris” és (D) „nem-vezikuláris” fehérjék száma fagyasztott és friss mintákból. (B) A „vezikuláris” és (E) „nem-vezikuláris” fehérjék teljes mennyiségének összehasonlítása fagyasztott és friss mintákban. (C) Az ábra a „vezikuláris” fehérjék arányát (%) mutatja az összes számszerűsített fehérjéhez viszonyítva 6 mintapár esetén (György és mtsai 2024).

4.3. Az edzettség mértékének hatása a vezikulákra

A módszertani kérdéseket sikeresen tisztáztuk, és alkalmaztunk a High-fit és Med-Low-fit csoportok alanyainak vérmintáin is. A két csoport alanyain számos vizsgálatot

végeztünk (terhelésélettani, antropometriai, kognitív, vérvétel) mindkét helyszínen, valamint önbevallásos kérdőívvel lényeges információkat szereztünk meg például egészségi állapotukról, életmódbeli szokásaikról. A vizsgált csoportok edzési és táplálkozási jellemzőit tekintve, a High-fit csoportban a rendszeres testmozgással töltött évek száma átlagosan $20,32 \pm 14,90$ év volt, míg a heti edzések időtartama $9,11 \pm 4,28$ óra. A csoport étrendi szokásait tekintve 4 fő vegetáriánus étrendet követett, 15 fő nem alkalmazott speciális étrendet, míg 2 fő gluténmentes étrendet követett. A Med-Low-fit csoportban a rendszeres testmozgással töltött évek száma átlagosan $15,05 \pm 15,94$ év volt, míg a heti edzések időtartama $5,91 \pm 4,51$ óra. Ebben a csoportban 1 fő vegetáriánus étrendet követett, 19 fő nem alkalmazott speciális étrendet, míg senki sem étkezett gluténmentesen. Számos mérési eredmény állt rendelkezésünkre (**2. táblázat**), ezért következő lépésünk az volt, hogy az sEV mintákban található proteomikai elemzéssel összevessük őket, és értelmezzük az így kapott adatokat.

2. táblázat: High-fit és Med-Low-fit alanyok terhelésélettani, antropometriai és kognitív eredményeinek átlagértékei és szórásai statisztikai különbségekkel

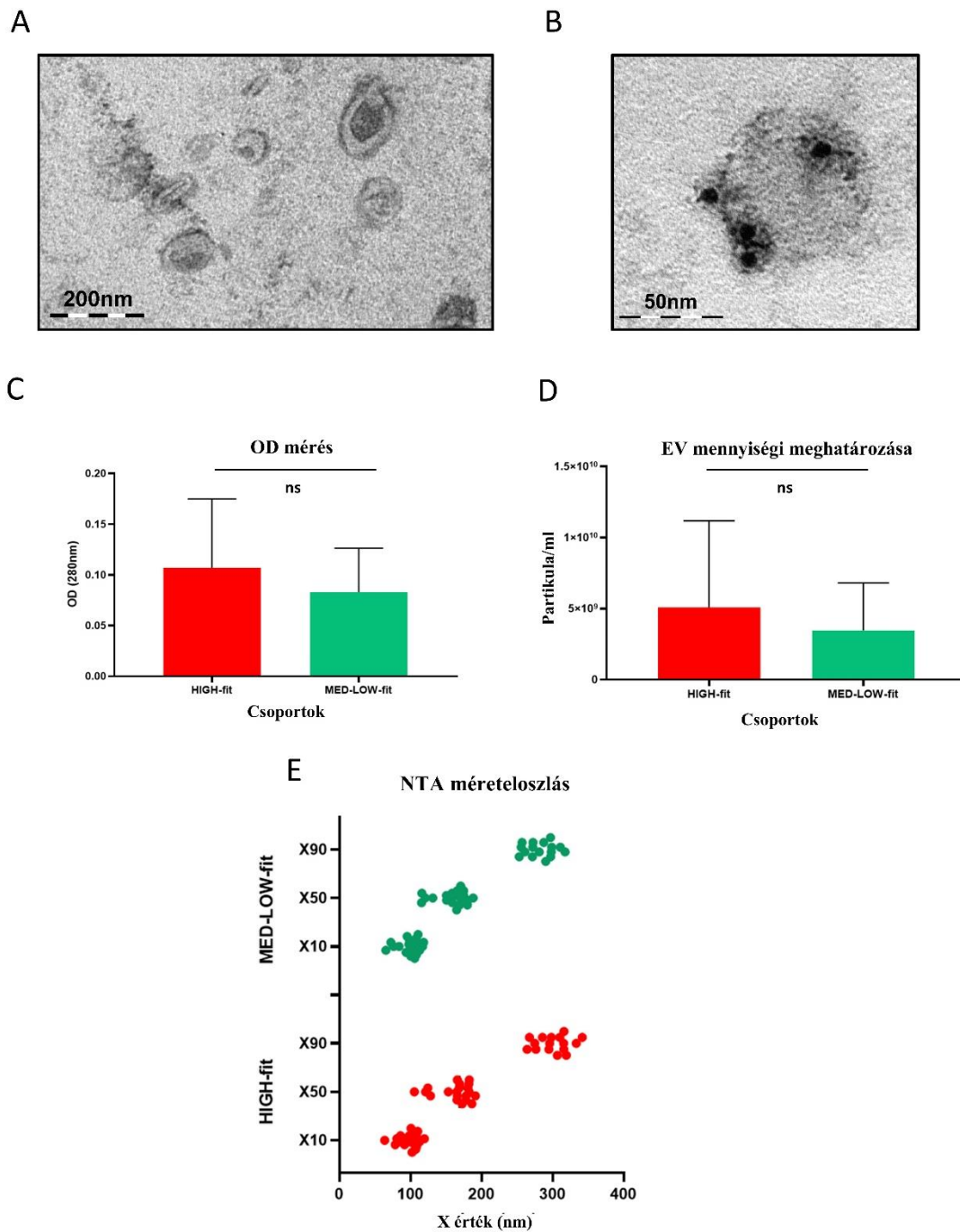
		High-fit (n=20)	Med-Low-fit (n=20)	p-érték (t-próba)
Életkor	átlag±szórás	57,650±9,783	57,500±9,583	0,962
VO ₂ max (ml/min/kg)	átlag±szórás	44,721±6,564	33,906±8,744	<0,001****
Testtömeg (kg)	átlag±szórás	68,255±9,054	66,990±8,618	0,653
Testmagasság (cm)	átlag±szórás	169,395±4,081	164,305±6,443	0,005**
BMI	átlag±szórás	23,460±3,129	24,890±3,282	0,167
Max. felugrási magasság (cm)	átlag±szórás	29,455±5,686	24,620±6,567	0,018*
Max. kézi szorítóerő/testsúly (kg/BM)	átlag±szórás	37,010±4,402	28,375±5,254	<0,001****
LDL	átlag±szórás	3,057±0,497	3,304±0,550	0,144
HDL	átlag±szórás	1,971±0,378	1,672±0,366	0,015*
Kognitív teszt	átlag±szórás	6,600±1,273	6,150±0,988	0,219
DNAmPhenoAge akcerelarációja	átlag±szórás	0,340±5,312	-1,521±6,340	0,321
DNAmGrimAge akcerelarációja	átlag±szórás	-1,444±3,092	-0,866±3,516	0,584
DNAmFitAge akcelerációja	átlag±szórás	-0,586±3,350	0,582±3,170	0,968

4.3.1. Az izolált kis méretű extracelluláris vezikulák analízise metodikai megfelelőség szempontjából

Mivel az NTA módszer önmagában nem képes megkülönböztetni a „vezikuláris” és „nem-vezikuláris” részecskéket, ezért a vezikulák azonosításához TEM-vizsgálat is szükséges volt. A morfológiai jellemzést és az immun-TEM vizsgálatot anti-CD9 antitest (Abcam, Cambridge, UK) segítségével végeztük, amely az EV-ket jelölte a mintákban (**17. A, B ábra**). A TEM elemzés kimutatta, hogy a mintákban tipikus csésze alakú szerkezettel (cup-shaped) rendelkező EV-k találhatók.

A fehérje-abszorbanáciát 280 nm-en mértük NanoDrop műszerrel. Minden esetben a teljes fehérjekoncentráció a kizárási kritériumként meghatározott 0,75 mg/ml alatt maradt. Az adatok a **17. C ábrán** láthatóak. Egyik esetben sem mutatkozott szignifikáns különbség a csoportok között.

Az NTA segítségével vizsgáltuk az sEV-k méreteloszlását és koncentrációját (**17. D, E ábra**). Az sEV-frakciókban a méretbeli átfedés miatt helyenként mEV-mérettartományba eső vezikulák is előfordulhatnak. A koncentrációra vonatkozó kizárási kritérium 1×10^9 részecske/ml volt. Az átlagos részecskekoncentráció $5,08 \times 10^9$ részecske/ml volt a High-fit csoportban és $3,46 \times 10^9$ részecske/ml a Med-Low-fit csoportban. A High-fit csoport esetében az NTA által mért átlagos méretek (nm) a következők voltak: X10 értékek \pm SD = $98,0 \pm 13,6$; X50 értékek \pm SD = $163,2 \pm 24,4$; és X90 értékek \pm SD = $277,9 \pm 51,7$. A Med-Low-fit csoport esetében az NTA által mért átlagos méretek (nm) a következők voltak: X10 értékek \pm SD = $98,7 \pm 14,4$; X50 értékek \pm SD = $158,1 \pm 21,6$; és X90 értékek \pm SD = $265,4 \pm 39,6$ (György és mtsai 2025).

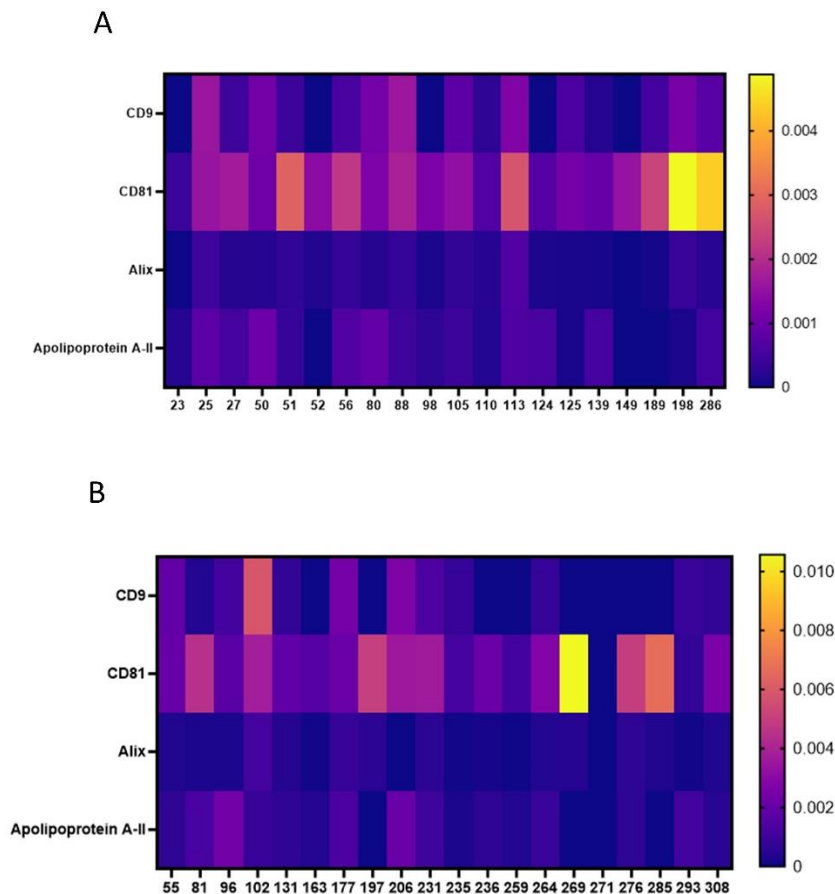


17. ábra: A High-fit (piros) és a Med-Low-fit (zöld) csoportokból izolált sEV minták elemzése.

(A) TEM-képek az sEV-ek morfológiájáról, (B) Immun-TEM képek az sEV-kről. Az sEV-k jellemzésének átlagos eredményei a High-fit és Med-Low-fit csoportokból: (C) Nanodrop abszorbancia eredmények (OD280), (D) NTA eredmények részecske/ml-ben, és (E) az NTA méreteloszlás (X10, X50, X90) (György és mtsai 2025).

A hőtérkép ábrázolása (**18. A, B ábra**) a vezikuláris markerek (CD9, CD81, Alix) intenzitását mutatja a High-fit és a Med-Low-fit csoportok mintáiban, a teljes

fehérjeintenzitáshoz viszonyítva az MS adatok alapján. A CD81 jelenlétét 40 mintából 39-ben detektáltuk, míg a CD9-et 40 mintából 27-ben, és az Alix-et 40 mintából 37-ben mutattuk ki. Az apolipoproteinek a plazmamintákban együtt izolálódhatnak a vezikulákkal, amit a mintákban detektált Apolipoprotein A-II (ApoA-II) fehérje jelenléte is jelez (György és mtsai 2025). A fehérje markerek elemzését a MISEV2023 irányelveinek megfelelően végeztük.

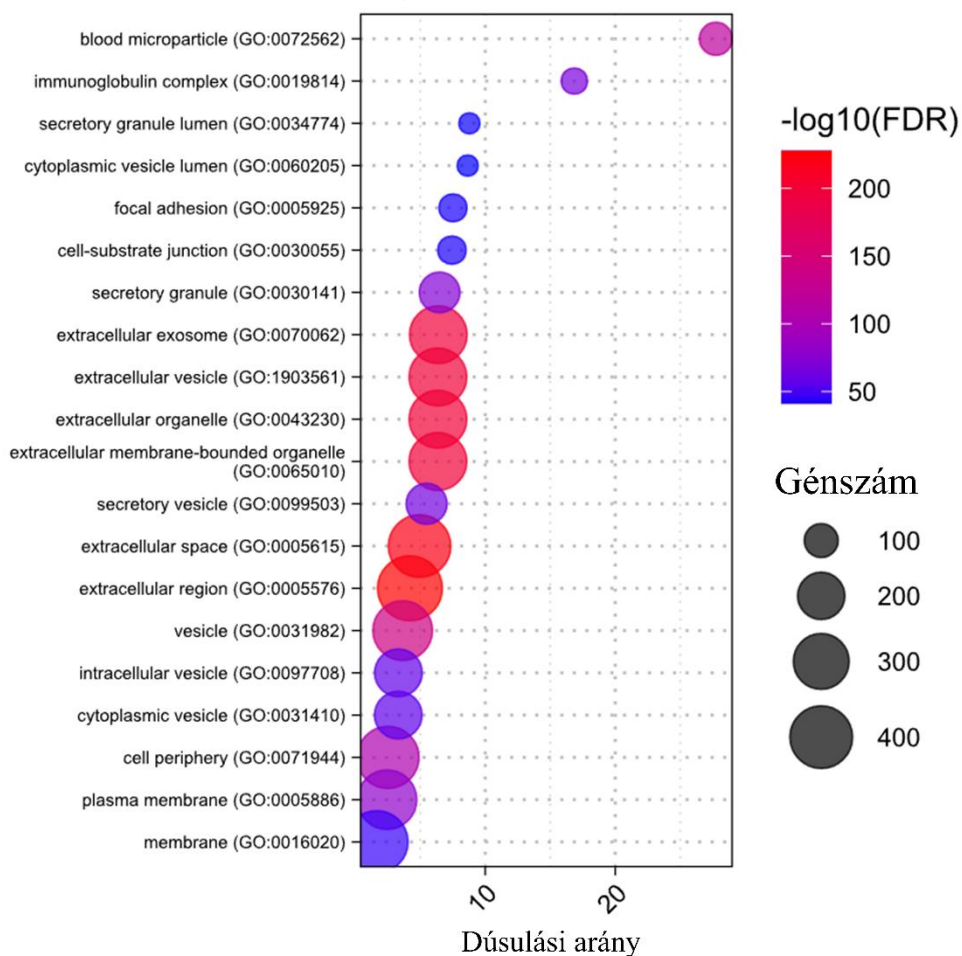


18. ábra: A High-fit és a Med-Low-fit csoportokból izolált sEV minták vezikula markereinek elemzése.

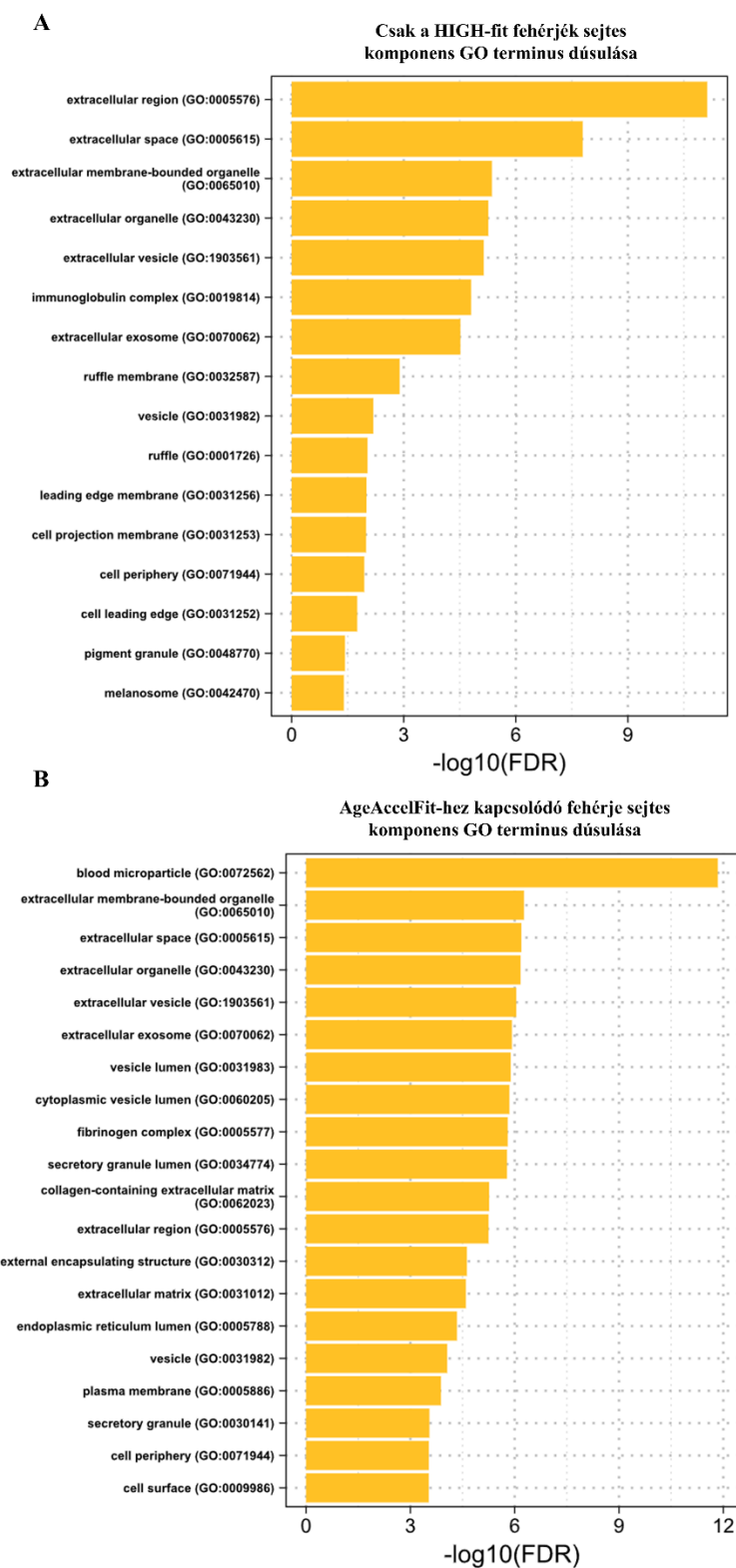
A hő térkép a vezikula markerek relatív intenzitását mutatja a (A) High-fit és (B) Med-Low-fit minták esetében, összehasonlítva a teljes fehérje intenzitással, az MS adatok alapján (György és mtsai 2025).

A GO-terminus (Gene Ontology term) dúsulási analízis eredményei (**19. ábra, 20. A, B ábra**) tovább igazolják a minták vezikuláris tartalmát, mivel kiemelik az olyan génontológiai kifejezések dúsulását, amelyek vezikuláris biológiai folyamatokkal, molekuláris funkciókkal és sejtszerkezeti komponensekkel kapcsolatosak.

GO terminus dúsulási analízis sejtés komponensekre vonatkozóan



19. ábra: A vizsgált fehérjék sejt szintű eloszlását mutató GO analízis eredményei. A fehérjék azonosított sejt szerkezeti és organeláris lokalizációja az X tengelyen, a statisztikai szignifikancia ($-\log_{10}$ p-érték) az Y tengely jobb oldalán látható (György és mtsai 2025).



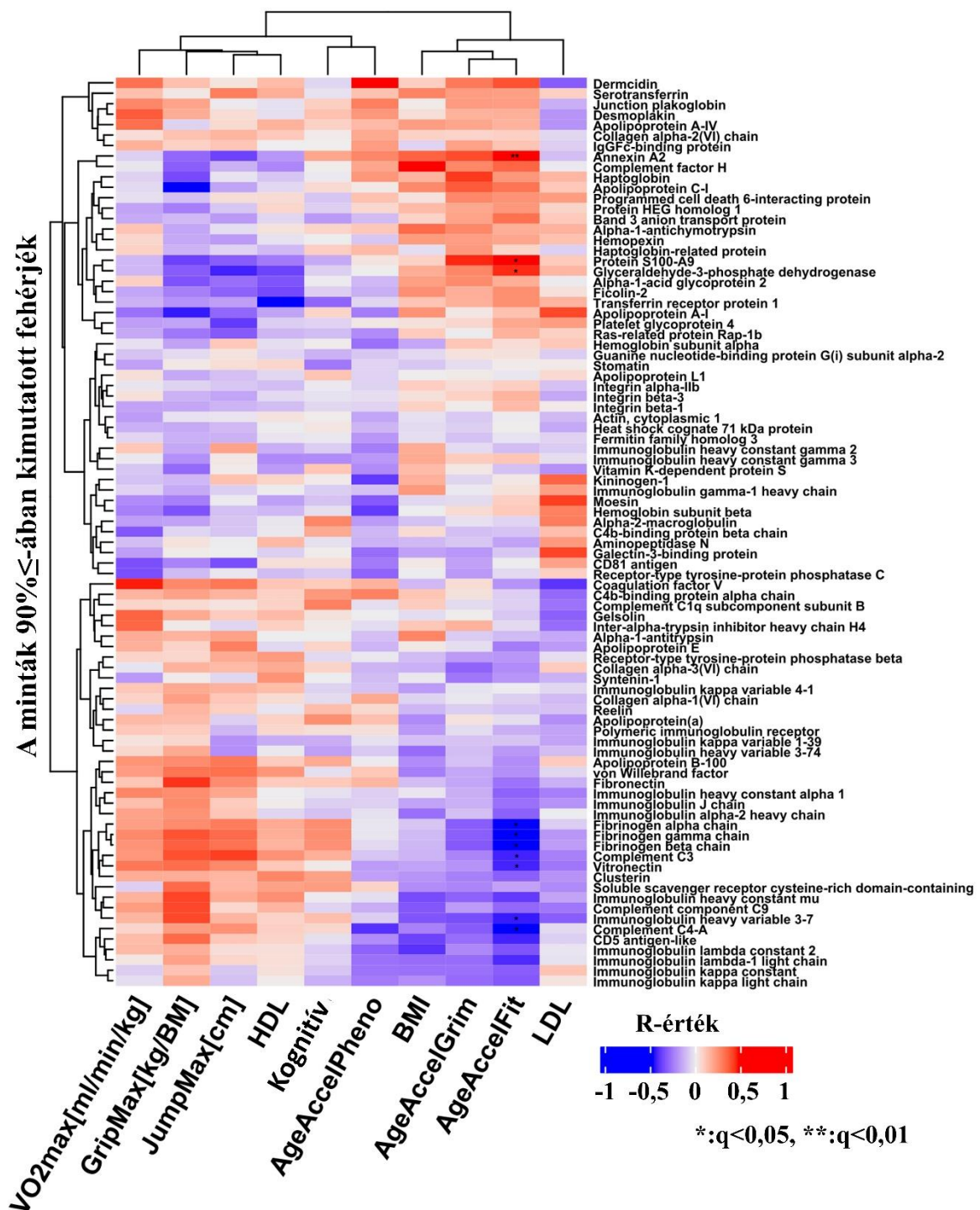
20. ábra: A kizárólag (A) High-fit egyénekben kimutatott fehérjék, és (B) a DNAmFitAge-akcelerációhoz (AgeAccelFit) kapcsolódó fehérjék dúsulási elemzése (György és mtsai 2025)

4.3.2. Az izolált kis méretű extracelluláris vezikulákban található fehérjék tömegspektrometriás analízisének eredményei

Az eredményeinkből hőtérképet készítettünk, hogy vizualizáljuk a normalizált fehérje tömegspektrometriás intenzitásváltozók és a fiziológiai markerek közötti korrelációt (**21. ábra**). A sEV-kből származó fehérje mennyiség nem mutatott különbséget a High-fit és Med-Low-fit csoportok egyénei között, hasonlóan nem detektáltunk szignifikáns összefüggéseket a fehérjeszintek és a fiziológiai fittségi mutatók között az $FDR < 0,05$ szinten. Mintánkban a memóriefunkció (kognitív), vérzsír-markerek (LDL, HDL) és a testtömegindex (BMI) közötti korrelációk nem érték el a statisztikai szignifikanciát a többszörös összehasonlítások korrekciója után (György és mtsai 2025).

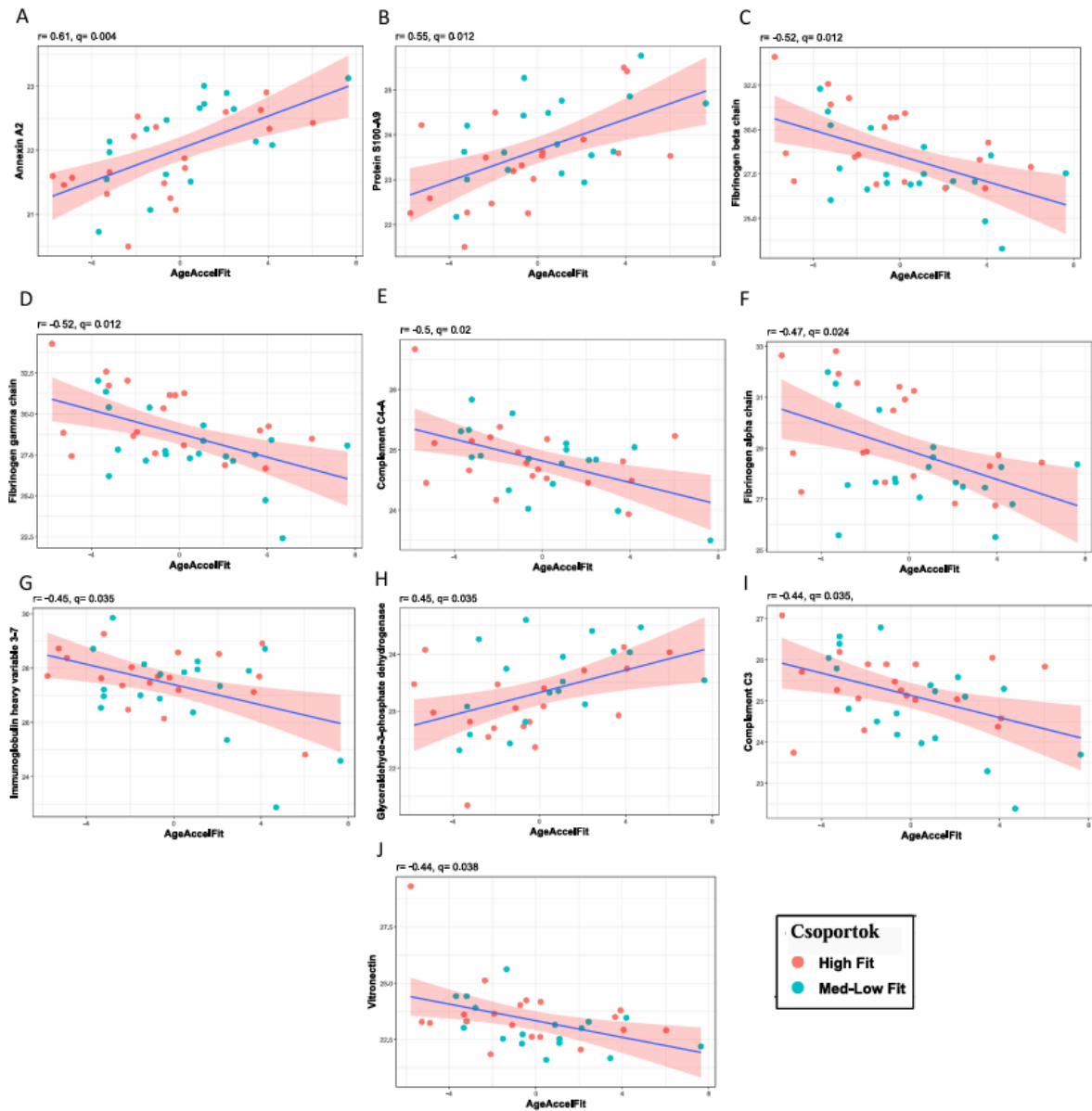
A három öregedési óra, a PhenoAge, a GrimAge és a DNAmFitAge életkor-akcelerációját vizsgáltuk az EV-kben található fehérjékkel összefüggésben. Megállapításaink szerint 10 fehérje kapcsolódik a DNAmFitAge-akcelerációhoz $q < 0,05$ szinten (**22. ábra**). Szignifikáns összefüggéseket találtunk a következő fehérjék és a DNAmFitAge-akceleráció között: Annexin 2A ($r=0,61$, $q=0,004$, $n=36$), Protein S100-A9 ($r=0,55$, $q=0,012$, $n=37$), Fibrinogén béta lánc ($r=-0,52$, $q=0,012$, $n=39$), Fibrinogén gamma lánc ($r=-0,52$, $q=0,012$, $n=39$), Komplement C4-A ($r=-0,5$, $q=0,02$, $n=37$), Fibrinogén alfa lánc ($r=-0,47$, $q=0,024$, $n=39$), Immunglobulin nehéz változó 3-7 ($r=-0,45$, $q=0,035$, $n=38$), Gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz ($r=0,45$, $q=0,035$, $n=37$), Komplement C3 ($r=-0,44$, $q=0,035$, $n=38$), Vitronectin ($r=-0,44$, $q=0,038$, $n=37$) (György és mtsai 2025).

Más biológiai életkormutatók, mint például a GrimAge- és a PhenoAge-akceleráció, nem mutattak szignifikáns korrelációt az proteomikai/MS-adatokkal.



21. ábra: A fehérje MS normalizált intenzitásváltozói és a fiziológiai markerek közötti korrelációt ábrázoló hőterkép.

Az oszlopon a fiziológiai markereket, a sorok az egyes fehérjéket jelölik. A színintenzitás a Pearson-korrelációs együttható értékének megfelelően változik, ahol a sötétebb színek erősebb korrelációt jelölnek (György és mtsai 2025).

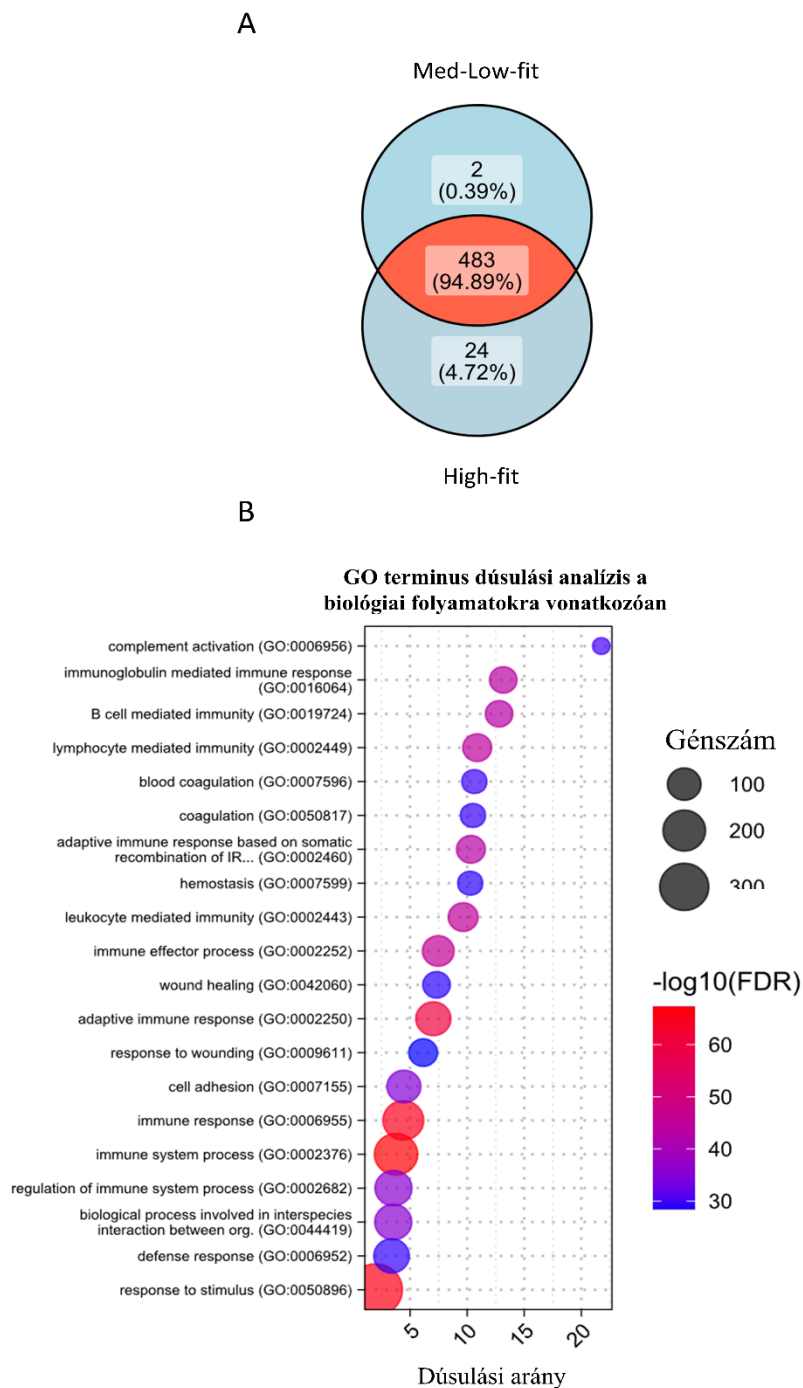


22. ábra: Összefüggés a biológiai öregedés becslőjével, a DNAmFitAge-akcelerációval (években ábrázolva), és a normalizált log₂-transzformált fehérje-mennyiségekkel.

(A) Annexin A2, (B) Protein S100 A9, (C) Fibrinogen beta chain, (D) Fibrinogen gamma chain, (E) Complement C4-A, (F) Fibrinogen alpha chain, (G) Immunoglobulin heavy variable 3-7, (H) Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase, (I) Complement C3, (J) Vitronectin (György és mtsai 2025).

A fehérje készlet dúsulásának elemzése során három feltételkészletet vizsgáltunk: (i) az összes fehérje, amelyet tömegspektrometriával detektáltunk ($n=509$), a vezikuláris eredet megerősítésére, (ii) a High-fit egyénekben jelenlévő fehérjék ($n=24$) (23. A ábra), és (iii) azok a fehérjék, amelyek szignifikáns összefüggést mutatnak a FitAge-akcelerációval az $FDR < 0,05$ szinten ($n=10$). Az összes detektált fehérje dúsulása esetén

a 19. és 23.B ábra azt mutatja, hogy számos erősen szignifikáns eredmény utal a mikrovezikuláris eredetre, beleértve a következőket: Blood microparticle (GO:0072562), extracellular exosome and vesicle (GO:0070062, GO:1903561) (György és mtsai 2025).

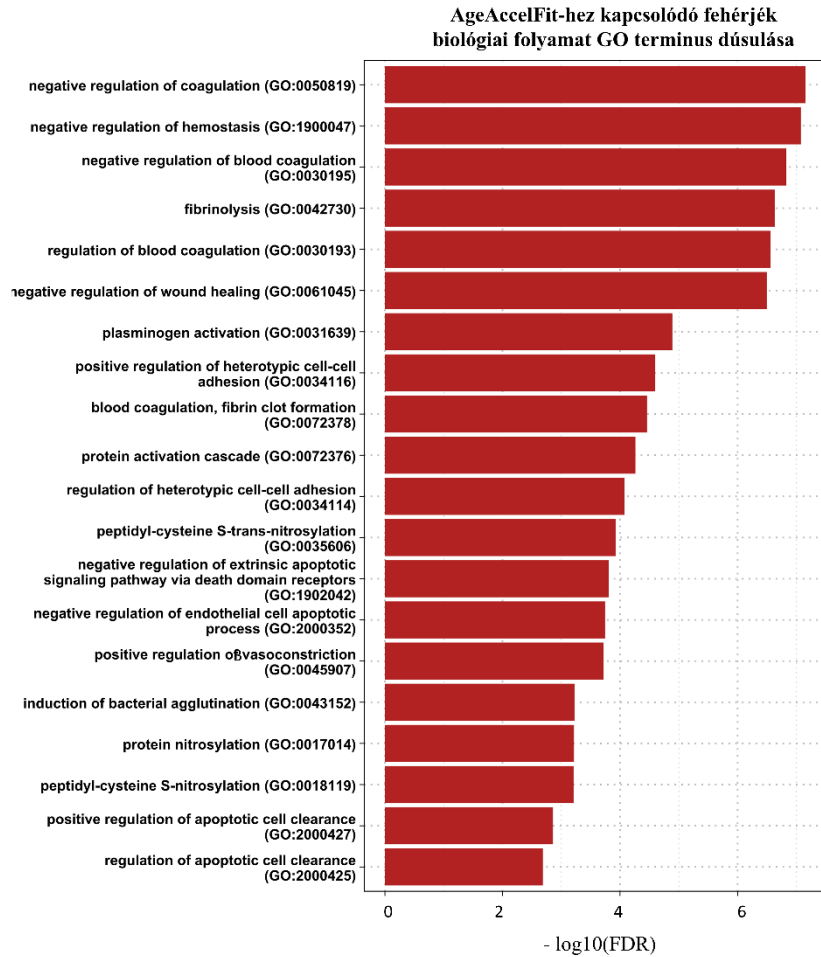


23. ábra: Az MS-el kimutatott vezikuláris fehérjék jellemzői.

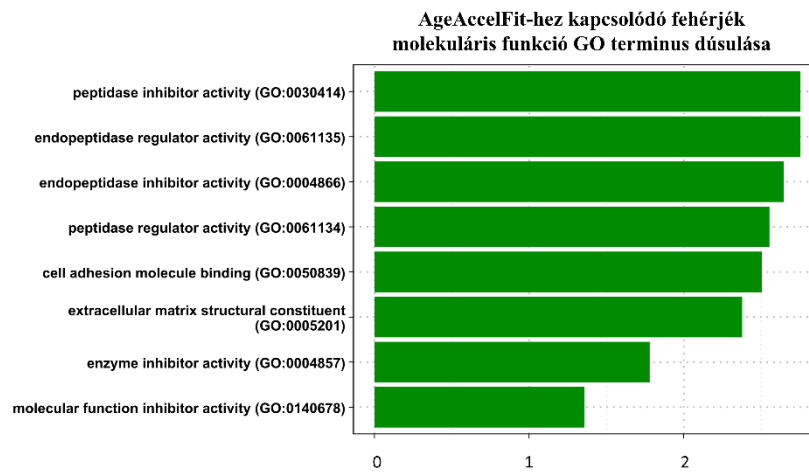
Az (A) ábra a fehérjék jelenlétét mutatja a Med-Low- és High-fit csoportokban. A (B) ábra a top20 Gene Ontology (GO) terminus analízis eredményét mutatja meg a biológiai folyamatok esetében (György és mtsai 2025).

GO útvonal (GO pathway) elemzést végeztünk annak érdekében, hogy meghatározzuk a High-fit és a DNAmFitAge-akcelerációval összefüggő fehérjék természetét a vezikuláris mintákból (20. A, B és 24. és 25. ábra).

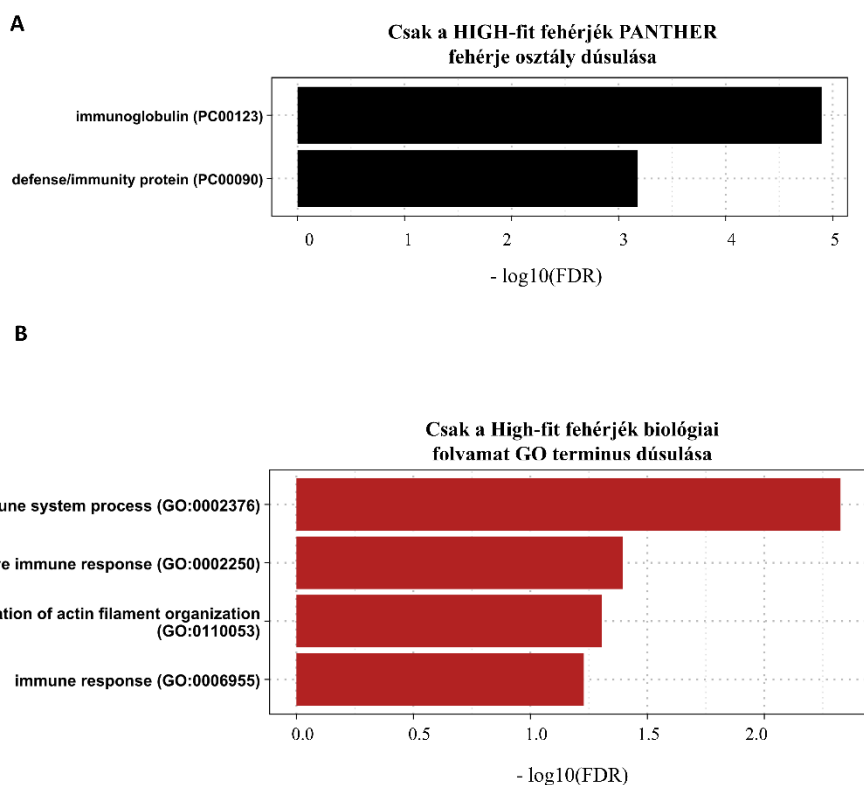
A



B



24. ábra: A (A, B) DNAmFitAge-akcelerációhoz (AgeAccelFit) kapcsolódó fehérjék dúsulási elemzése (György és mtsai 2025)



25. ábra: High-fit egyéneknél kimutatott fehérjék dúsulási elemzése (A, B) (György és mtsai 2025)

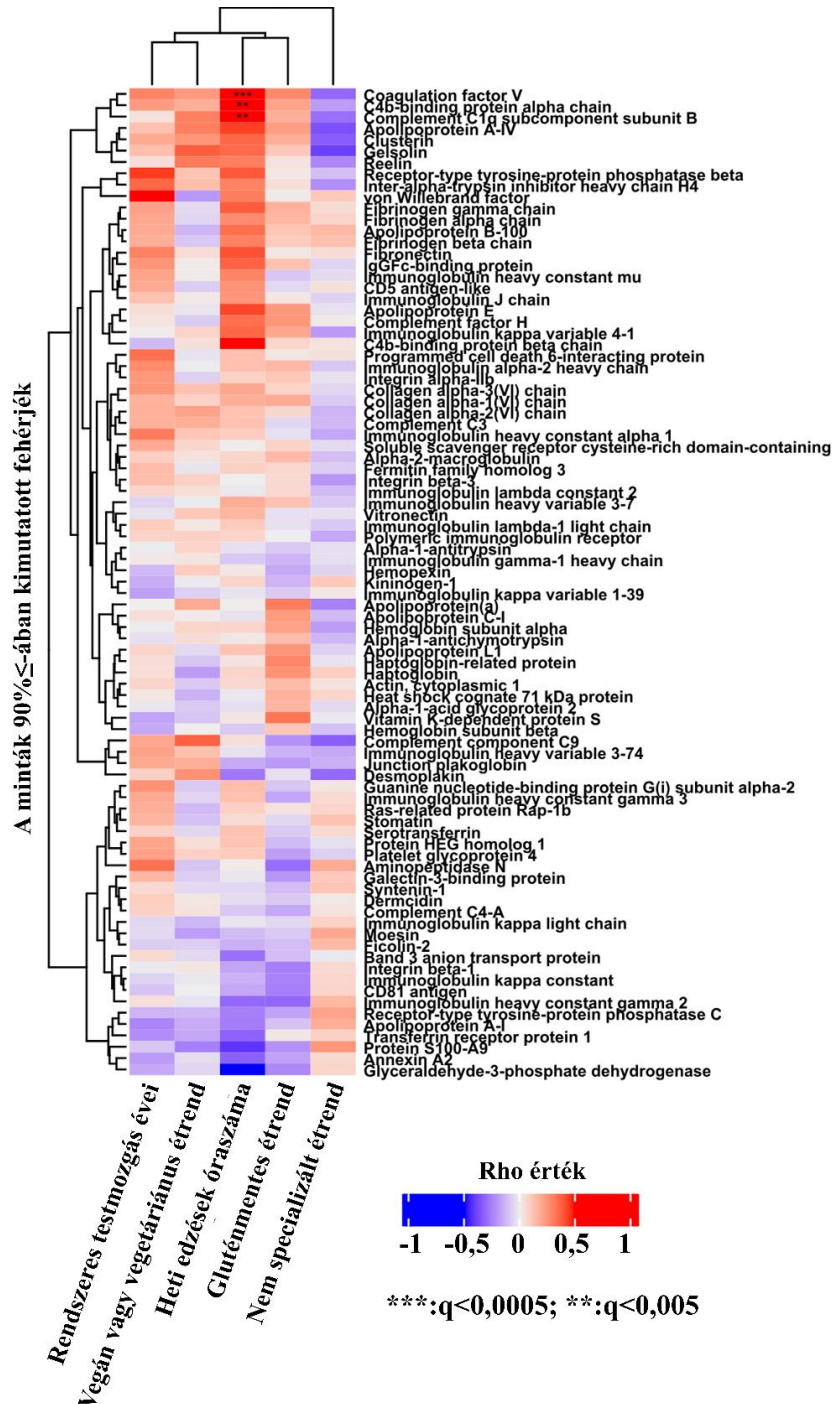
A GO dúsulási analízis jelentős dúsulást mutatott a fehérjék között a biológiai folyamatok, sejtes komponensek, molekuláris funkciók és a PANTHER fehérje osztályok terén. Azonban az AgeAccelFit esetében nem figyeltünk meg dúsulást a PANTHER fehérje osztályban. Hasonlóan, a kizárólag a High-Fit csoportban detektált fehérjék nem mutattak dúsulást a molekuláris funkció GO terminusaiban. A fehérjék jelentősen dúsultak a ‘extracelluláris régió’, ‘extracelluláris tér’ és ‘vér mikrorészecske’ sejtes komponens kategóriákban. Ezen kívül a biológiai folyamatok terén jelentős dúsulást figyeltünk meg a ‘immunrendszeri folyamat’, ‘adaptív immunválasz’, koaguláció és hemosztázis területén. További megfigyeléseink alapján sok fehérje kapcsolódott a proteáz szabályozáshoz és a sejt felszíni adhézióhoz a molekuláris funkciók elemzése során. A **3. táblázat** azt a 24 fehérjét mutatja be, amelyek csak egy vagy több, High-fit alany mintáiban voltak detektálhatók (György és mtsai 2025).

3. táblázat: Egy vagy több High-fit alanyban mintáiban detektált fehérjék

Fehérje név	n (megegyezik a pozitív észlelések számával az adott csoportban)
Alpha-2-antiplasmin	9
Immunoglobulin lambda variable 9-49	5
Immunoglobulin lambda variable 4-60	4
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	4
Immunoglobulin heavy variable 3-73	3
Immunoglobulin heavy variable 4-4	3
SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1	3
A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13	2
Amino acid transporter heavy chain SLC3A2	2
Apolipoprotein A-V	2
Carboxypeptidase N catalytic chain	2
Cartilage acidic protein 1	2
Cathelicidin antimicrobial peptide	2
Complement C2	2
Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8	2
Growth factor receptor-bound protein 2	2
Immunoglobulin heavy variable 3-53	2
Immunoglobulin kappa variable 1D-8	2
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	2
Plastin-2	2
Pleckstrin	2
Protein disulfide-isomerase	2
Ras-related protein Rab-35	2
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	2

A Med-Low-fit csoport esetében csupán 2 fehérjét azonosítottunk be, amelyek kizárólag egy vagy több Med-Low-fit alany mintáiban fordultak elő: Transforming growth factor beta activator LRRC32 (n=2) és Equilibrative nucleoside transporter 1 (n=2). Érdekes módon nem találtunk összefüggést a vezikulákban lévő fehérjék és a rendszeres testmozgásban eltöltött évek száma, valamint az alapvető táplálkozási szokások között (26. ábra). Másrészt, a heti edzésórák pozitívan korreláltak a

Koagulációs faktor V-tel ($\rho = 0,75$, $q = 0,0002$), a C4b kötő fehérje alfa láncával ($\rho = 0,7$, $q = 0,0007$), és a Komplement C1q alegység B-vel ($\rho = 0,67$, $q = 0,0027$) (György és mtsai 2025).



26. ábra: Hőterkép, amely a fehérje MS normalizált intenzitásváltozók és az életmódbeli markerek közötti korrelációt ábrázolja.

Az oszlopon a fiziológiai markereket, a sorok az egyes fehérjéket jelölik. A színintenzitás a Pearson-korrelációs együttható értékének megfelelően változik, ahol a sötétebb színek erősebb korrelációt jelölnek (György és mtsai 2025).

A jelen fejezet eredményei részben vagy egészben megegyeznek a korábban megjelent közleményekben (György és mtsai 2024, György és mtsai 2025) közölt adatokkal, amelyek megfelelően hivatkozásra kerültek.

5. Megbeszélés

5.1. A metodikai protokoll beállításának és validálásának megbeszélése

5.1.1. Trombocita-mentes plazma preanalitikai eredményének megbeszélése

A metodikai protokoll elkészítése céljából összesen 19 egyéntől (férfi n=11, nő n=8) vettünk vérmintát. Mivel ebben a vizsgálatban nem csoportos összehasonlítást, hanem preanalitikai és technikai eljárások optimalizálását végeztük, a minták eredete és az esetleges ismétlődések nem befolyásolták a vizsgálat érvényességét. A levett vérmintákból összesen 37 PFP mintát állítottunk elő, amelyeket a további metodikai elemzésekhez használtunk fel. Különös figyelmet fordítottunk a résztvevők egészségi állapotára, és a mintavételt megelőzően kértük, hogy tartsanak egy 12 órás böjtöt annak érdekében, hogy a minták ne legyenek például lipémiások, mivel az negatívan befolyásolja a méréseket. Továbbá törekedtünk arra, hogy a mintavételek egyszerre történjenek, és a minták előkészítésétől a preanalitikai vizsgálatokig minden művelet a lehető legnagyobb egységességgel történjen, elősegítve ezzel az eredmények reprodukálhatóságát (Clayton és mtsai 2019).

A módszertan tekintetében a Nemzetközi Trombózis és Hemosztázis Társaság (International Society on Thrombosis and Haemostasis - ISTH) által kidolgozott protokollt követtük a PFP előkészítése során (Lacroix és mtsai 2012, Bettin és mtsai 2022). Az EV szeparálási folyamat kezdetén egy 0,8 µm-es szűrési lépést alkalmaztunk (Ialongo és Bernardini 2016, Koncz és mtsai 2023), majd egy hematológiai analizátor segítségével megmértük a trombocitaszámot. Az eredmények azt mutatták, hogy a mintákban nem maradt kimutatható mennyiségű trombocita, és ennek száma minden mintában ($n = 37$) 0×10^6 sejt/l volt.

Összességében a PFP megfelelő előkészítése fontos lépés az EV-k humán vérből történő izolálásában, mivel biztosítja az EV populáció tisztaságát és specifikusságát, és elkerüli a trombociták okozta zavaró hatásokat. A hemolitikus és a lipémás minták kiválasztása is kulcsfontosságú a humán vérből történő EV izolálás során. A hemolízis,

vagyis a vörösvérsejtek lebomlása, kontaminálhatja az EV mintákat és befolyásolhatja az azt követő analízist. A lipémás plazma, amelyet a megemelkedett vérzsír szint okozhat, zavarhatja az EV izolálást, majd a későbbi karakterizálást. Ezeknek a tényezőknek a megismerésével és kezelésével a kutatók biztosíthatják az EV preparátumok tisztaságát és megbízhatóságát, hogy a vizsgálatok minél pontosabbak legyenek (Dhondt és mtsai 2023). Elkerülhetetlennek tartottuk tehát, hogy az izolálás előtt preanalitikai lépéseket is beiktassunk a protokollba, amelyet a MISEV2023 irányelvek is hangsúlyoznak (Welsh és mtsai 2024).

Az általunk vizsgált, metodikai protokollra szánt minták között nem tapasztaltunk hemolitikus vagy lipémiás interferenciát. A hemolitikus mintákat több koncentrációjától függ, amit az étkezés, genetikai tényezők vagy különböző egészségügyi állapotok befolyásolhatnak. Mivel nem észleltünk ilyen interferenciát, annak valószínű oka lehet a jó mintakezelés és a megfelelő mintavételi protokollok betartása, és feltételezhető az alanyok jó egészségügyi állapota.

5.1.2. A 35 nm-es és 70nm-es oszlopokon izolált kis méretű extracelluláris vezikulák mennyiségi és minőségi elemzésének a megbeszélése

Vizsgálataink során először összehasonlítottuk a 35 nm-es és 70 nm-es oszlopokon izolált sEV-k mennyiségét és minőségét TEM, NanoDrop, NTA és WB módszerek alkalmazásával, valamint elvégeztük a "vezikuláris" és "nem-vezikuláris" fehérjék azonosítását MS elemzés segítségével. Böing és mtsai (Böing és mtsai 2014) bemutatták a vezikulák tisztítását humán PFP-ből Sepharose CL-2B töltetű SEC oszlopok segítségével, amelyet saját kutatásunk is alátámasztott. A mi kutatásunkhoz Izon qEV original oszlopokat választottunk, amelyek Sepharose CL-2B gyantával vannak töltve. Azért erre a típusú oszlopra esett a választásunk, mert a legtisztább sEV frakciót szeretnénk volna kinyerni a plazmából, minimális „PLP” szennyeződéssel. Ezen túlmenően, módszertanunk kialakításához egy standardizált, kereskedelmi forgalomban kapható oszlop használatát helyeztük előtérbe. A módszer kiválasztását az előzetes szakirodalmi kutatásban találtak is elősegítették. Sidhom és mtsai (Sidhom és mtsai 2020) bővebb irodalmi áttekintést végeztek, amely megerősítette, hogy a SEC gyors, reprodukálható és

viszonylag tiszta technika az EV-k frakcionálására. Ezenkívül Baranyai és mtsai (Baranyai és mtsai 2015) megjegyezték, hogy a vérplazmából SEC segítségével izolált EV-k jelentős albuminmentes frakcióval rendelkeztek, bár mellette a EV-k mennyisége is csökkent. Stranska és mtsai (Stranska és mtsai 2018) kimutatták, hogy a SEC viszonylag gyors módszer, ami jelentősen nagyobb tisztaságú EV mintákat szolgáltat, mint például a membrán affinitású kromatográfia.

A 35 nm-es és 70 nm-es oszlopok összehasonlításából származó eredményeinkben megfigyeltük, hogy a "cup-shaped" alakú sEV-k jelenléte a TEM képeken megerősítette az sEV-k jelenlétét a mintákban. A TEM mintaelőkészítést Théry és mtsai (Théry és mtsai 2006) munkája alapján végeztük apróbb módosításokkal. A "cup-shaped" alakú és viszonylag kör alakú vezikulák között megfigyelt eltérés a mintaelőkészítés technikai eltéréseinek tulajdonítható, ami a minták közötti kontrasztbeli eltérést eredményezi. Emellett immunjelölést végeztünk az sEV-ken egy CD9 vezikula marker-specifikus antitesttel, hogy azonosítani tudjuk a jelenlétüket. A NanoDrop és NTA analízisekből nyert eredmények azt mutatták, hogy az OD 280 nm-en mért abszorbanciában jelentős különbségek voltak a két oszlop között mind a 10 frakcióban. A 70 nm-es oszlopról gyűjtött frakciók következetesen alacsonyabb fehérjetartalommal rendelkeztek. Ter-Ovanesyan és mtsai (Ter-Ovanesyan és mtsai 2021) három módszert (SEC, UC és ExoQuick) vizsgáltak az EV-k izolálására plazmából és liquorból (CSF). A mi eredményeinkkel ellentétben, ők azt figyelték meg, hogy a 35 nm-es oszlop adta a legtisztább EV frakciót a 70 nm-es oszloppal szemben. Fontos megjegyezni azonban, hogy az ő elemzésük kizárólag az albumin- és EV arányra összpontosított, míg mi proteomikai elemzést és albumin, ApoA1 WB vizsgálatokat végeztünk a mintákon. Az NTA eredmények (részecske/ml) alapján jelentős különbségek voltak a két oszlop között az összes frakció közül ötben. Úgy tűnt, hogy a 70 nm-es oszlopon a sEV-k későbbi frakciótól eluálódnak, ami szükségessé tette a kissé eltérő összevonási sémát, ahol a 35 nm-es oszlopnál az 1-3. frakciókat, míg a 70 nm-es oszlopnál a 2-4. frakciókat egyesítettük. A WB-eredmények alátámasztották korábbi megfigyeléseinket. A SYPRO Ruby gélelektroforézist követően a két oszlop között vizuálisan is megfigyelhető különbségek voltak. A fehérjék a 35 nm-es oszlop esetében a 2. frakciótól kezdtek megjelenni, míg a 70 nm-es oszlop esetében ez körülbelül a 3.-4. frakciónál történt. Hasonló tendenciát figyeltünk meg az ApoA1 marker frakciókban való

megjelenésére is (György és mtsai 2024). A frakciók összevonását (35 nm = 1–3 frakció, 70 nm = 2–4 frakció) a WB eredmények alapján határoztuk meg. Fernández-Rhodes és mtsai (Fernández-Rhodes és mtsai 2023) SEC-kapcsolt ultraszűrést alkalmaztak az EV-k sejtkultúrából történő izolálására. WB-eredményeik nagyon hasonlítottak a miénkhez, az ApoA1 lipoprotein marker erősebb jelenlétét mutatták ki a későbbi frakciókban, míg a CD9 és az Annexin A2 vezikuláris markerek a korábbi frakciókban voltak markánsabbak. Ekström és mtsai (Ekström és mtsai 2022) megfigyelték a CD63 és Flotillin-1 vezikula markerek jelenlétét a korai frakciókban, valamint az ApoA1 dominanciáját a későbbi frakciókban, amikor SEC segítségével izolálták az EV-eket a nyirokcsatorna folyadékából. Következtetésként az Alix és CD81 EV markerek jelenléte a frakciókban szintén megerősítette a frakciók egységesítésére használt módszerünket. Fontos megjegyezni, hogy a biológiai variancia miatt még a 70 nm-es oszlop 5. frakciója is tartalmazhat vezikulákat (György és mtsai 2024).

A MS eredményekhez Venn diagramot is készítettünk, hogy összehasonlítsuk az ExoCarta top100 és az „extracelluláris exoszómák” (GO:0070062) fehérjéit, szemléltetve a közös (65 fehérje) és különböző fehérjéket. A kilenc pár összehasonlításakor mind az ExoCarta top100, mind a saját listánk alapján a 70 nm-es oszlopnál magasabb volt a „vezikuláris” fehérjék száma. Ugyanakkor a 35 nm-es oszlop mintáiban részben több, a vezikulákhoz kötődő protein/lipid korona fehérje maradhatott meg, ami szintén befolyásolhatja az összes kvantifikált fehérje arányát (György és mtsai 2024).

Fontos megjegyezni, hogy egyes fehérjék az EV-vel együtt izolálódnak amiatt, hogy a felszínükhöz tapadnak. Ilyenek lehetnek például bizonyos immunglobulinok (Tóth és mtsai 2021), apolipoproteinek (Sódar és mtsai 2016), és az albumin, amelyek védő szerepet is játszhatnak (Buzás és mtsai 2018). Egy úgynevezett fehérjekorona képződik az EV-k körül a vérplazmában (Tóth és mtsai 2021), és vizsgálatunkban ezeket a koronafehérjéket a "nem-vezikuláris" eredetű fehérjékként osztályoztuk. Saját eredményeink és más tanulmányok (Veerman és mtsai 2021) alapján a 70 nm-es oszlopot választottuk a fagyasztott (>2,5 év) és a friss (ugyanazon a napon) sEV-k összehasonlítására, amelyeket ugyanazon egyének PFP-mintáiból izoláltunk.

Arra a következtetésre jutottunk, hogy mind a 35 nm-es, mind a 70 nm-es oszlop alkalmas a vezikulák izolálására, azonban az eredményeink alapján a 70 nm-es oszlop használatát javasoljuk.

5.1.3. A 70nm-es oszlopon a fagyasztott és friss trombocita-mentes plazma mintákból izolált kis méretű extracelluláris vezikulák mennyiségi és minőségi elemzésének a megbeszélése

A vizsgálat második részében nem találtunk különbséget a fagyasztott, illetve friss PFP minták TEM képein. Az oszlopok összehasonlításának eredményei alapján megállapítottuk, hogy a fagyasztott és friss minták elemzéséhez elég 8 frakciót gyűjteni, mivel efelett már nem észlelt részecskéket a mintákban az NTA készülék. A fagyasztott és friss PFP mintákból izolált sEV-k között nem találtunk különbséget sem az sEV-k koncentrációjában, sem a fehérjekoncentrációban, amit a tömegspektrometriás adatok is megerősítettek (György és mtsai 2024). Hasonlóan a mi megfigyeléseinkhez, Yuana és mtsai (Yuana és mtsai 2015) sem találtak különbséget a fagyasztott és friss EV-k mérete között, amelyet szintén NTA segítségével határoztak meg. Kabagwira és mtsai (Kabagwira és mtsai 2021) arra a következtetésre jutottak, hogy az EV-k hosszú távú fagyasztása nem idéz elő változásokat az EV-k méretében. Továbbá Yuana és mtsai (Yuana és mtsai 2015) 1 éven keresztül tartó fagyasztás hatását is vizsgálták a PFP-re, majd centrifugálást alkalmaztak az EV-k izolálására. Kabagwira és mtsai (Kabagwira és mtsai 2021) 16 hónapig fagyasztották a feldolgozatlan plazmát, és az ExoQuick módszert használták az EV-k izolálására. Ezzel szemben mi preanalitikailag megvizsgált PFP-t fagyasztottunk legalább 2,5 évig, és nem találtunk jelentős különbségeket a fagyasztott és friss minták között. Tömegspektrometriás adataink is azt sugallják, hogy nincs összefüggés a proteomikai profil és a minta eredete (friss vs. fagyasztott) között. Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a hosszú ideig (>2,5 év) tárolt PFP minták ugyanolyan alkalmasak sEV izolálásra, mint a frissen előkészített PFP minták. Eredményeink segíthetnek olyan kísérletek tervezésében, amelyekben valamilyen okból nem lehetséges azonnal feldolgozni a mintákat, vagy az összes minta egyidejű vagy egymáshoz közeli levétele.

A tanulmány összegzéseként, bár a WB eredmények a vezikuláris minták tisztaságában nagyobb különbséget sugalltak, a tömegspektrometriás adatok nem támasztották alá ezeket a megfigyeléseket. Ezenkívül a „PLP-k”, az albumin és az immunglobulinok esetében nem volt megfigyelhető statisztikai szignifikancia a tömegspektrometriás adatokban. A kilenc pár minta összehasonlításával megerősítettük, hogy a „vezikuláris” fehérjék száma nagyobb mértékben volt jelen a 70 nm-es oszlopról izolált sEV mintákban. Klinikailag nem mindig lehetséges azonnal feldolgozni a mintákat, ezért fontos tudni, hogy a tárolt minták megbízhatóak-e. Megállapítottuk, hogy a megfelelően előkészített PFP biztonságosan tárolható $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on akár 2,5 évig (György és mtsai 2024).

5.1.4. A korlátozó tényezők megbeszélése

Korlátozó tényezők közé tartozik, hogy vizsgálataink kezdetekor az Izon qEV oszlopok újabb verziója (Gen2) még nem volt elérhető. A Gen2 oszlopok jobb teljesítményt nyújtanak a szűrési folyamat során, nagyobb kapacitással rendelkeznek, és nagyobb szelektivitást biztosítanak a kisebb és nagyobb EV-k izolálásában. Úgy gondoljuk az új generációs oszlopokkal hatékonyabban lehet EV-t izolálni és kevesebb a lipoprotein és egyéb szennyezőanyag kontamináció, ezért ennek hiányát korlátozó tényezőként ismertetjük. Figyelembe véve az Izon Science folyamatos fejlesztését az SEC oszlopok terén, a jövőbeli kutatások új betekintéseket nyújthatnak a sEV izolálásában ezen újonnan kiadott oszlopok vizsgálatának segítségével. A módszer korlátozó tényezői közé tartozik továbbá az is, hogy viszonylag nagy mennyiségű mintára van szükség (legalább 8 ml vér egy vizsgálatához) és megfelelő felszerelésre, ami igen költséges pl. ultracentrifugára. További korlátozó tényező, hogy a kapott izolátum nem túl specifikus és nem 100%-os tisztaságú.

5.2. Az eltérő edzettségi szintű csoportok eredményeinek megbeszélése

5.2.1. Az izolált kis méretű extracelluláris vezikulák karakterizálásának megbeszélése

Vizsgálatunk ezen részében 40 humán női vérplazma mintát használtunk sEV izolálására. A minták kiválasztása a preanalitikai vizsgálatok alapján EV izolálásra alkalmas 80 főből történt (n=50 High-fit, n=30 Med-Low-fit csoportból). A korcsoportok egyenletes reprezentálása érdekében minden életkori kategóriából azonos számú High-fit és Med-Low-fit egyént választottunk ki, kizárólag olyan résztvevők közül, akiknél teljes vizsgálati adattartalom állt rendelkezésre, így biztosítva az eredmények összehasonlíthatóságát. Ennek köszönhetően a High-fit és Med-Low-fit csoportok egymáshoz viszonyítva életkor szerint homogénnek tekinthetők, ami lehetővé tette a fittség hatásának elemzését az életkorból fakadó torzító tényezők minimalizálása mellett. Kiemelt figyelmet fordítottunk arra, hogy mind a High-fit (n=20), mind a Med-Low-fit (n=20) csoport résztvevői ugyanazon teszteken essenek át (pl. fizikai fittség mutatói, vérből származó biomarkerek), és az általunk készített, egységes protokollt alkalmaztunk a vezikulák elemzésének minden szakaszában, a preanalitikai mintakezeléstől kezdve az MS eredmények kiértékeléséig.

Kutatásunk ezen részének célja nem az EV izolálás módszertanának újbóli validálása volt, hanem a High-fit és a Med-Low-fit csoportok alanyaitól származó vezikulák proteomikai elemzése. Ettől függetlenül minden egyes izolált EV mintán minőségi és mennyiségi vizsgálatokat végeztünk az ISEV által közzétett MISEV2018 és MISEV2023 irányelveknek megfelelően. NTA-t használtunk a sEV-k méreteloszlásának és koncentrációjának vizsgálatára. A méretkülönbségek alapján itt is három, egymást kissé átfedő populációt figyeltünk meg: „PLP-keket”, sEV-keket és mEV-keket. A koncentráció kizárási kritériuma 1×10^9 részecske/ml volt. Mivel ez a módszer nem képes különbséget tenni a „vezikuláris” és a „nem-vezikuláris” részecskék között, a vezikulák azonosításához TEM-re is szükség van. A TEM-felvételeken a vezikulák jellegzetes "cup-shaped" morfológiája volt megfigyelhető itt is. Az immun-TEM képen a CD9 antitestet használtuk a mintában lévő EV-k jelölésére. A mintákban található teljes fehérjekoncentráció minden esetben a 0,75 mg/ml-es kizárási kritérium alatt volt (György és mtsai 2025).

Az MS a molekulák tömeg-töltés arányát méri, és széles körben alkalmazzák az EV-vizsgálatokban az EV-hez kapcsolódó fehérjék kimutatására és jellemzésére különböző mintákban (Choi és mtsai 2015). Az adatok hőtésképes ábrázolása a CD9, CD81 és Alix vezikuláris markerek jelenlétét mutatja a mintákban. A GO-terminusok feldúsulásának eredményei tovább validálják a minták vezikuláris tartalmát, kiemelve a vezikulákkal kapcsolatos biológiai folyamatokhoz, molekuláris funkciókhoz és sejtkomponensekhez kapcsolódó génontológiai kifejezések feldúsulását.

Összességében elmondhatjuk, hogy nem találtunk különbséget a High-fit és a Med-Low-fit csoportok vizsgálatakor az EV minták fehérjetartalmában, koncentrációjában és méreteloszlásában. A vizsgálati protokoll alkalmazása lehetővé tette a megfelelő minőségű EV minták kiválasztását és validálását a proteomikai elemzéshez.

5.2.2. A kis méretű extracelluláris vezikula minták proteomikai eredményeinek és az öregedésnek a kapcsolata

Az öregedés egy összetett folyamat, amely szervspecifikusan és egyéni módon zajlik. Ebben a vizsgálati részben az sEV-k fehérjeösszetételét vizsgáltuk, amely összefüggésbe hozható a DNS-metiláció alapú öregedési folyamatokkal, különösen a PhenoAge, GrimAge és DNAmFitAge markerekkel. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a PhenoAge és a GrimAge kiváló előrejelzői a halálozásnak (Horvath és Raj 2018). Kiderült azonban, hogy a DNAmFitAge, amely a fizikális funkciókkal kapcsolatos DNS-metilációs helyeket tartalmaz (McGreevy és mtsai 2023), az egyetlen olyan öregedési óra, amely kapcsolatban áll az sEV-k proteomikájával. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a testmozgás által termelt sEV-k fontos szerepet játszanak az epigenetikai öregedés folyamatában (György és mtsai 2025).

Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a magasabb szintű fizikai fittség összefügg a betegségek csökkenésének az előfordulásával, a hosszabb élettartammal (Lang és mtsai 2024) és az öregedési folyamatok lassabb ütemével (Sánchez-Sánchez és mtsai 2024). Friss kutatások szerint az olimpiai bajnokok öregedési folyamata lassabb, mint a szabadidősportolók és ülő életmódot folytató egyének esetében (Radák és mtsai

2024b). Az edzés öregedésre gyakorolt jótékony hatásainak molekuláris mechanizmusai rendkívül összetettek. Ide tartozik a telomerhossz fenntartása (Seki és mtsai 2023), az „anti-aging” fehérjék, például a klotho és a szirtuinok expressziójának fokozása (Aczel és mtsai 2023, Koltai és mtsai 2010), az oxidatív stressz elleni védelem erősítése (Radák és mtsai 2008), a mitokondriális hálózat megújítása (Koltai és mtsai 2012), valamint az immunrendszer szabályozásának fokozása (Simpson és mtsai 2012). A DNS-metiláció alapú öregedési órák célja az öregedés ütemének rögzítése, és ezek folyamatos fejlesztése arra utal, hogy az öregedési órák evolúciója még mindig zajlik.

A PhenoAge és a GrimAge kiváló előrejelzői a halálozásnak. Az öregedés a legtöbb fiziológiai funkció, így az erő és állóképesség csökkenésével is együtt jár, amelyek kulcsszerepet játszanak számos betegség megelőzésében és a halálozás csökkentésében (Allen és mtsai 2017). Ugyanakkor a PhenoAge és a GrimAge korlátozott érzékenysége ezen tényezőkre ösztönözte kutatócsoportunkat a DNAmFitAge kifejlesztésére, amely a fiziológiai funkciókhoz kapcsolódó géneket is magában foglalja (McGreevy és mtsai 2023). Az sEV-k fehérjetartalma és a DNAmFitAge közötti korreláció azt jelzi, hogy a fizikai fittség szintje összefügg az epigenetikai öregedéssel, és felveti, hogy az EV-k potenciálisan szerepet játszhatnak az öregedés szervközi szabályozásában (György és mtsai 2025).

5.2.3. A kis méretű extracelluláris vezikula minták proteomikai eredményeinek és a szervezet szabályozási folyamatainak kapcsolata

Felvetődött, hogy az sEV-k szerepet játszhatnak számos életmódfüggő betegség megelőzésében. Az sEV-k fehérjetartalma részben segíthet megérteni e megelőző hatások egyes részleteit.

Az Annexin A2 egy multifunkcionális, kalcium- és foszfolipidkötő fehérje. A magas fitsségi szintű résztvevők sEV mintáiban detektált magasabb Annexin A2-szint, amely a DNAmFitAge akcelerációval pozitívan korrelál, fokozhatja az EV-k sejtszintű felvételét, ezáltal hozzájárulva olyan folyamatokhoz, mint az angiogenezis (Desai és mtsai 2022). Továbbá az Annexin A2 képes modulálni a gyulladást, és a protein S100-A9-hez hasonlóan – amely szintén pozitív korrelációt mutat a DNAmFitAge

akcelerációval – segítőként vagy ellenségként működhet a sejtfunkciókban, a mikro környezet függvényében. Az EV-kben található fibrinogén béta negatív korrelációt mutat a DNAmFitAge akcelerációval, ami felveti, hogy potenciálisan biomarkerként szolgálhat szív- és érrendszeri betegségek, illetve bizonyos rákos állapotok esetén (Liu és mtsai 2024). Ezenkívül az EV-k fibrinogéntartalma hozzájárulhat a trombusképződéshez (Suades és mtsai 2022). A komplement C4A és C3 az EV-kben fontos szabályozója lehet az immunválasznak, a gyulladásnak és a sejtközi kommunikációnak. Az EV-k immunglobulin-tartalma szintén közreműködik az immun- és metabolikus válaszokban (Nederveen és mtsai 2021). Az EV-kben lévő gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) szerepe magában foglalhatja a TNF-alfa által közvetített gyulladáscsökkentést (Das és mtsai 2021). A GAPDH tartalom elősegítheti az EV-k széles körű aggregációját, növelheti az EV-k terápiás potenciálját az agyban (Dar és mtsai 2021), valamint szabályozhatja az anyagcserét (Romani és mtsai 2022). A vitronektin egy glikoprotein, jelentős szerepet játszik különféle élettani folyamatokban, például a sejtadhézióban, migrációban és szövetregenerációban. Emellett az EV-k vitronektinje részt vesz a csontsűrűség szabályozásában (Pepe és mtsai 2020).

A résztvevők étrendjét önbevallásos kérdőív alapján térképeztük fel, kvantitatív módszerek vagy standardizált étrendi intervenció nélkül, így az eredmények elsősorban feltáró jellegűek. Mivel korábbi kutatások szerint a táplálkozás befolyásolhatja a keringő EV-k mennyiségét és összetételét (Mendivil-Alvarado és mtsai 2022, Monfoulet és mtsai 2022), érdekesnek tartottuk megvizsgálni, mutat-e az étrend kapcsolatot az EV-jellemzőkkel. Eredményeink alapján nem találtunk kapcsolatot a táplálkozási szokások és az EV-kben azonosított fehérjék között. Ugyanakkor fontos kiemelni, hogy ez csupán egy kérdőíves, önbevalláson alapuló vizsgálat volt, amely korlátozza az eredmények értelmezhetőségét.

5.2.4. A kis méretű extracelluláris vezikula minták proteomikai eredményeinek és a fizikai aktivitásnak a kapcsolata

Az sEV-k proteomikai vizsgálata a High-fit és a Med-Low-fit csoportok között bizonyos különbségeket mutatott. Az előző alfejezetben említett fehérjéken kívül itt az

alfa-2-antiplazmin (A2AP), amely a fibrinolízis kulcsfontosságú gátlója, a High-fit csoport 20 tagjából kilenc esetében volt jelen az sEV-kben, míg a Med-Low-fit csoportban nem fordult elő. Az alfa-2-antiplazmin, mint az EV-k „cargo” -ja, befolyásolhatja az alvadás és a fibrinolízis egyensúlyát (Singh és mtsai 2024), ami intenzív fizikai aktivitás során különösen fontos a túlzott vérzés vagy vérrögképződés megelőzése érdekében (György és mtsai 2025).

Az SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3 (SH3BGRL3), amely négy High-fit, de egyetlen Med-Low-fit alany mintájában sem volt jelen, olyan fehérje, amelyről feltételezik, hogy szerepet játszik az EV-kben a testmozgás által kiváltott fizikai stressz sejtszintű válaszainak modulálásában (Di Pisa és mtsai 2021). Ezen túlmenően, a szerkezet alacsonyabb szintjén az SH3BGRL3 részt vesz a redox szabályozásban (Mazzocco és mtsai 2001).

A heti edzésórák száma összefüggésbe hozható olyan fehérjékkel, amelyek kulcsfontosságú biológiai folyamatokban vesznek részt, mint például a véralvadás, az immunválasz vagy a komplementaktiváció. Tanulmányunkban a heti edzésórák és az sEV-k „cargo” -jában található C4b kötőfehérje alfa-láncának (C4BPA) szintje közötti pozitív korreláció arra utalhat, hogy a rendszeres fizikai aktivitás képes modulálni az immunfunkciókat. Ez összhangban áll a legújabb kutatások eredményeivel, amelyek szerint a C4BPA kritikus szerepet játszik a CD8+ tumort infiltráló limfociták felhalmozódásának elősegítésében, valamint a daganatos mikro környezet javításában, amely hozzájárul a daganatos folyamatok visszaszorításához (Sasaki és mtsai 2021). Ezek az eredmények rámutatnak az edzés szélesebb körű szisztémás előnyeire, amelyek nemcsak az általános egészségre, hanem az immunválaszt érintő folyamatokra is kiterjednek (György és mtsai 2025).

Néhány tanulmány vizsgálta az EV-k "cargo"-ját egészséges idősebb alanyokban. Chong és munkatársai (Chong és mtsai 2024) egy friss kutatásukban az EV-k proteomikáját vizsgálták akut, 20 perces kerékpáros edzés után, amelyet az előre becsült VO₂csúcs 70%-án végeztek. Azt találták, hogy az EV-k fehérjetartalma összefüggésben áll mind a fizikai fitsségi szinttel, mind az életkorral. Annak ellenére, hogy a Chong és munkatársai, valamint az általunk használt protokoll eltérő volt, átfedést találtunk például az S100-A9 fehérje tekintetében, amit EV fehérje "cargo"-ként azonosítottunk.

5.2.5. A korlátozó tényezők megbeszélése

Kutatásunk ezen része is számos limitációval rendelkezik. Csak női alanyokat választottunk ki, a résztvevők a 2019-es Master Evezős Bajnokságon vettek részt, és önként jelentkeztek. Kizártuk azokat az önkénteseket, akiknek vérsír-profilja jelentősen befolyásolhatta volna az EV izolálás minőségét, és ez a férfi résztvevők esetében nagy számban fordult elő. Az életkor, az edzésmúlt, a fizikai fittségi szint, az életmód és a táplálkozási szokások (amelyeket nem lehetett standardizálni a versenyt megelőzően) változatossága befolyásolhatta eredményeinket. A plazma EV-populáció heterogenitása miatt az egyes szövetek hozzájárulása nem teljesen elkülöníthető, így az eredmények inkább az átlagolt plazma EV-profilra vonatkoznak, és nem adnak teljesen szövetspecifikus információt. Ezen korlátozások ellenére azonban határozottan úgy gondoljuk, hogy jelen tanulmányunk értékes és új betekintést nyújt az EV-k szerepébe az életmódhoz kapcsolódó öregedés folyamatába. Jelenleg az öregedés szervfüggő DNS-metilációját vizsgáljuk, és úgy véljük, hogy az edzés indukálta adaptációkban résztvevő EV-k donor- és fogadósejtjeinek azonosítása kulcsfontosságú lépés lesz az edzés öregedésre gyakorolt szisztémás hatásainak mélyebb megértése felé.

6. Következtetések

Kutatásunk során azt a célt tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a több évtizedes testedzés hatását a humán vérben keringő sEV-kre. Ehhez vizsgálatainkat két főbb részre bontottuk.

Első lépésként szükséges volt egy olyan metodikai protokoll elkészítése és validálása, ami alkalmas a mi általunk gyűjtött vérmintákból a szükséges mennyiségű és minőségű EV minták előállítására. A protokoll elkészítése során az ISEV által közzétett MISEV2018 és MISEV2023 irányelvek figyelembevételével, saját pilot vizsgálatok és további irodalmi kutatás eredményeit felhasználva választottuk ki az általunk alkalmazott módszereket.

A vizsgálatunk második részében az elkészített protokoll használatával sEV-ket izoláltunk a két csoportunk (High-fit és Med-Low-fit) mintáiból. Az így kapott izolátumokból proteomikai vizsgálatokat végeztünk, hogy a feltárt fehérjéket, és az általunk kapott fiziológiai paramétereket összehasonlíthassuk, és ez által keressünk kapcsolatot a testmozgás, és annak sEV-kre gyakorolt hatása között.

Legfontosabb eredményeink és az ezekből levonható következtetések az alábbiakban foglalhatók össze:

1. A vérminták feldolgozását minden esetben a mintavételt követő 45 percen belül elvégeztük. A kapott PFP minták egyaránt alkalmasak voltak az azonnali, illetve a hosszú idejű tárolásukat követő sEV izolálásra. A PFP preanalitikai vizsgálatának bevezetése viszonylag újszerű dolog volt részünkről, azonban azóta már a MISEV2023-as irányelvek is felhívják a figyelmet a fontosságára. A preanalitikai vizsgálatok során sikerült minden olyan mintát kiszelektálnunk, ami nem lett volna alkalmas az sEV izolálásra. Ezzel mi is alátámasztottuk a helyes mintaelőkészítés a preanalitikai mérések fontosságát, ami az sEV-vel való munka során hatványozottan fontos, mivel nincsenek egységes protokollok és módszerek.

2. Az sEV izoláláshoz kiválasztott fő módszerünk a méretkizárásos kromatográfia volt, ahol elsőként összehasonlítottuk a 35 nm-es és a 70 nm-es oszlopokat, mivel szeretnénk volna megtudni, hogy melyik oszloptípus alkalmasabb annak a feltételünknek eleget tenni, hogy minél több sEV-t és minél kevesebb kontaminációt tartalmazzanak a minták. Az izolálás hatékonyságát az IZON qEV original 35 nm-es és 70 nm-es oszlopok használatával, részletes proteomikai elemzéssel értékeltük. A pórusméret alapján úgy gondoltuk, hogy a 70 nm-es oszlop lesz alkalmasabb erre a célra. A 9 pár mintának az eredményei azt mutatták, hogy mindkét oszlop hatékonyan izolálta a vezikulákat, ám a 70 nm-es oszlopon nagyobb mennyiségben mutattunk ki „vezikuláris” fehérjéket. Arra a következtetésre jutottunk, hogy humán plazma mintából való sEV izolálás esetén, különösképp, ha proteomikai vizsgálat a végcél az izolátumokból, akkor a 70 nm-es oszlop a megfelelőbb erre a célra.

3. Klinikai és kutatási körülmények között nem mindig biztosított a minták azonnali feldolgozása, ezért lényeges megállapítani, hogy a minták meddig tárolhatóak biztonságosan anélkül, hogy az az eredmények sikertelenségét vagy erős torzulását okozná. Az ugyanazon alanyok (n=6) friss plazmájából és a >2,5 évig tárolt fagyasztott plazmából izolált vezikulák összehasonlítása a 70nm-es oszlopon nem mutatott jelentős különbségeket, ami azt jelzi, hogy a fagyasztott PFP minták is alkalmasak a vezikulák elemzésére. Megállapítottuk tehát, hogy a megfelelően előkészített PFP biztonságosan tárolható $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on legalább 2,5 évig.

4. A fehérje mennyiségében nem találtunk eltérést a High-fit és a Med-Low-fit csoport tagjai között. Hasonlóképpen, a fehérjeszintek és a fiziológiai fittségi mutatók közötti kapcsolatok sem értek el statisztikai szignifikanciát az $\text{FDR}<0,05$ szintjén. Elemzéseinkben a memóriefunkció (kognitív képességek), a vérzsírparaméterek (LDL, HDL) és a testtömegindex (BMI) között mutatkozó korrelációk a többszörös összehasonlításokra alkalmazott korrekció után nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak. Az eredmények alapján a vizsgált fehérjék szerepe ezekben a fiziológiai folyamatokban nem zárható ki teljesen,

azonban a minta mérete, a biológiai variabilitás vagy az alkalmazott statisztikai módszerek korlátai miatt a lehetséges kapcsolatok kimutatása nem volt sikeres.

5. A kutatócsoportunk által korábban kifejlesztett DNAmFitAge öregedési óra - amely a fiziológiai funkciókhoz kapcsolódó géneket is magában foglalja - és 10 sEV mintában izolált fehérjének a mennyisége között kapcsolatot tudtunk kimutatni. Ez arra utal, hogy a testmozgás során keletkező EV-k kulcsszerepet tölthetnek be az epigenetikai öregedés mechanizmusában.
6. Nem találtunk összefüggést a vezikulákban lévő fehérjék és a rendszeres testmozgásban eltöltött évek száma, valamint az alapvető táplálkozási szokások között, azonban a heti edzésórák pozitívan korreláltak a Koagulációs faktor V-tel, a C4b kötő fehérje alfa láncával, és a Komplement C1q alegység B-vel. Ezek a fehérjék kulcsfontosságú biológiai folyamatokban vesznek részt, például a véralvadásban, az immunválaszban és a komplementrendszer aktiválásában. Mivel az életmóddal kapcsolatos paraméterek felmérése önbevalláson alapult, és nem közvetlen mérési adatokon, ezért vizsgálatunk elsősorban az összefüggések feltérképezésére irányult, ebből következően ezekből az adatokból nem kívántunk erős, egyértelmű következtetéseket levonni.
7. Az alfa-2-antiplazmin (A2AP), amely a fibrinolízis egyik fő gátlója, a High-fit csoport 20 résztvevőjéből kilencnél volt jelen az sEV-kben, míg a Med-Low-fit csoportban nem detektáltuk. Az A2AP, mint az sEV-k "szállítója", hatással lehet az alvadás és a fibrinolízis egyensúlyára, ami különösen fontos lehet intenzív fizikai aktivitás során a túlzott vérzés vagy vérrögképződés elkerülése érdekében.
8. Az SH3BGRL3, amely négy High-fit, de egyetlen Med-Low-fit alany mintájában sem volt jelen, olyan fehérje, amelyről feltételezik, hogy szerepet játszik az EV-kben a testmozgás által indukált fizikai stressz sejtszintű válaszainak szabályozásában. Ezenkívül, a szervezet alacsonyabb szintjén az SH3BGRL3 a redox szabályozásban is részt vesz.

Eredményeink alapján a következő megállapításokat tehetjük a módszertan kidolgozása során felállított hipotéziseinkről:

1.1: Feltételezzük, hogy a minták alapos preanalitikai vizsgálata segít az sEV izolálásra legalkalmasabb minták kiválasztásában. **IGAZ**

1.2: Feltételezzük, hogy a 70 nm-es pórusnagyságú oszlop kisebb kontaminációval, hatékonyabban izolál sEV-ket tömegspektrometriás mérésre, mint a 35 nm-es oszlop. **IGAZ**

1.3: Feltételezzük, hogy a frissen levett vérből készült PFP, és a hosszabb távon fagyasztva tárolt PFP egyaránt alkalmas az sEV izolálásra. **IGAZ**

Eredményeink alapján a következő megállapításokat tehetjük az edzettségi szint és a kis méretű extracelluláris vezikulák (sEV) kapcsolatának vizsgálatára vonatkozó hipotéziseinkről:

2.1: Feltételezzük, hogy az sEV minták proteomikai elemzése során kapcsolatot találunk a vezikulákban található fehérjék, és az epigenetikai öregedés üteme között. **IGAZ**

2.2: Feltételezzük, hogy szignifikáns különbség mutatható ki a két csoport sEV mennyiségi meghatározásában. **NEM IGAZ**

2.3: Feltételezzük, hogy szignifikáns különbség mutatható ki a fehérjeszintek és a fiziológiai fitsségi mutatók között az edzettségi szint függvényében. **NEM IGAZ**

6.1. Új tudományos eredmények és gyakorlati használhatóság

Kutatásunk egyik új tudományos eredménye, hogy kimutattuk: friss, valamint hosszú távon (több mint 2,5 évig) fagyasztva tárolt trombocita-mentes plazmából is ugyanolyan minőségű sEV izolálható. Ez jelentős gyakorlati előnnyel bír, mivel lehetővé teszi a hosszú ideig tárolt minták megbízható felhasználását a későbbi vizsgálatokban. Eredményeink továbbá rámutattak, hogy az sEV-k izolálására az IZON qEV original 70

nm-es pórusátmérőjű töltetet tartalmazó méretkizárásos kromatográfiás oszlop alkalmasabb választás, mint a 35 nm-es pórusátmérőjű változat, különösen akkor, ha a minták további proteomikai vagy tömegspektrometriás elemzésre kerülnek.

Vizsgálataink során kapcsolatot tártunk fel a kutatócsoportunk által kifejlesztett, edzettség-szenzitív DNAmFitAge öregedési óra és az sEV mintákban azonosított fehérjék (Annexin A2, Protein S100-49, Fibrinogén béta lánc, Fibrinogén gamma lánc, Komplement C4-A, Fibrinogén alfa lánc, Immunoglobulin nehéz változó, Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz, Komplement C3, Vitronectin) mennyisége között. Emellett megállapítottuk, hogy a heti edzésórák száma pozitív korrelációt mutatott több fehérjével, így a Koagulációs faktor V-vel, a C4b kötő fehérje alfa láncával, valamint a Komplement C1q B alegységével.

Kiemelendő továbbá az alfa-2-antiplazmin (A2AP) szerepe, amely a fibrinolízis egyik fő gátlója. Ezt a fehérjét a magas fittségű csoport 20 résztvevője közül 9 esetben detektáltuk, míg a közepesen alacsony fittségű csoportban nem volt jelen. Ez arra utal, hogy az sEV-k által szállított A2AP befolyással lehet az aktív testmozgás során tapasztalt fokozott fibrinolízisre.

Összefoglalásként eredményeink azt sugallják, hogy a rendszeres testmozgás és az egészség közötti kapcsolat közvetítői részben az EV-k lehetnek. Az EV-k által szállított fehérjék és egyéb molekulák hozzájárulhatnak a testmozgás ismert szisztémás hatásaihoz. A különböző fittségű csoportokból származó EV-k proteomikai összetétele továbbá korrelált a DNAmFitAge-akcelerációval, amely az edzés által indukált epigenetikai öregedés modulációjára utal.

7. Összefoglalás

Manapság egyre népszerűbbek a szabadidős sporttevékenységek, és gyakran hangsúlyozzák a rendszeres mozgás egészségre gyakorolt jótékony hatásait. A kutatások folyamatosan vizsgálják a fizikai aktivitás szerepét a betegségek megelőzésében és az öregedési folyamatok lassításában. Bár ismert, hogy a rendszeres testmozgás kedvezően befolyásolja az egészséget, a mögöttes mechanizmusok még nem teljesen feltártak. Egy lehetséges közvetítő szereplők az extracelluláris vezikulák, amelyek szabadon keringenek a véráramban, és membránjukba csomagolva nukleinsavakat, fehérjéket és lipideket szállítanak, így hozzájárulhatnak a testmozgás szisztémás hatásaihoz.

Kutatásunk során szeretnénk volna megvizsgálni azt, hogy egy magas- és egy közepesen alacsony fittségű csoport alanyaiból izolált kis méretű extracelluláris vezikulákat tartalmazó mintában milyen proteomikai különbségek jelennek meg. Ezzel szeretnénk volna a fenti kérdésre keresett válasz ismereteit bővíteni. Először egy megfelelő metodika kidolgozása/megalkotása volt a célunk, amivel megfelelő minőségű és mennyiségű kis méretű extracelluláris vezikulát tudunk izolálni az alanyok vérmintáiból.

Vizsgálatunk során egészséges alanyok vérplazmájából izoláltunk kis méretű extracelluláris vezikulákat az általunk kifejlesztett protokoll segítségével. Az izolált minták proteomikai vizsgálatát elvégeztük, majd adatainkat szoftveresen értékeltük.

Összegzésként megállapítottuk, hogy a különböző fitességi szintű csoportokból származó extracelluláris vezikulák proteomikai tartalma korrelál a DNAmFitAge-akcelerációval, ami az edzés által indukált epigenetikai öregedés modulációjára utal. Specifikus fehérjetartalmuk szerepet játszik a gyulladás, az immunrendszer szabályozása, az anyagcsere és a sejtes regeneráció folyamatában. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a fizikai állapot és a DNS-metiláció alapú öregedés modulációja összefügg, az edzés preventív hatása pedig részben az extracelluláris vezikulák közvetítésével valósulhat meg.

8. Summary

Recreational physical activities are becoming increasingly popular nowadays, and the beneficial effects of regular exercise on health are often emphasized. Research continuously investigates the role of physical activity in disease prevention and the slowing of aging processes. While it is known that regular exercise positively impacts health, the underlying mechanisms are not yet fully understood. One possible mediator could be extracellular vesicles, which circulate freely in the bloodstream and transport nucleic acids, proteins, and lipids encapsulated in their membranes, potentially contributing to the systemic effects of exercise.

In our research, we aimed to investigate the proteomic differences in small-sized extracellular vesicle-containing samples isolated from individuals of high and moderately low fitness levels. Through this, we hoped to expand the current knowledge on the aforementioned topic. Our first goal was to develop a suitable methodology to isolate high-quality and sufficient quantities of small extracellular vesicles from the blood samples of the subjects.

In our study, we isolated small extracellular vesicles from the blood plasma of healthy subjects using the protocol we developed. We then performed proteomic analysis of the isolated samples and evaluated the data through software.

In conclusion, we found that the proteomic content of extracellular vesicles from groups of different fitness levels correlates with DNAmFitAge acceleration, indicating exercise-induced modulation of epigenetic aging. The specific protein content of these vesicles plays a role in inflammation, immune system regulation, metabolism, and cellular regeneration. Our results suggest that physical condition and DNA methylation-based aging modulation are interconnected, and the preventive effects of exercise may be partly mediated by extracellular vesicles.

9. Irodalomjegyzék

Aczel D, Torma F, Jokai M, McGreevy K, Boros A, Seki Y, Boldogh I, Horvath S, Radak Z. (2023) The Circulating Level of Klotho Is Not Dependent upon Physical Fitness and Age-Associated Methylation Increases at the Promoter Region of the Klotho Gene. *Genes*, 14:525.

Allen L, Williams J, Townsend N, Mikkelsen B, Roberts N, Foster C, Wickramasinghe K. (2017) Socioeconomic status and non-communicable disease behavioural risk factors in low-income and lower-middle-income countries: a systematic review. *The Lancet Global Health*, 5:e277–e289.

Anderson AS, Caswell S. (2009) Obesity management — An opportunity for cancer prevention. *The Surgeon*, 7:282–285.

Aviv H, Yusuf Khan M, Skurnick J, Okuda K, Kimura M, Gardner J, Priolo L, Aviv A. (2001) Age dependent aneuploidy and telomere length of the human vascular endothelium. *Atherosclerosis*, 159:281–287.

Bandini LG, Must A, Phillips SM, Naumova EN, Dietz WH. (2004) Relation of body mass index and body fatness to energy expenditure: longitudinal changes from preadolescence through adolescence. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80:1262–1269.

Baranyai T, Herczeg K, Onódi Z, Voszka I, Módos K, Marton N, Nagy G, Mäger I, Wood MJ, el Andaloussi S, Pálincás 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.

Barcellos FC, del Vecchio FB, Reges A, Mielke G, Santos IS, Umpierre D, Bohlke M, Hallal PC. (2018) Exercise in patients with hypertension and chronic kidney disease: a randomized controlled trial. *Journal of Human Hypertension*, 32:397–407.

- Basso JC, Suzuki WA. (2017) The Effects of Acute Exercise on Mood, Cognition, Neurophysiology, and Neurochemical Pathways: A Review. *Brain Plasticity*, 2:127–152.
- Baylin SB, Ohm JE. (2006) Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nature Reviews Cancer*, 6:107–116.
- Bebelmann MP, Smit MJ, Pegtel DM, Baglio SR. (2018) Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 188:1–11.
- Belsky DW, Caspi A, Arseneault L, Baccarelli A, Corcoran DL, Gao X, Hannon E, Harrington HL, Rasmussen LJ, Houts R, Huffman K, Kraus WE, Kwon D, Mill J, Pieper CF, Prinz JA, Poulton R, Schwartz J, Sugden K, ... Moffitt TE. (2020) Quantification of the pace of biological aging in humans through a blood test, the DunedinPoAm DNA methylation algorithm. *ELife*, 9:e54870.
- Belsky DW, Caspi A, Corcoran DL, Sugden K, Poulton R, Arseneault L, Baccarelli A, Chamarti K, Gao X, Hannon E, Harrington HL, Houts R, Kothari M, Kwon D, Mill J, Schwartz J, Vokonas P, Wang C, Williams BS, Moffitt TE. (2022) DunedinPACE, a DNA methylation biomarker of the pace of aging. *ELife*, 11:e73420.
- Bern M, Kil YJ, Becker C. (2012) Byonic: Advanced Peptide and Protein Identification Software. *Current Protocols in Bioinformatics*, 13:13.20.1-13.20.14.
- Bettin B, Gasecka A, Li B, Dhondt B, Hendrix A, Nieuwland R, van der Pol E. (2022) Removal of platelets from blood plasma to improve the quality of extracellular vesicle research. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 20:2679–2685.
- Bird AP. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321:209–213.
- Blackburn EH. (2000) Telomere states and cell fates. *Nature*, 408:53–56.
- Blondell SJ, Hammersley-Mather R, Veerman JL. (2014) Does physical activity prevent cognitive decline and dementia?: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *BMC Public Health*, 14:510.

Bohannon RW. (2019) Grip Strength: An Indispensable Biomarker For Older Adults. *Clinical Interventions in Aging*, 14:1681–1691.

Böing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, Coumans FAW, Sturk A, Nieuwland R. (2014) Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3:23430.

Bracht JWP, Los M, van der Pol E, Verkuijlen SAWM, van Eijndhoven MAJ, Pegtel DM, Nieuwland R. (2024) Choice of size-exclusion chromatography column affects recovery, purity, and miRNA cargo analysis of extracellular vesicles from human plasma. *Extracellular Vesicles and Circulating Nucleic Acids*, 5:497–508.

Brahmer A, Neuberger E, Esch-Heisser L, Haller N, Jorgensen MM, Baek R, Möbius W, Simon P, Krämer-Albers E. (2019) Platelets, endothelial cells and leukocytes contribute to the exercise-triggered release of extracellular vesicles into the circulation. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8:1615820.

Braun F, Rinschen M, Buchner D, Bohl K, Plagmann I, Bachurski D, Richard Späth M, Antczak P, Göbel H, Klein C, Lackmann J, Kretz O, Puelles VG, Wahba R, Hallek M, Schermer B, Benzing T, Huber TB, Beyer A, ... Müller R. (2020) The proteomic landscape of small urinary extracellular vesicles during kidney transplantation. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10:e12026.

Brennan K, Martin K, FitzGerald SP, O’Sullivan J, Wu Y, Blanco A, Richardson C, McGee MM. (2020) A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Scientific Reports*, 10:1039.

Buckley JP, Sim J, Eston RG, Hession R, Fox R. (2004) Reliability and validity of measures taken during the Chester step test to predict aerobic power and to prescribe aerobic exercise. *British Journal of Sports Medicine*, 38:197–205.

Buenafe AC, Dorrell C, Reddy AP, Klimek J, Marks DL. (2022) Proteomic analysis distinguishes extracellular vesicles produced by cancerous versus healthy pancreatic organoids. *Scientific Reports*, 12:3556.

Bugyi F, Tóth G, Kovács KB, Drahos L, Turiák L. (2022) Comparison of solid-phase extraction methods for efficient purification of phosphopeptides with low sample amounts. *Journal of Chromatography A*, 58:e4965.

Buzas EI. (2023) The roles of extracellular vesicles in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 23:236–250.

Buzás EI, Tóth ÉÁ, Sódar BW, Szabó-Taylor KÉ. (2018) Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles. *Seminars in Immunopathology*, 40:453–464.

Carnell-Morris P, Tannetta D, Siupa A, Hole P, Dragovic R. (2017) Analysis of Extracellular Vesicles Using Fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis. *Methods Mol Biol*, 1660:153-173.

Castaneda C, Gordon PL, Uhlin KL, Levey AS, Kehayias JJ, Dwyer JT, Fielding RA, Roubenoff R, Singh MF. (2001) Resistance Training To Counteract the Catabolism of a Low-Protein Diet in Patients with Chronic Renal Insufficiency. *Annals of Internal Medicine*, 135:965.

Chakravarty EF. (2008) Reduced Disability and Mortality Among Aging Runners. *Archives of Internal Medicine*, 168:1638.

Chang YK, Labban JD, Gapin JI, Etnier JL. (2012) The effects of acute exercise on cognitive performance: A meta-analysis. *Brain Research*, 1453:87–101.

Chen K, Zhao BS, He C. (2016) Nucleic Acid Modifications in Regulation of Gene Expression. *Cell Chemical Biology*, 23:74–85.

Cherkas LF. (2008) The Association Between Physical Activity in Leisure Time and Leukocyte Telomere Length. *Archives of Internal Medicine*, 168:154.

Chettimada S, Lorenz DR, Misra V, Dillon ST, Reeves RK, Manickam C, Morgello S, Kirk GD, Mehta SH, Gabuzda D. (2018) Exosome markers associated with immune activation and oxidative stress in HIV patients on antiretroviral therapy. *Scientific Reports*, 8:7227.

Choi D, Kim D, Kim Y, Gho YS. (2015) Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes. *Mass Spectrometry Reviews*, 34:474–490.

Chong MC, Shah AD, Schittenhelm RB, Silva A, James PF, Wu SSX, Howitt J. (2024) Acute exercise-induced release of innate immune proteins via small extracellular vesicles changes with aerobic fitness and age. *Acta Physiologica*, 240:e14095.

Cianciaruso C, Phelps EA, Pasquier M, Hamelin R, Demurtas D, Alibashe Ahmed M, Piemonti L, Hirose S, Swartz MA, de Palma M, Hubbell JA, Baekkeskov S. (2017) Primary Human and Rat β -Cells Release the Intracellular Autoantigens GAD65, IA-2, and Proinsulin in Exosomes Together With Cytokine-Induced Enhancers of Immunity. *Diabetes*, 66:460–473.

Ciferri MC, Quarto R, Tasso R. (2021) Extracellular Vesicles as Biomarkers and Therapeutic Tools: From Pre-Clinical to Clinical Applications. *Biology*, 10:359.

Clayton A, Boilard E, Buzas EI, Cheng L, Falcón-Perez JM, Gardiner C, Gustafson D, Gualerzi A, Hendrix A, Hoffman A, Jones J, Lässer C, Lawson C, Lenassi M, Nazarenko I, O’Driscoll L, Pink R, Siljander PR, Soekmadji C, ... Nieuwland R. (2019) Considerations towards a roadmap for collection, handling and storage of blood extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8:1647027.

Cloutier N, Tan S, Boudreau LH, Cramb C, Subbiah R, Lahey L, Albert A, Shnyder R, Gobeze 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 Molecular Medicine*, 5:235–249.

Coleman A, Harris TM, Ramanathan S. (2020) DNA hypomethylation drives changes in MAGE-A gene expression resulting in alteration of proliferative status of cells. *Genes and Environment*, 42:24.

Corona ML, Hurbain I, Raposo G, van Niel G. (2023) Characterization of Extracellular Vesicles by Transmission Electron Microscopy and Immunolabeling Electron Microscopy. *Methods Mol Biol*, 2668:33-43.

Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel JP, Rolland Y, Schneider SM, Topinková E, Vandewoude M, Zamboni M. (2010) Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. *Age and Ageing*, 39:412–423.

Cunningham C, O’Sullivan R, Caserotti P, Tully MA. (2020) Consequences of physical inactivity in older adults: A systematic review of reviews and meta-analyses. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 30:816–827.

Dar GH, Mendes CC, Kuan W-L, Speciale AA, Conceição M, Görgens A, Uliyakina I, Lobo MJ, Lim WF, el Andaloussi S, Mäger I, Roberts TC, Barker RA, Goberdhan DC, Wilson C, Wood MJ. (2021). Author Correction: GAPDH controls extracellular vesicle biogenesis and enhances the therapeutic potential of EV mediated siRNA delivery to the brain. *Nature Communications*, 12:7357.

Darragh IAJ, O’Driscoll L, Egan B. (2021) Exercise Training and Circulating Small Extracellular Vesicles: Appraisal of Methodological Approaches and Current Knowledge. *Frontiers in Physiology*, 12.

Das P, Mukherjee A, Adak S. (2021) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase present in extracellular vesicles from *Leishmania major* suppresses host TNF- α expression. *Journal of Biological Chemistry*, 297:101198.

Denham J, Spencer SJ. (2020) Emerging roles of extracellular vesicles in the intercellular communication for exercise-induced adaptations. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 319:320–329.

Desai PP, Narra K, James JD, Jones HP, Tripathi AK, Vishwanatha JK. (2022) Combination of Small Extracellular Vesicle-Derived Annexin A2 Protein and mRNA as a Potential Predictive Biomarker for Chemotherapy Responsiveness in Aggressive Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers*, 15:212.

Dhondt B, Pinheiro C, Geeurickx E, Tulkens J, Vergauwen G, van der Pol E, Nieuwland R, Decock A, Miinalainen I, Rappu P, Schroth G, Kuersten S, Vandesompele J, Mestdagh P, Lumen N, de Wever O, Hendrix A. (2023) Benchmarking blood collection tubes and processing intervals for extracellular vesicle performance metrics. *Journal of Extracellular Vesicles*, 12:e12315.

di Pisa F, Pesenti E, Bono M, Mazzarello AN, Bernardi C, Lisanti MP, Renzone G, Scaloni A, Ciccone E, Fais F, Bruno S, Scartezzini P, Ghiotto F. (2021) SH3BGRL3 binds to myosin 1c in a calcium dependent manner and modulates migration in the MDA-MB-231 cell line. *BMC Molecular and Cell Biology*, 22:41.

Distefano G, Goodpaster BH. (2018) Effects of Exercise and Aging on Skeletal Muscle. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8:a029785.

Doyle, Wang M. (2019) Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8:727.

Duan R, Fu Q, Sun Y, Li Q. (2022) Epigenetic clock: A promising biomarker and practical tool in aging. *Ageing Research Reviews*, 81:101743.

Eika F, Blomkvist AW, Rahbek MT, Eikhof KD, Hansen MD, Søndergaard M, Ryg J, Andersen S, Jorgensen MG. (2019) Reference data on hand grip and lower limb strength using the Nintendo Wii balance board: a cross-sectional study of 354 subjects from 20 to 99 years of age. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 20:21.

Ekström K, Crescitelli R, Pétursson HI, Johansson J, Lässer C, Olofsson Bagge R. (2022) Characterization of surface markers on extracellular vesicles isolated from lymphatic exudate from patients with breast cancer. *BMC Cancer*, 22:50.

El-Atat F, Aneja A, Mcfarlane S, Sowers J. (2003) Obesity and hypertension. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 32:823–854.

Erdbrügger U, Lannigan J. (2016) Analytical challenges of extracellular vesicle detection: A comparison of different techniques. *Cytometry Part A*, 89:123–134.

Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, Kim JS, Heo S, Alves H, White SM, Wojcicki TR, Mailey E, Vieira VJ, Martin SA, Pence BD, Woods JA, McAuley E, Kramer AF. (2011) Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108:3017–3022.

Fernández-Rhodes M, Adlou B, Williams S, Lees R, Peacock B, Aubert D, Jalal AR, Lewis MP, Davies OG (2023). Defining the influence of size-exclusion chromatography fraction window and ultrafiltration column choice on extracellular vesicle recovery in a skeletal muscle model. *Journal of Extracellular Biology*, 2:e85.

Fielding RA, Guralnik JM, King AC, Pahor M, McDermott MM, Tudor-Locke C, Manini TM, Glynn NW, Marsh AP, Axtell RS, Hsu FC, Rejeski WJ. (2017) Dose of physical activity, physical functioning and disability risk in mobility-limited older adults: Results from the LIFE study randomized trial. *PLOS ONE*, 12:e0182155.

Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. (2010) Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharmaceutical Research*, 27:796–810.

Fiorito G, Caini S, Palli D, Bendinelli B, Saieva C, Ermini I, Valentini V, Assedi M, Rizzolo P, Ambrogetti D, Ottini L, Masala G. (2021) DNA methylation-based biomarkers of aging were slowed down in a two-year diet and physical activity intervention trial: the DAMA study. *Aging Cell*, 20:e13439.

Fischer S, Deindl E. (2021) Characterization of RNA in Extracellular Vesicles. *Applied Sciences*, 11:7520.

Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, Tracy RP, Walston J, Kimura M, Aviv A. (2006) Leukocyte Telomere Length and Cardiovascular Disease in the Cardiovascular Health Study. *American Journal of Epidemiology*, 165:14–21.

Fliser E, Jerkovic K, Vidovic T, Gorenjak M. (2012) Investigation of unusual high serum indices for lipemia in clear serum samples on Siemens analysers Dimension. *Biochemia Medica*, 22:352–364.

Frühbeis C, Helmig S, Tug S, Simon P, Krämer-Albers E. (2015) Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4:28239.

Garland SN, Johnson B, Palmer C, Speck RM, Donelson M, Xie SX, DeMichele A, Mao JJ. (2014) Physical activity and telomere length in early stage breast cancer survivors. *Breast Cancer Research*, 16:413.

Gaspar LS, Santana MM, Henriques C, Pinto MM, Ribeiro-Rodrigues TM, Girão H, Nobre RJ, Pereira de Almeida L. (2020) Simple and Fast SEC-Based Protocol to Isolate Human Plasma-Derived Extracellular Vesicles for Transcriptional Research. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 18:723–737.

Greening DW, Xu R, Gopal SK, Rai A, Simpson RJ. (2017) Proteomic insights into extracellular vesicle biology – defining exosomes and shed microvesicles. *Expert Review of Proteomics*, 14:69–95.

György B, Pálóczi K, Kovács A, Barabás E, Bekő G, Várnai K, Pállinger É, Szabó-Taylor K, Szabó TG, Kiss AA, Falus A, Buzás EI. (2014) Improved circulating microparticle analysis in acid-citrate dextrose (ACD) anticoagulant tube. *Thrombosis Research*, 133:285–292.

György B, Szatmári R, Ditrói T, Torma F, Pálóczi K, Balbisi M, Visnovitz T, Koltai E, Nagy P, Buzás EI, Horvath S, Radák Z. (2025) The protein cargo of extracellular vesicles correlates with the epigenetic aging clock of exercise sensitive DNAmFitAge. *Biogerontology*, 26:35.

György B, Pálóczi K, Balbisi M, Turiák L, Drahos L, Visnovitz T, Koltai E, Radák Z. (2024) Effect of the 35 nm and 70 nm Size Exclusion Chromatography (SEC) Column and Plasma Storage Time on Separated Extracellular Vesicles. *Curr Issues Mol Biol*, 46:4337-4357.

Hake SB, Xiao A, Allis CD. (2004) Linking the epigenetic ‘language’ of covalent histone modifications to cancer. *British Journal of Cancer*, 90:761–769.

Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, Friend S, Ideker T, Zhang K. (2013) Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Molecular Cell*, 49:359–367.

Heidarzadeh M, Zarebkohan A, Rahbarghazi R, Sokullu E. (2023) Protein corona and exosomes: new challenges and prospects. *Cell Commun Signal*, 21:64.

Hofmann L, Ludwig S, Vahl JM, Brunner C, Hoffmann TK, Theodoraki M-N. (2020) The Emerging Role of Exosomes in Diagnosis, Prognosis, and Therapy in Head and Neck Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21:4072.

Holliday R. (2006) Epigenetics: A Historical Overview. *Epigenetics*, 1:76–80.

Horvath S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology*, 14:3156.

Horvath S, Raj K. (2018) DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nature Reviews Genetics*, 19:371–384.

Ialongo CB, Bernardini S. (2016) Phlebotomy, a bridge between laboratory and patient. *Biochimica Medica*, 26:17–33.

Jacobs J. (1887) Experiments on “prehension.” *Mind*, 12:75–79.

Jankovičová J, Sečová P, Michalková K, Antalíková J. (2020) Tetraspanins, More than Markers of Extracellular Vesicles in Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21:7568.

Jeon OH, Wilson DR, Clement CC, Rathod S, Cherry C, Powell B, Lee Z, Khalil AM, Green JJ, Campisi J, Santambrogio L, Witwer KW, Elisseeff JH. (2019) Senescence cell-associated extracellular vesicles serve as osteoarthritis disease and therapeutic markers. *JCI Insight*, 4:e125019.

Johnson MS, Figueroa-Colon R, Herd SL, Fields DA, Sun M, Hunter GR, Goran MI. (2000) Aerobic Fitness, Not Energy Expenditure, Influences Subsequent Increase in Adiposity in Black and White Children. *Pediatrics*, 106:e50.

- Jokai M, Torma F, McGreevy KM, Koltai E, Bori Z, Babszki G, Bakonyi P, Gombos Z, Gyorgy B, Aczel D, Toth L, Osvath P, Fridvalszky M, Teglas T, Posa A, Kujach S, Olek R, Kawamura T, Seki Y, Radak Z. (2023) DNA methylation clock DNAmFitAge shows regular exercise is associated with slower aging and systemic adaptation. *GeroScience*, 45:2805–2817.
- Kabagwira J, Gonda A, Vallejos P, Babcock B, Langridge WHR, Senthil M, Wall NR. (2021) Optimization of blood handling for plasma extracellular vesicle isolation. *Journal of Nanoparticle Research*, 23:65.
- Kaminsky LA, Arena R, Myers J. (2015) Reference Standards for Cardiorespiratory Fitness Measured With Cardiopulmonary Exercise Testing. *Mayo Clinic Proceedings*, 90:1515–1523.
- Keller BO, Sui J, Young AB, Whittall RM. (2008) Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 627:71–81.
- Kodam SP, Ullah M. (2021) Diagnostic and Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 20:15330338211041203.
- Koltai E, Hart N, Taylor AW, Goto S, Ngo JK, Davies KJA, Radak Z. (2012) Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 303:R127–R134.
- Koltai E, Szabo Z, Atalay M, Boldogh I, Naito H, Goto S, Nyakas C, Radak Z. (2010) Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mechanisms of Ageing and Development*, 131:21–28.
- Koncz A, Turiák L, Németh K, Kittel Á, Pálóczi K, Vékey K, Buzás EI. (2021) Extracellular vesicles in the detection and therapy of colorectal cancer. *Journal of Extracellular Biology*, 2:1–11.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128:693–705.
- Kulis M, Esteller M. (2010) DNA Methylation and Cancer. *Adv Genet*, 70:27–56.

Kumar MA, Baba SK, Sadida HQ, Marzooqi SA, Jerobin J, Altemani FH, Algehainy N, Alanazi MA, Abou-Samra A-B, Kumar R, Al-Shabeeb Akil AS, Macha MA, Mir R, Bhat AA. (2024) Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9:27.

Kwon S, Burns TL, Levy SM, Janz KF. (2013) Which Contributes More to Childhood Adiposity—High Levels of Sedentarism or Low Levels of Moderate-through-Vigorous Physical Activity? The Iowa Bone Development Study. *The Journal of Pediatrics*, 162:1169–1174.

Kwon S, Janz KF, Letuchy EM, Burns TL, Levy SM. (2015) Active lifestyle in childhood and adolescence prevents obesity development in young adulthood. *Obesity*, 23:2462–2469.

Lachner M, O’Sullivan RJ, Jenuwein T. (2003) An epigenetic road map for histone lysine methylation. *Journal of Cell Science*, 116:2117–2124.

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. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10:437–446.

Lambourne K, Tomporowski P. (2010) The effect of exercise-induced arousal on cognitive task performance: A meta-regression analysis. *Brain Research*, 1341:12–24.

Lang JJ, Prince SA, Merucci K, Cadenas-Sanchez C, Chaput J-P, Fraser BJ, Manyanga T, McGrath R, Ortega FB, Singh B, Tomkinson GR. (2024) Cardiorespiratory fitness is a strong and consistent predictor of morbidity and mortality among adults: an overview of meta-analyses representing over 20.9 million observations from 199 unique cohort studies. *British Journal of Sports Medicine*, 58:556–566.

Langfelder P, Horvath S. (2008) WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 9:559.

Larsson SC, Wolk A. (2007) Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86:556–565.

Lässer C, Eldh M, Lötval J. (2012) Isolation and Characterization of RNA-Containing Exosomes. *J Vis Exp*, 59:e3037.

Laurin D, Verreault R, Lindsay J, MacPherson K, Rockwood K. (2001) Physical Activity and Risk of Cognitive Impairment and Dementia in Elderly Persons. *Arch Neurol*, 58:498-504.

Lee I-M. (2010) Physical Activity and Cardiac Protection. *Current Sports Medicine Reports*, 9:214–219.

Legaard GE, Lyngbæk MPP, Almdal TP, Karstoft K, Bennetsen SL, Feineis CS, Nielsen NS, Durrer CG, Liebetrau B, Nystrup U, Østergaard M, Thomsen K, Trinh B, Solomon TPJ, van Hall G, Brønd JC, Holst JJ, Hartmann B, Christensen R, Ried-Larsen M. (2023) Effects of different doses of exercise and diet-induced weight loss on beta-cell function in type 2 diabetes (DOSE-EX): a randomized clinical trial. *Nature Metabolism*, 5:80–895.

Leung JLM, Lee GTH, Lam YH, Chan RCC, Wu JYM. (2011) The use of the Digit Span Test in screening for cognitive impairment in acute medical inpatients. *International Psychogeriatrics*, 23:1569–1574.

Levine ME, Lu AT, Quach A, Chen BH, Assimes TL, Bandinelli S, Hou L, Baccarelli AA, Stewart JD, Li Y, Whitsel EA, Wilson JG, Reiner AP, Aviv A, Lohman K, Liu Y, Ferrucci L, Horvath S. (2018) An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging*, 10:573–591.

Li Y. (2021) Modern epigenetics methods in biological research. *Methods*, 187:104–113.

Lim HJ, Yoon H, Kim H, Kang Y-W, Kim J-E, Kim OY, Lee E-Y, Twizere J-C, Rak J, Kim DK. (2021) Extracellular Vesicle Proteomes Shed Light on the Evolutionary, Interactive, and Functional Divergence of Their Biogenesis Mechanisms. *Front Cell Dev Biol*, 9:734950.

Lin J, Epel E, Blackburn E. (2012) Telomeres and lifestyle factors: Roles in cellular aging. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 730:85–89.

- Lischnig A, Bergqvist M, Ochiya T, Lässer C. (2022) Quantitative Proteomics Identifies Proteins Enriched in Large and Small Extracellular Vesicles. *Molecular & Cellular Proteomics*, 21:100273.
- Liu Y-G, Jiang S-T, Zhang J-W, Zheng H, Zhang L, Zhao H-T, Sang X-T, Xu Y-Y, Lu X. (2024) Role of extracellular vesicle-associated proteins in the progression, diagnosis, and treatment of hepatocellular carcinoma. *Cell & Bioscience*, 14:113.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. (2013) The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153:1194–1217.
- Lu AT, Binder AM, Zhang J, Yan Q, Reiner AP, Cox SR, Corley J, Harris SE, Kuo P-L, Moore AZ, Bandinelli S, Stewart JD, Wang C, Hamlat EJ, Epel ES, Schwartz JD, Whitsel EA, Correa A, Ferrucci L, Horvath S. (2022) DNA methylation GrimAge version 2. *Aging*, 14:9484-9549.
- Lu AT, Quach A, Wilson JG, Reiner AP, Aviv A, Raj K, Hou L, Baccarelli AA, Li Y, Stewart JD, Whitsel EA, Assimes TL, Ferrucci L, Horvath S. (2019) DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging*, 11:303–327.
- Ludwig A, de Miroschedji K, Doepfner TR, Börger V, Ruesing J, Rebmann V, Durst S, Jansen S, Bremer M, Behrmann E, Singer BB, Jastrow H, Kuhlmann JD, el Magraoui F, Meyer HE, Hermann DM, Opalka B, Raunser S, Epple M, Giebel B. (2018) Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7:1528109.
- Mallia A, Gianazza E, Zoanni B, Brioschi M, Barbieri SS, Banfi C. (2020) Proteomics of Extracellular Vesicles: Update on Their Composition, Biological Roles and Potential Use as Diagnostic Tools in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *Diagnostics*, 10:843.
- Mazzocco M, Arrigo P, Egeo A, Maffei M, Vergano A, di Lisi R, Ghiotto F, Ciccone E, Cinti R, Ravazzolo R, Scartezzini P. (2001) A Novel Human Homologue of the SH3BGR Gene Encodes a Small Protein Similar to Glutaredoxin 1 of Escherichia coli. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285:540–545.

McGreevy KM, Radak Z, Torma F, Jokai M, Lu AT, Belsky DW, Binder A, Marioni RE, Ferrucci L, Pośpiech E, Branicki W, Ossowski A, Sitek A, Spólnicka M, Raffield LM, Reiner AP, Cox S, Kobor M, Corcoran DL, Horvath S. (2023) DNAmFitAge: biological age indicator incorporating physical fitness. *Aging*, 15:3904–3938.

Mendivil-Alvarado H, Sosa-León LA, Carvajal-Millan E, Astiazaran-Garcia H. (2022) Malnutrition and Biomarkers: A Journey through Extracellular Vesicles. *Nutrients*, 14:1002.

Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD. (2013) Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature Protocols*, 8:1551–1566.

Monfoulet LE, Martinez MC. (2022) Dietary modulation of large extracellular vesicles: the good and the bad for human health. *Nutr Rev*, 80:1274-1293.

Moore LL, Gao D, Bradlee ML, Cupples LA, Sundarajan-Ramamurti A, Proctor MH, Hood MY, Singer MR, Ellison RC. (2003) Does early physical activity predict body fat change throughout childhood? *Preventive Medicine*, 37:10–17.

Morales-Kastresana A, Jones JC. (2017) Flow Cytometric Analysis of Extracellular Vesicles, 1545:215-225.

Moreno-Gonzalez R, Corbella X, Mattace-Raso F, Tap L, Sieber C, Freiburger E, Kostka T, Guligowska A, Melzer I, Melzer Y, Carlsson AC, Ärnlöv J, Roller-Wirnsberger R, Wirnsberger G, Gil P, Martinez SL, Fabbietti P, Corsonello A, Lattanzio F, Fabbietti P. (2020) Prevalence of sarcopenia in community-dwelling older adults using the updated EWGSOP2 definition according to kidney function and albuminuria. *BMC Geriatrics*, 20:327.

Morimoto LM, White E, Chen Z, Chlebowski RT, Hays J, Kuller L, Lopez AM, Manson J, Margolis KL, Muti PC, Stefanick ML, McTiernan A. (2002) Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women’s Health Initiative (United States). *Cancer Causes and Control*, 13:741–751.

Nederveen JP, Warnier G, di Carlo A, Nilsson MI, Tarnopolsky MA. (2021) Extracellular Vesicles and Exosomes: Insights From Exercise Science. *Frontiers in Physiology*, 11:604274.

Northey JM, Cherbuin N, Pampa KL, Smee DJ, Rattray B. (2018) Exercise interventions for cognitive function in adults older than 50: a systematic review with meta-analysis. *British Journal of Sports Medicine*, 52:154–160.

Oksuzyan A, Maier H, McGue M, Vaupel JW, Christensen K. (2010) Sex Differences in the Level and Rate of Change of Physical Function and Grip Strength in the Danish 1905-Cohort Study. *Journal of Aging and Health*, 22:589–610.

Paffenbarger RS. (2004) Physical Activity Epidemiology. *American Journal of Epidemiology*, 159:910–911.

Parisse P, Rago I, Ulloa Severino L, Perissinotto F, Ambrosetti E, Paoletti P, Ricci M, Beltrami AP, Cesselli D, Casalis L. (2017) Atomic force microscopy analysis of extracellular vesicles. *European Biophysics Journal*, 46:813–820.

Pavani KC, Lin X, Hamacher J, Broeck W van den, Couck L, Peelman L, Hendrix A, van Soom A. (2020) The Separation and Characterization of Extracellular Vesicles from Medium Conditioned by Bovine Embryos. *International Journal of Molecular Sciences*, 21:2942.

Pedrioli G, Piovesana E, Vacchi E, Balbi C. (2021) Extracellular Vesicles as Promising Carriers in Drug Delivery: Considerations from a Cell Biologist's Perspective. *Biology*, 10:376.

Pepe J, Rossi M, Battafarano G, Vernocchi P, Conte F, Marzano V, Mariani E, Mortera SL, Cipriani C, Rana I, Buonomo PS, Bartuli A, de Martino V, Pelle S, Pascucci L, Toniolo RM, Putignani L, Minisola S, del Fattore A. (2020) Characterization of Extracellular Vesicles in Osteoporotic Patients Compared to Osteopenic and Healthy Controls. *Journal of Bone and Mineral Research*, 37:2186–2200.

Pocsfalvi G, Stanly C, Vilasi A, Fiume I, Capasso G, Turiák L, Buzas EI, Vékey K. (2016) Mass spectrometry of extracellular vesicles. *Mass Spectrometry Reviews*, 35:3–21.

- Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH. (2006) Obesity and Cardiovascular Disease: Pathophysiology, Evaluation, and Effect of Weight Loss. *Circulation*, 113:898–918.
- Poojary M, Jishnu PV, Kabekkodu SP. (2020) Prognostic Value of Melanoma-Associated Antigen-A (MAGE-A) Gene Expression in Various Human Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis of 7428 Patients and 44 Studies. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 24:537–555.
- Qiao G, Zhuang W, Dong B, Li C, Xu J, Wang G, Xie L, Zhou Z, Tian D, Chen G, Tang J, Zhou H, Zhang D, Shi R, Chen R, Nian W, Zhang Y, Zhao J, Wen X, ... Qi Y. (2021) Discovery and validation of methylation signatures in circulating cell-free DNA for early detection of esophageal cancer: a case-control study. *BMC Medicine*, 19:243.
- Radak Z, Pan L, Zhou L, Mozaffaritarab S, Gu Y, Pinho RA, Zheng X, Ba X, Boldogh I. (2024a) Epigenetic and “redoxogenetic” adaptation to physical exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 210:65–74.
- Radak Z, Aczél D, Fejes I, Mozaffaritarab S, Pavlik G, Komka Z, Balogh L, Babszki Z, Babszki G, Koltai E, McGreevy KM, Gordevicius J, Horvath S, Kerepesi C. (2024b) Slowed epigenetic aging in Olympic champions compared to non-champions. *GeroScience*, 47:2555-2565.
- Radak Z, Chung HY, Goto S. (2008) Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 44:153–159.
- Rai A, Claridge B, Lozano J, Greening DW. (2024) The Discovery of Extracellular Vesicles and Their Emergence as a Next-Generation Therapy. *Circulation Research*, 135:198–221.
- Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding Cv, Melief CJ, Geuze HJ. (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine*, 183:1161–1172.

- Ratey JJ, Loehr JE. (2011) The positive impact of physical activity on cognition during adulthood: a review of underlying mechanisms, evidence and recommendations. *Revneuro*, 22:171–185.
- Rathmann W, Giani G. (2004) Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the Year 2000 and Projections for 2030. *Diabetes Care*, 27:2568–2569.
- Reiner M, Niermann C, Jekauc D, Woll A. (2013) Long-term health benefits of physical activity – a systematic review of longitudinal studies. *BMC Public Health*, 13:813.
- Rider MA, Hurwitz SN, Meckes DG. (2016) ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. *Scientific Reports*, 6:23978.
- Rikli RE, Edwards DJ. (1991) Effects of a Three-Year Exercise Program on Motor Function and Cognitive Processing Speed in Older Women. *Research Quarterly for Exercise and Sport*, 62:61–67.
- Robertson KD, Wolffe AP. (2000) DNA methylation in health and disease. *Nature Reviews. Genetics*, 1:11–19.
- Robinson SD, Samuels M, Jones W, Stewart N, Eravci M, Mazarakis NK, Gilbert D, Critchley G, Giamas G. (2024) Confirming size-exclusion chromatography as a clinically relevant extracellular vesicles separation method from 1 mL plasma through a comprehensive comparison of methods. *BMC Methods*, 1:7.
- Romani R, Talesa VN, Antognelli C. (2022) The Glyoxalase System Is a Novel Cargo of Amniotic Fluid Stem-Cell-Derived Extracellular Vesicles. *Antioxidants*, 11:1524.
- Rontogianni S, Synadaki E, Li B, Liefwaard MC, Lips EH, Wesseling J, Wu W, Altelaar M. (2019) Proteomic profiling of extracellular vesicles allows for human breast cancer subtyping. *Communications Biology*, 2:325.
- Rosenberg IH. (1997) Sarcopenia: Origins and Clinical Relevance. *The Journal of Nutrition*, 127:990S-991S.

Safdar A, Saleem A, Tarnopolsky MA. (2016) The potential of endurance exercise-derived exosomes to treat metabolic diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, 12:504–517.

Sánchez-Sánchez JL, Lu WH, Gallardo-Gómez D, del Pozo Cruz B, de Souto Barreto P, Lucia A, Valenzuela PL. (2024) Association of intrinsic capacity with functional decline and mortality in older adults: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *The Lancet Healthy Longevity*, 5:e480–e492.

Sanwlani R, Gangoda L. (2021) Role of Extracellular Vesicles in Cell Death and Inflammation. *Cells*, 10:2663.

Sasaki K, Takano S, Tomizawa S, Miyahara Y, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Takada M, Ohtsuka M. (2021) C4b-binding protein α -chain enhances antitumor immunity by facilitating the accumulation of tumor-infiltrating lymphocytes in the tumor microenvironment in pancreatic cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40:212.

Schübeler D. (2015) Function and information content of DNA methylation. *Nature*, 517:321–326.

Seki Y, Aczel D, Torma F, Jokai M, Boros A, Suzuki K, Higuchi M, Tanisawa K, Boldogh I, Horvath S, Radak Z. (2023) No strong association among epigenetic modifications by DNA methylation, telomere length, and physical fitness in biological aging. *Biogerontology*, 24:245–255.

Sharma S, Gillespie BM, Palanisamy V, Gimzewski JK. (2011) Quantitative Nanostructural and Single-Molecule Force Spectroscopy Biomolecular Analysis of Human-Saliva-Derived Exosomes. *Langmuir*, 27:14394–14400.

Shiroma EJ, Lee IM. (2010) Physical Activity and Cardiovascular Health. *Circulation*, 122:743–752.

Sidhom K, Obi PO, Saleem A. (2020) A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? *International Journal of Molecular Sciences*, 21:6466.

- Simpson RJ, Lowder TW, Spielmann G, Bigley AB, LaVoy EC, Kunz H. (2012) Exercise and the aging immune system. *Ageing Research Reviews*, 11:404–420.
- Singh S, Kumar P, Padwad YS, Jaffer FA, Reed GL (2024). Targeting Fibrinolytic Inhibition for Venous Thromboembolism Treatment: Overview of an Emerging Therapeutic Approach. *Circulation*, 150:884–898.
- Skliar M, Chernyshev VS. (2019) Imaging of Extracellular Vesicles by Atomic Force Microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, 151.
- Skriner K, Adolph K, Jungblut PR, Burmester GR. (2006) Association of citrullinated proteins with synovial exosomes. *Arthritis & Rheumatism*, 54:3809–3814.
- Sódar BW, Kittel Á, Pálóczi K, Vukman Kv, Osteikoetxea X, Szabó-Taylor K, Németh A, Sperlág B, Baranyai T, Giricz Z, Wiener Z, Turiák L, Drahos L, Pállinger É, Vékey K, Ferdinandy P, Falus A, Buzás EI. (2016) Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. *Scientific Reports*, 6:24316.
- Sofi F, Valecchi D, Bacci D, Abbate R, Gensini GF, Casini A, Macchi C. (2011) Physical activity and risk of cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *Journal of Internal Medicine*, 269:107–117.
- Spiriduso WW, Clifford P. (1978) Replication of Age and Physical Activity Effects on Reaction and Movement Time. *Journal of Gerontology*, 33:26–30.
- Stranska R, Gysbrechts L, Wouters J, Vermeersch P, Bloch K, Dierickx D, Andrei G, Snoeck R. (2018) Comparison of membrane affinity-based method with size-exclusion chromatography for isolation of exosome-like vesicles from human plasma. *Journal of Translational Medicine*, 16:1.
- Suades R, Padró T, Vilahur G, Badimon L. (2022) Platelet-released extracellular vesicles: the effects of thrombin activation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79:190.
- Sun Y, Saito K, Saito Y. (2022) Lipidomic Analysis of Extracellular Vesicles Isolated from Human Plasma and Serum. *Methods Mol Biol*, 2504:157-173.

- Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Sawabe M, Arai T, Fujiwara M, Ishii A, Nakamura K, Takubo K. (2013) Association of telomere shortening in myocardium with heart weight gain and cause of death. *Scientific Reports*, 3:2401.
- Ter-Ovanesyan D, Norman M, Lazarovits R, Trieu W, Lee JH, Church GM, Walt DR. (2021) Framework for rapid comparison of extracellular vesicle isolation methods. *ELife*, 10:e70725.
- Tetta C, Ghigo E, Silengo L, Deregibus MC, Camussi G. (2013) Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication. *Endocrine*, 44:11-19.
- Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. (2006) Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 30:3.22.
- Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer FK, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach J, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter AA, Bebawy M, ... Zuba-Surma EK. (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7:1535750.
- Tillaar R van den, Roaas T, Oranchuk D. (2020) Comparison of effects of training order of explosive strength and plyometrics training on different physical abilities in adolescent handball players. *Biology of Sport*, 37:239–246.
- Tóth EÁ, Turiák L, Visnovitz T, Cserép C, Mázló A, Sódar BW, Försönits AI, Petővári G, Sebestyén A, Komlósi Z, Drahos L, Kittel Á, Nagy G, Bácsi A, Dénes Á, Gho YS, Szabó-Taylor KÉ, Buzás EI. (2021) Formation of a protein corona on the surface of extracellular vesicles in blood plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10:e12140.
- Turiák L, Misják P, Szabó TG, Aradi B, Pálóczi K, Ozohanics O, Drahos L, Kittel Á, Falus A, Buzás EI, Vékey K. (2011) Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *Journal of Proteomics*, 74:2025–2033.

Turner NP, Abeysinghe P, Kwan Cheung KA, Vaswani K, Logan J, Sadowski P, Mitchell MD. (2022) A Comparison of Blood Plasma Small Extracellular Vesicle Enrichment Strategies for Proteomic Analysis. *Proteomes*, 10:19.

Uddin MJ, Mohite P, Munde S, Ade N, Oladosu TA, Chidrawar VR, Patel R, Bhattacharya S, Paliwal H, Singh S. (2024) Extracellular vesicles: The future of therapeutics and drug delivery systems. *Intelligent Pharmacy*, 2:312–328.

Vallabhajosyula P, Korutla L, Habbertheuer A, Yu M, Rostami S, Yuan CX, Reddy S, Liu C, Korutla V, Koeberlein B, Trofe-Clark J, Rickels MR, Naji A. (2017) Tissue-specific exosome biomarkers for noninvasively monitoring immunologic rejection of transplanted tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 127:1375–1391.

van Deun J, Mestdagh P, Agostinis P, Akay Ö, Anand S, Anckaert J, Martinez ZA, Baetens T, Beghein E, Bertier L, Berx G, Boere J, Boukouris S, Bremer M, Buschmann D, Byrd JB, Casert C, Cheng L, Cmoch A, ... Hendrix A. (2017) EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nature Methods*, 14:228–232.

Vechetti IJ, Valentino T, Mobley CB, McCarthy JJ. (2021) The role of extracellular vesicles in skeletal muscle and systematic adaptation to exercise. *The Journal of Physiology*, 599:845–861.

Veerman RE, Teeuwen L, Czarnewski P, Güclüler Akpınar G, Sandberg A, Cao X, Pernemalm M, Orre LM, Gabrielsson S, Eldh M. (2021) Molecular evaluation of five different isolation methods for extracellular vesicles reveals different clinical applicability and subcellular origin. *J Extracell Vesicles*, 10:e12128.

Vergauwen G, Dhondt B, van Deun J, de Smedt E, Berx G, Timmerman E, Gevaert K, Miinalainen I, Cocquyt V, Braems G, van den Broecke R, Denys H, de Wever O, Hendrix A. (2017) Confounding factors of ultrafiltration and protein analysis in extracellular vesicle research. *Scientific Reports*, 7:2704.

Wang XH, Mitch WE. (2013) Muscle wasting from kidney failure—A model for catabolic conditions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45:2230–2238.

Warburton DER, Bredin SSD. (2016) Reflections on Physical Activity and Health: What Should We Recommend? *Canadian Journal of Cardiology*, 32:495–504.

Watson EL, Greening NJ, Viana JL, Aulakh J, Bodicoat DH, Barratt J, Feehally J, Smith AC. (2015) Progressive Resistance Exercise Training in CKD: A Feasibility Study. *American Journal of Kidney Diseases*, 66:249–257.

Weiner DE, Liu CK, Miao S, Fielding R, Katznel LI, Giffuni J, Well A, Seliger SL. (2023) Effect of Long-term Exercise Training on Physical Performance and Cardiorespiratory Function in Adults With CKD: A Randomized Controlled Trial. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 81:59–66.

Welsh JA, Goberdhan DCI, O’Driscoll L, Buzás EI, Blenkiron C, Bussolati B, Cai H, di Vizio D, Driedonks TAP, Erdbrügger U, Falcon-Perez JM, Fu Q, Hill AF, Lenassi M, Lim SK, Mahoney MG, Mohanty S, Möller A, Nieuwland R, ... Witwer KW. (2024) Minimal information for studies of extracellular vesicles (MIEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles*, 13:e12404.

Werner C, Fürster T, Widmann T, Pöss J, Roggia C, Hanhoun M, Scharhag J, Büchner N, Meyer T, Kindermann W, Haendeler J, Böhm M, Laufs U. (2009) Physical Exercise Prevents Cellular Senescence in Circulating Leukocytes and in the Vessel Wall. *Circulation*, 120:2438–2447.

Whitham M, Parker BL, Friedrichsen M, Hingst JR, Hjorth M, Hughes WE, Egan CL, Cron L, Watt KI, Kuchel RP, Jayasooriah N, Estevez E, Petzold T, Suter CM, Gregorevic P, Kiens B, Richter EA, James DE, Wojtaszewski JFP, Febbraio MA. (2018) Extracellular Vesicles Provide a Means for Tissue Crosstalk during Exercise. *Cell Metabolism*, 27:237–251.e4.

Wilks DC, Besson H, Lindroos AK, Ekelund U. (2011) Objectively measured physical activity and obesity prevention in children, adolescents and adults: a systematic review of prospective studies. *Obesity Reviews*, 12:e119-29.

Woodcock J, Franco OH, Orsini N, Roberts I. (2011) Non-vigorous physical activity and all-cause mortality: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *International Journal of Epidemiology*, 40:121–138.

- Wu Ct, Morris JR. (2001) Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence. *Science*, 293:1103–1105.
- Xu R, Fitts A, Li X, Fernandes J, Pochampally R, Mao J, Liu YM. (2016) Quantification of Small Extracellular Vesicles by Size Exclusion Chromatography with Fluorescence Detection. *Analytical Chemistry*, 88:10390–10394.
- Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzás EI, Casal E, Chaput N, Chen C, Cocucci E, del Portillo HA, Dieterich L, Eichelser C, Falcón-Perez JM, Falconer E, Fernández-Messina L, Foulds L, Gámez-Valero A, ... Zernecke A. (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4:27066.
- Yang Y, Wang Y, Wei S, Zhou C, Yu J, Wang G, Wang W, Zhao L. (2021) Extracellular vesicles isolated by size-exclusion chromatography present suitability for RNomics analysis in plasma. *Journal of Translational Medicine*, 19:104.
- Yuana Y, Böing AN, Grootemaat AE, van der Pol E, Hau CM, Cizmar P, Buhr E, Sturk A, Nieuwland R. (2015) Handling and storage of human body fluids for analysis of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4:29260.
- Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. (2015) Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioScience*, 65:783–797.
- Zhang Y, Kim JS, Wang TZ, Newton RU, Galvão DA, Gardiner RA, Hill MM, Taaffe DR. (2021) Potential Role of Exercise Induced Extracellular Vesicles in Prostate Cancer Suppression. *Frontiers in Oncology*, 11:746040.
- Zhang Y, Wilson R, Heiss J, Breitling LP, Saum KU, Schöttker B, Holleczeck B, Waldenberger M, Peters A, Brenner H. (2017) DNA methylation signatures in peripheral blood strongly predict all-cause mortality. *Nature Communications*, 8:14617.
- Zhou Q, Yan Y, Li Y, Fu H, Lu D, Li Z, Wang Y, Wang J, Zhu H, Ren J, Luo H, Tao M, Cao Y, Wei S, Fan S. (2022) Tumor-derived extracellular vesicles in melanoma immune response and immunotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 156:113790.

10. Saját publikációk jegyzéke

Disszertáció alapjául szolgáló közlemények

György B, Szatmári R, Ditrói T, Torma F, Pálóczi K, Balbisi M, Visnovitz T, Koltai E, Nagy P, Buzás EI, Horvath S, Radák Z. (2025) The protein cargo of extracellular vesicles correlates with the epigenetic aging clock of exercise sensitive DNAmFitAge. *Biogerontology*, 26:35.

György B, Pálóczi K, Balbisi M, Turiák L, Drahos L, Visnovitz T, Koltai E, Radák Z. (2024) Effect of the 35 nm and 70 nm Size Exclusion Chromatography (SEC) Column and Plasma Storage Time on Separated Extracellular Vesicles. *Curr Issues Mol Biol*, 46:4337-4357.

Egyéb közlemények

Jokai M, Torma F, McGreevy KM, Koltai E, Bori Z, Babszki G, Bakonyi P, Gombos Z, Gyorgy B, Aczel D, Toth L, Osvath P, Fridvalszky M, Teglas T, Posa A, Kujach S, Olek R, Kawamura T, Seki Y, Suzuki K, Tanisawa K, Goto S, Kerepesi C, Boldogh I, Ba X, Davies KJA, Horvath S, Radak Z. (2023) DNA methylation clock DNAmFitAge shows regular exercise is associated with slower aging and systemic adaptation. *Geroscience*, 45:2805-2817.

Aczel D, Gyorgy B, Bakonyi P, BukhAri R, Pinho R, Boldogh I, Yaodong G, Radak Z. (2022) The Systemic Effects of Exercise on the Systemic Effects of Alzheimer's Disease. *Antioxidants (Basel)*, 11:1028.

György B, Torma F, Babszky G, Jókai M, Gombos Z, Bakonyi P, Búzás E, Pálóczi K, Szabó T, Radak Z, Koltai E. (2021) Time frame of the extracellular vesicles release after high intensity exercise. *MAGYAR SPORTTUDOMÁNYI SZEMLE*, 22:77-81.

Bakai-Bereczki I, Herczeg M, György B, Naesens L, Herczegh P. (2015) Synthesis of a sialic acid derivative of ristocetin aglycone as an inhibitor of influenza virus. *Chemical Papers*, 69:1136-1140.

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni hálás köszönetem Dr. Radák Zsolt Professzor Úrnak, amiért lehetőséget adott nekem arra, hogy munkámat a kutatócsoportja teljesjogú tagjaként végezhessem. Mai napig nagy megtiszteltetés számomra, hogy a nevem az ő neve mellett szerepelhet közös kutatásainkban. Rengeteget tanultam tőle, nemcsak szakmai, hanem emberi téren is. Igazán megtisztelő és felemelő élmény volt a kutatócsoportjának tagjaként dolgozni, az itt töltött idő számomra mindig szép emlék marad. Szívből kívánom, hogy másoknak is legyen lehetőségük hasonlóan nagyszerű emberek irányítása alatt elvégezni a doktori képzésüket. Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Koltai Erikának, hogy az irodája mindig nyitva állt előttem, és segítette a szakmai előrehaladásomat. Pontos és precíz tanácsai mindig segítették a munkámat, sokat tanultam a közösen eltöltött idő alatt. Továbbá szeretném megköszönni a Magyar Testnevelési és Sporttudományi Egyetem Molekuláris Edzésélettani Kutató Központ valamennyi munkatársának, és hallgató társaimnak, hogy szakmai tanácsaikkal, építő kritikáikkal és bátorító szavaikkal hozzájárultak kutatásom sikeréhez.

Szeretnék köszönetet nyilvánítani Dr. Buzás Edit Professzor Asszonynak, a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított a tanulásra és kísérleteim elvégzésére, ezzel együtt néhány évre kutatócsoportjának a tagja lehettem, mint külsős PhD hallgató. Örömmel tölt el, hogy közösen publikálhattunk, és hálás vagyok az ő személyéért, mert az irodája mindig nyitva állt, és rengeteg segítséget kaptam tőle, hogy befejezzem kutatásom. Csak ismételni tudom magam, kívánom mindenkinek, hogy ilyen nagyszerű emberek tanítsák és egyengessék a kutatói pályájukat. Ezzel együtt szeretnék köszönetet mondani a Genetika, Sejt- és Immunbiológiai Intézet valamennyi munkatársának és hallgatóinak – kiemelten Karácsony-Pálóczy Krisztinának - hogy mindig készséggel álltak rendelkezésemre, legyen szó technikai segítségről, adminisztratív ügyekről vagy éppen barátságos légkör biztosításáról.

Szeretném megköszönni továbbá a HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont Szerves Kémiai Intézetének és az Országos Onkológiai Intézet

Molekuláris Immunológia és Toxikológia osztályának valamennyi dolgozójának, akik segítették vizsgálataim elvégzését.

Külön köszönettel tartozom opponenseimnek, amiért idejüket és figyelmüket szánták munkám bírálataira, és építő javaslataikkal segítették a disszertáció végső formájának kialakítását.

Hálás szívvel szeretném megköszönni családomnak a támogatásukat és szeretetüket, amely végigkísérte utamat, és lehetővé tette számomra, hogy elérjem ezt a mérföldkövet. Külön szeretném megköszönni édesanyámnak, édesapámnak, nénikémnek, testvéremnek és nagyszüleimnek, hogy megmutatták a család egy olyan intézmény, amely az életünk alapját képezi: biztonságot, szeretetet és támogatást nyújt, miközben formálja értékrendünket és személyiségünket.

Szeretném megköszönni barátaimnak, akik hozzájárultak ahhoz, hogy ne érezzem magam egyedül ezen az úton. Támogatások és barátságok olyan erőforrás volt, amely nélkül ez a munka nem készülhetett volna el. Hálás szívvel szeretném megköszönni férjemnek, Baláznak, hogy életem része lett, és a képzés utolsó évében olyan támogatást és szeretetet adott, ami felbecsülhetetlen számomra. Végző, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a bennem élő kislánynak, hogy gyermekként volt bátorsága igazán nagyot álmodni, magamnak pedig azt, hogy ezt az álmot tűzön-vízen át hajtottam.

Legvégül pedig álljon itt egy idézet Madame Curie-től, akinek inspiráló életútja, és a tudomány iránti szeretete már gyermekként elindított vegyész pályafutásomon, és későbbi kutatói pályafutásom alatt is bármikor tudott inspirálni és motiválni.

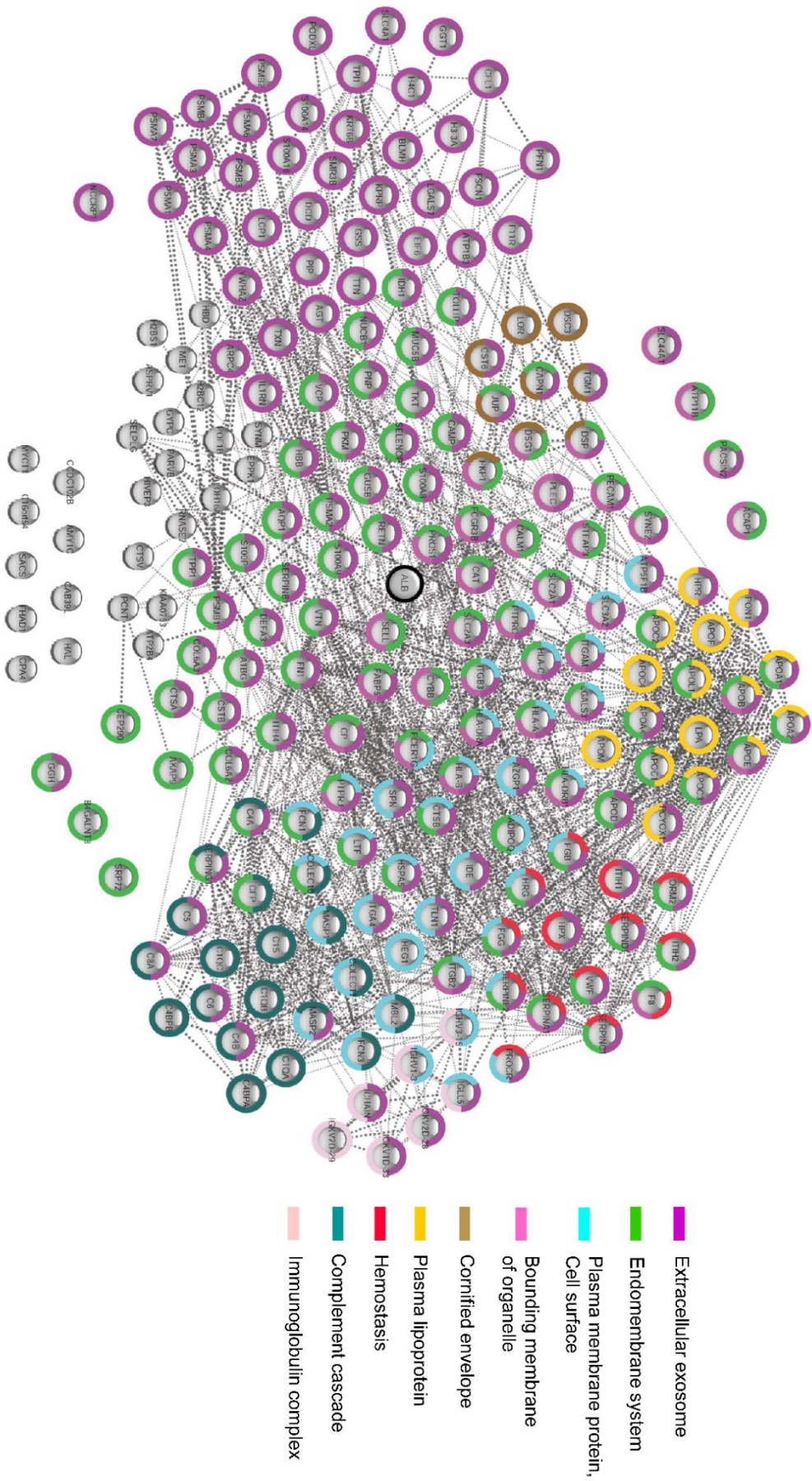
„Nekem azt tanították, hogy a haladás útja se nem gyors, se nem könnyű.”

Függelék

Függelék A

		„vezikuláris” fehérjék								Mérés		
Rövidített név	Fehérje név	Extracellular exosome	Endomembrane system	Plasma membrane	Bouncing membrane of organelle	35 nm n=11		70 nm n=17		(A) + (B) %	(A) %	(B) %
		GO: 0070662	GO: 0012845	GO: 0005886	GO: 0005885	% (A) + (B)	Adat (A) Adat (B) 6/5	% (A) + (B)	Adat (A) Adat (B) 13/4	35 nm < 70 nm	35 nm > 70 nm	
A2MG	Alpha-2-macroglobulin	x	x			100	6/5	100	13/4			
ANXA1	Annexin A1	x	x	x	x	100	6/5	100	13/4			
ANXA2	Annexin A2	x	x	x	x	100	6/5	100	13/4			
CD5L	CD5 antigen-like			x		100	6/5	100	13/4			
G3P	Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase	x	x	x		100	6/5	100	13/4			
LG3BP	Galactin-3-binding protein	x	x			100	6/5	100	13/4			
CD34	Hematopoietic progenitor cell antigen CD34			x		18	1/1	41	6/1			
EZRI	Ezrin	x	x	x		36	1/3	41	3/4			
LAMP1	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	x	x	x	x	18	0/2	24	1/3			
MFGM	Lactadherin	x	x	x	x	45	2/3	88	11/4			
RAC2	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	x	x	x	x	64	3/4	65	7/4			
A2ML1	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1	x				55	1/5	59	6/4			
CD36	Platelet glycoprotein 4		x	x	x	91	5/5	94	12/4			
EF1A3	Putative elongation factor 1-alpha-like 3		x	x		82	4/5	82	10/4			
ENO4	Alpha-enolase	x	x	x	x	82	4/5	100	13/4			
GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	x		x		91	5/5	94	12/4			
PRDX1	Peroxisodoxin-1	x				82	4/5	94	12/4			
ACTB	Beta-actin-like protein 2	x				45	5/0	65	11/0			
LAMB4	Laminin subunit beta 4					9	1/0	24	4/0			
CD44	CD44 antigen	x	x	x	x	27	0/3	35	4/2			
CD81	CD81 antigen	x		x		73	4/4	76	10/3			
CFAH	Complement factor 11	x				73	6/2	100	13/4			
ANXA4	Annexin A4	x	x	x		9	0/1	12	0/2			
CDC42	Cell division control protein 42 homolog	x	x	x	x	18	0/2	24	0/4			
CLIC1	Chloride intracellular channel protein 1	x	x	x		9	0/1	18	0/3			
FLOT1	FLOTIN-1	x	x	x	x	9	0/1	12	0/2			
GNAS2	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	x	x	x		9	0/1	18	0/3			
HSS0A	Heat shock protein HSP90-alpha	x	x	x		9	0/1	18	0/3			
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	x	x	x	x	9	0/1	18	0/3			
RAP2B	Ras-related protein Rap2b	x	x	x	x	9	0/1	12	0/2			
RAP1B	Ras-related protein Rap-1b	x	x	x	x	82	5/4	82	10/4			
HSP72	Heat shock-related 70 kDa protein 2	x	x	x	x	55	6/0	59	10/0			
RAP1A	Ras-related protein Rap-1A	x	x	x	x	45	5/0	47	8/0			
TBA1B	Tubulin alpha 1B chain					36	0/4	35	2/4			
EF2	Elongation factor 2	x	x	x		45	0/5	29	1/4			
AACT	Alpha-5-antichymotrypsin	x	x			91	5/5	88	11/4			
HSPB1	Heat shock protein beta-1	x	x	x		64	2/5	53	5/4			
PPIA	Peptidyl prolyl cis-trans isomerase A	x	x			45	0/5	35	2/4			
SDCB1	Syntenin-1	x	x	x		82	4/5	76	9/4			
ACTG	Actin, cytoplasmic 2	x	x	x		45	0/5	24	0/4			
MYH9	Myosin 9	x	x	x		45	0/5	24	0/4			
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	x				45	0/5	24	0/4			
RAB10	Ras-related protein Rab-10	x	x	x	x	45	0/5	24	0/4			
RAB7A	Ras-related protein Rab-7a	x	x	x	x	45	0/5	24	0/4			
ANXA5	Annexin A5	x		x		36	0/4	24	0/4			
ANXA6	Annexin A6	x	x	x	x	27	0/3	18	0/3			
ARF1	ADP-ribosylation factor 1	x	x	x	x	9	0/1	6	0/1			
AT1A1	Sodium/potassium transporting ATPase subunit alpha-1	x	x	x		36	0/4	24	0/4			
CD37	Leukocyte antigen CD37	x		x		27	0/3	24	0/4			
FLNA	Filamin A	x	x	x		36	0/4	24	0/4			
FLOT2	FLOTIN-2	x	x	x	x	27	0/3	18	0/3			
ITA6	Integrin alpha 6			x		27	0/3	24	0/4			
LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	x				27	0/3	18	0/3			
RAB14	Ras-related protein Rab-14	x	x	x	x	9	0/1	6	0/1			
RAB1B	Ras-related protein Rab-1B	x	x	x	x	9	0/1	6	0/1			
RAB8A	Ras-related protein Rab-8A	x	x	x	x	18	0/2	18	0/3			
RAB8B	Ras-related protein Rab-8B	x	x	x	x	18	0/2	12	0/2			
PRDX6	Peroxisodoxin-6	x	x			18	0/2	18	0/3			
CD9	CD9 antigen	x	x	x	x	82	5/4	59	6/4			
FLNB	Filamin B	x		x		36	1/3	24	1/3			
PDC6I	Programmed cell death 6-interacting protein	x	x	x		55	2/4	41	3/4			
TBB2A	Tubulin beta-2A chain	x				36	3/1	35	4/2			
CD59	CD59 glycoprotein	x	x	x	x	100	6/5	76	9/4			
HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein	x	x	x	x	100	6/5	88	11/4			
PRDX2	Peroxisodoxin 2	x				100	6/5	94	12/4			
STOM	Stomatin	x	x	x	x	100	6/5	94	12/4			
TFR1	Transferrin receptor protein 1	x	x	x	x	100	6/5	94	12/4			
CD5L	Cell division cycle 5-like protein					18	2/0	12	2/0			
TPC12	Trafficking protein particle complex subunit 12		x			9	1/0	6	1/0			
ANX11	Annexin A11	x	x			18	0/2	6	0/1			
CLH1	Clahtin heavy chain 1	x	x	x	x	27	0/3	6	0/1			
PDCD6	Programmed cell death protein 6	x	x	x	x	18	0/2	6	0/1			
RAB5C	Ras-related protein Rab-5C	x	x	x	x	18	0/2	6	0/1			
HS71A	Heat shock 70 kDa protein 1A	x	x	x		91	6/4	76	10/3			

Függelék B



Függelék C

Rövidített név	Fehérje név	Cellular Component														Biological Process										35 nm n=9 Adat (A)/ Adat (B)	70 nm n=9 Adat (A)/ Adat (B)	Mérés			
		Extracellular exosome	Plasma membrane	Cell surface	Bounding membrane of organelle	Cytoplasmic vesicle membrane	COPI-coated ER to Golgi transport vesicle	Endoplasmic reticulum	Endosome	Lysosome	Cytoskeleton	Proteasome complex	Regulation of immune system process	Regulation of cell death	Regulation of cell migration	Regulation of cell-cell adhesion	Regulation of vesicle-mediated transport	Regulation of cell morphogenesis	35 nm = 70 nm	35 nm < 70 nm	35 nm > 70 nm	(A) + (B)	(A)	(B)							
																						%	%	%							
																						%	%	%							
DRB	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1 beta chain	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/3												
DRA	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/3												
HLAA	HLA class I histocompatibility antigen, A alpha chain	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/4	0/4												
HLAB	HLA class I histocompatibility antigen, B alpha chain	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/4	0/4												
HLAC	HLA class I histocompatibility antigen, C alpha chain	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/2												
B2MG	Beta-2-microglobulin	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/1	2/3												
STX4	Syntaxin-4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/1	0/2												
ITB3	Integrin beta-3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	3/3	4/4												
PTPRJ	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/3												
ITAM	Integrin alpha-M	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/1												
ITB2	Integrin beta-2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/3	0/3												
LEG3	Galectin-3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1/1	2/1												
PTPRC	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/3	0/3												
4F2	4F2 cell-surface antigen heavy chain	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/3	0/3												
BIP	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/3	0/4												
CATB	Cathepsin B	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1/2	0/3												
HRG	Histidine-rich glycoprotein	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	3/4	2/4												
TRFL	Lactotransferrin	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	4/3	5/3												
TLN1	Talin-1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/3	0/4												
EPCR	Endothelial protein C receptor	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	3/0	3/0												
ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/3	0/3												
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/1	0/3												
IDE	Insulin-degrading enzyme	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/4	0/4												
ITA4	Integrin alpha-4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/2												
LEUK	Leukosialin	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	3/4	5/4												
MASP2	Mannan-binding lectin serine protease 2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	2/2	5/3												
ZA2G	Zinc-alpha-2-glycoprotein	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	5/4	5/4												
PACN2	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	2/0	0/0												
COR1A	Coronin-1A	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/1	0/4												
FABP5	Fatty acid-binding protein 5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	5/4	5/4												
LYN	Tyrosine-protein kinase Lyn	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/1	0/2												
DESP	Desmoplakin	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	5/4	5/4												
GTR3	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/2												
PECA1	Platelet endothelial cell adhesion molecule	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/3	2/3												
CATA	Catalase	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	5/4	5/4												
SYNE2	Nesprin-2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	2/0	2/0												
PROS	Vitamin K-dependent protein 5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	4/4	5/4												
GBB2	Guanine nucleotide-binding protein (G1I/G1S)/G1T subunit beta-2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/0	0/4												
GTR1	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/4	0/4												
PLEC	Plectin	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/4	0/4												
CTL1	Choline transporter-like protein 1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/1												
CIB1	Calcium and integrin-binding protein 1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/1	0/3												
RHOC	Rho-related GTP-binding protein RhoC	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/1	0/2												
CO6A2	Collagen alpha-2(VI) chain	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	5/4	5/4												
CO6A3	Collagen alpha-3(VI) chain	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	5/4	5/4												
VTNC	Vitronectin	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	4/4	5/4												
CAP1	Adenylyl cyclase-associated protein 1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/1	0/2												
CAN1	Calpain-1 catalytic subunit	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/4	0/4												
PCYOX	Preynylcysteine oxidase 1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/2												
COF1	Cofilin-1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	2/2	3/4												
PLSL	Plastin 2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/3	0/3												
PLAK	Junction plakoglobin	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	5/4	5/4												
PEPL	Periplakin	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/0	0/3												
FSCN1	Fascin	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/1												
TITIN	Titin	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	5/0	5/0												
WDR1	WD repeat-containing protein 1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/1	0/3												
B3AT	Band 3 anion transport protein	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	4/4	3/4												
PODXL	Podocalyxin	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	3/3	5/4												
S10A8	Protein S100-A8	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	5/4	5/4												
S10A9	Protein S100-A9	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	5/4	5/4												
CYTM	Cystatin-M	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/3												
TGM1	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	5/4	5/4												
AQP1	Aquaporin-1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/2												
AT1B3	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/2												
GGT1	Glutathione hydrolase 1 proenzyme	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	2/0	3/0												
GNA13	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha 13	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/1	0/3												
IL1RA	Interleukin-1 receptor antagonist protein	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/0												
ITH4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain I14	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	2/3	3/4												
JAM1	Junctional adhesion molecule A	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/3												
MUC5B	Mucin-5B	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/2												
S100P	Protein S100-P	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/2												
A2AP	Alpha-2-antiplasmin	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/0												
TERA	Transferrin endoplasmic reticulum ATPase	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/2												
PPGB	Lysosomal protective protein	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/3	0/2												
FETUA	Alpha-2-HS-glycoprotein	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/1	0/3												
HEP2	Heparin cofactor 2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/1												
ITH2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain I12	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	3/4	5/4												
KPYM	Pyruvate kinase PKM	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	4/4	4/4												
NUCB1	Nucleobindin-1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/1												
TKT	Transketolase	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0/2	0/4												

Függelék D

Rövidített név	Fehérje név	Cellular Component														Biological Process														Mérés			
		Extracellular exosome	Plasma membrane	Cell surface	Bounding membrane of organelle	Cytoplasmic vesicle membrane	COPII-coated ER to Golgi transport vesicle	Endoplasmic reticulum	Endosome	Lysosome	Cytoskeleton	Proteasome complex	Regulation of immune system process	Regulation of cell death	Regulation of cell migration	Regulation of cell-cell adhesion	Regulation of vesicle-mediated transport	Regulation of cell morphogenesis	35 nm	70 nm	(A) + (B) %	(A) %	(B) %										
		n=9	n=9	n=9	n=9	n=9	n=9	n=9	n=9	n=9	n=9	n=9	n=9	n=9	n=9	n=9	n=9	n=9	Adat (A)/ Adat (B)	Adat (A)/ Adat (B)	35 nm < 70 nm	35 nm > 70 nm											
		5/4	5/4	5/4	5/4	5/4	5/4	5/4	5/4	5/4	5/4	5/4	5/4	5/4	5/4	5/4	5/4	5/4	5/4	5/4	5/4	5/4	5/4										
TPP1	Tripeptidyl-peptidase 1	X						X	X									0/2	0/1														
ILEU	Leukocyte elastase inhibitor	X						X	X									0/2	0/2														
A1AG2	Alpha-1-acid glycoprotein 2	X						X				X						4/4	3/4														
BGLR	Beta-glucuronidase	X						X										4/0	5/0														
DEF3	Neutrophil defensin 3	X						X										3/3	4/4														
GGH	Gamma-glutamyl hydrolase	X						X										0/4	0/4														
RETN	Resistin	X						X										0/2	0/3														
TOLIP	Toll interacting protein	X						X										0/4	0/2														
PSA1	Proteasome subunit alpha type 1	X								X	X	X						0/3	0/4														
ARPC4	Actin related protein 2/3 complex subunit 4	X						X										0/2	0/3														
MYL6	Myosin light polypeptide 6	X						X										0/0	0/2														
CAN7	Calpain-7	X						X					X					0/0	4/0														
GDIR2	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	X						X						X				0/1	0/3														
IF6	Eukaryotic translation initiation factor 6	X						X		X								1/3	1/3														
K2C6B	Keratin, type II cytoskeletal 6B	X						X										0/4	0/4														
PROF1	Profilein 1	X						X					X					0/3	0/4														
PSA2	Proteasome subunit alpha type 2	X								X								0/4	0/3														
PSA3	Proteasome subunit alpha type 3	X								X								0/4	0/3														
PSA4	Proteasome subunit alpha type 4	X								X								0/1	0/3														
PSA6	Proteasome subunit alpha type 6	X								X								0/2	0/3														
PSA7	Proteasome subunit alpha type 7	X								X								0/3	0/3														
PSB1	Proteasome subunit beta type-1	X								X								0/2	0/3														
PSB2	Proteasome subunit beta type-2	X								X								0/2	0/0														
PSB3	Proteasome subunit beta type-3	X								X								0/2	0/1														
S10AE	Protein S100-A14	X									X		X					4/4	3/3														
LEG7	Galectin-7	X									X			X				3/4	4/4														
PNPH	Purine nucleoside phosphorylase	X								X				X				0/3	0/2														
BPIB1	BPI fold-containing family B member 1	X									X							0/1	0/2														
H4	Histone H4	X									X							5/4	5/4														
I433Z	I4-3-3 protein zeta/delta	X										X						5/4	4/4														
NDKB	Nucleoside diphosphate kinase B	X											X					0/1	0/2														
THIO	Thioredoxin	X											X					5/4	5/4														
S10AB	Protein S100-A11	X												X				0/1	0/4														
A18G	Alpha 18 glycoprotein	X																0/2	0/4														
AL9A1	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	X																0/1	0/2														
BLMH	Bleomycin hydrolase	X																3/4	2/4														
CALL3	Calmodulin-like protein 3	X																0/0	0/2														
CAMP	Cathelicidin antimicrobial peptide	X																5/0	1/0														
CYTB	Cytalin-B	X																0/4	0/4														
DCD	Dermeidin	X																5/4	5/4														
FBX50	F-box only protein 50	X																4/4	4/4														
GSHB	Glutathione synthetase	X																0/2	0/3														
H33	Histone H3.3	X																3/3	2/3														
IDHC	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	X																0/3	0/4														
ITIH1	Inter alpha trypsin inhibitor heavy chain I11	X																3/1	5/3														
KPRP	Keratinoctye proline rich protein	X																5/4	5/4														
MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial	X																0/0	0/4														
SMR3B	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	X																3/0	5/0														
TPIS	Triosephosphate isomerase	X																0/4	0/4														
ZG16B	Zymogen granule protein 16 homolog B	X																1/0	2/0														

Függelék E

Kategória	Leírás	Term. név	#Gének	Gének	#Hátér gének	FDR érték	p-érték	Transzponált FDR érték	SUID hálozat
GO Cellular Component	Extracellular exosome	GO:0070062	186	PSMA4 SLC2A3 APOH TGM1 SERPIND1 PSMA3 PROCR CORO1A RETN POMY PSMA2 CS PRN1 VTN CTSC APOC3 ARHGDB TPH1 LTF HRG APO8 APOA2 CAT VASP GGT1 SMAP23 KRT6B APOE BPFB1 CAPN7 IGALS3 LURN IGH PZP VWF PSMAG BLMH CDH4 ATP9F1B PSMB1 SLCA11 ALB1 PKCSIN2 CS ICP ICAM1 HPX IDE ITIH4 SERPINF3 STOD41 ITIH1 AHSG SERPINF1 RHOC ATP1B3 PSMB4 PIP CSTB ACGF1 NCFE1 COL6A3 S100P GAMP FABP5 TFPI COL6A2 GUSB GNB2 FGB PLG AQP1 CSTB TOLLIP CALML3 TLN1 STX4 PKM1 SERPINF2 TUFM PLEC HSPA5 MDH2 DEFA3 SERPINA5 BSG FGG PPL NCFE1 APOD CTSB ALDH9A1 FMT APOA4 SYNE2 ITIH2 VCP HLA-DRA1 C8A PNP TGM2 LAGT H3-3A1 SERPINC1 APOA2 FHLB1 ZAGLW2 STOD414 STOD416 STOD48 STOD49 DM6B72 PSMA7 IGG22 CTSA CAP1 YYW48 PSMB2 EF6 TXN SLCAA1 HLA-C SLCA2 PODXL IGALS7 DSP SERPINE1 C10orf9 ZG168 FSGN1 NME2 GMP JUP PROS1 PSAP HLA-DRA YWHAZ HLA-A ITGA4 ITGB2 ICP1 MASP2 NUCB1 PCYOX1 ARPC4 IDH1 TKT ORM2 C9A HLA-B PTPRJ GNAL3 DCCD PTPRC LRRCS PSMA1 C9B SERPINA1 SLC2A1 SELENOP MDR1 LYN GELS CAPN1 CTLL FCGR3B MUC5B JCHAV JPR MYL6 IGKV2D-28 ITG8B3 PCAM1 TTN KPRP H4C1 CIB1 SMR3B1 IGKV2D-32 PSMB3 H9B GSS ROX ITGAM1 B2M SPN	2096	9.45E-102	7.59E-08	0.56161846	218