

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Megakaryocita-thrombocyta eredetű mikroRNS-
ek vizsgálata szepszisben és *in vitro* szeptikus
körülmények között**

Debreczeni-Szilágyi Bernadett

Témavezető: Dr. Nagy Béla



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2022**

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	6
1. Bevezetés	8
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1 A vérlemezkék aktiválódása és annak szerepe szepszisben	9
2.2 Az NF- κ B-út vonal aktiválódása szepszisben a TLR4 receptoron keresztül.....	12
2.3 A miRNS-ek biológiai jelentősége, keletkezése és működése	14
2.4 Az extracelluláris miRNS-ek funkciója	16
2.5 A vérlemezke miRNS-ek jelentősége	16
2.6 A vérlemezke-fehérjék expressziójának indukált változásai	18
2.7 Thrombocyta eredetű mikropartikulák szepszisben.....	19
2.8 Az endothelsejt aktiváció szerepe szeptikus körülmények között.....	20
3. Célkitűzések	23
3.1 Megakaryocyta/thrombocyta eredetű miRNS-ek vizsgálata szepszisben:	23
3.2 Vérlemezke mikropartikulákon keresztüli miRNS transzfer szerepének vizsgálata az endothelsejt aktiváció szabályozásában:	23
4. Anyagok és módszerek	24
4.1 Betegek és kontrollok	24
4.2 Mintavétel és mintafeldolgozás	25
4.2.1 Leukocyta-depletált thrombocyta minták előkészítése	25
4.2.2 Thrombocyták aktiválása szepszist mimikáló in vitro körülmények között..	25
4.2.3 Thrombocyták in vitro aktiválása mikropartikula termelés generálása céljából	26
4.2.4 Vérlemezke-eredetű mikropartikulák izolálása.....	26
4.2.5 Thrombocyták aktivációs állapotának vizsgálata és a mikropartikulák kvantálása áramlási citometriával	26

4.2.6 Szolubilis ICAM-1, P-szelektin és TNF- α koncentrációinak meghatározása ELISA-val	27
4.2.7 Össz-RNS izolálás.....	27
4.2.8 TaqMan OpenArray	28
4.2.9 Az mRNS és prekursor miRNS expressziójának meghatározása	29
4.2.10 A miRNS expressziók meghatározása specifikus stem loop primerekkel ...	29
4.3 Sejtkultúrák tenyésztése és kezelése.....	31
4.3.1 Megakaryocyták (MEG-01) tenyésztése gyulladásos körülmények között...	31
4.3.2 Endothelsejtek tenyésztése és inkubálása szepszises és normál vérmintákból izolált mikropartikulákkal, illetve in vitro TRAP-indukált PMP mintákkal.....	31
4.4 Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok	32
4.4.1 Az NF- κ B-út vonal aktiválódásának vizsgálata MEG-01 sejtekben.....	32
4.4.2 A Dicer1 fehérje szintjének vizsgálata MEG-01 sejtekben	32
4.4.3 A thrombocyta-eredetű mikropartikulák endothelsejtekbe való internalizációjának vizsgálata	33
4.4.4 A leukocyták endothelsejtekhez történő adhéziójának követése fluoreszcens mikroszkópiával	33
4.5 A Dicer1 enzim és a P-szelektin fehérje mennyiségi meghatározása Western blot-tal	34
4.6 A Dicer1 enzim expressziójának represszálása siRNS transzfekcióval kétféle sejtvonalban	34
4.7 A miR-26b és a SELP mRNS funkcionális kapcsolatának igazolása szeptikus körülmények között	35
4.8 A miRNS expressziók Dicer1 függőségének vizsgálata calpain gátlása révén MEG-01 sejtekben	36
4.9 RNS szekvenálás és a szekvenálási adatok elemzése	36
4.10 Egyéb rutin laboratóriumi vizsgálatok.....	37
4.11 Statisztikai kiértékelés	37

5. Eredmények	38
5.1 A szepszises betegek és kontroll személyek főbb klinikai jellemzői	38
5.2 Elterő thrombocyta miRNS expressziók szepszisben.....	39
5.3 A vérlemezke miR-26b expressziója korrelál a szepszis súlyosságával és a mortalitással.....	40
5.4 Thrombocyta aktivációhoz kötődő RNS expresszió változások <i>in vitro</i> modellezése	41
5.5 Indukált <i>SELP</i> mRNS expresszió a szeptikus thrombocytákban.....	42
5.6 Az NF- κ B-út vonal aktiválódásának vizsgálata LPS hatására MEG-01 sejtekben	44
5.7 Génexpressziós változások analízise LPS-sel kezelt MEG-01 sejtekben.....	45
5.8 Az emelkedett <i>SELP</i> mRNS szinthez hozzájárul a csökkent miR-26b expresszió a MEG-01 sejtekben szepszises körülmények között.....	47
5.9 Szepszisben a csökkent <i>Dicer1</i> fehérjeszint megváltozott miRNS expressziókat okoz a megakaryocytákban és a vérlemezékben	48
5.10. Az LPS-indukálta gének ontológiai elemzése MEG-01 sejtekben	50
5.11 Szepszisben a vérlemezék miR-223 expressziója csökkent, míg a plazmában és a thrombocyta mikropartikulákban jelentősen magasabb.....	52
5.12 A szepszis eredetű mikropartikulák internalizációja az endothelsejtekbe.....	55
5.13 A magas miR-223 tartalmú mikropartikulák képesek csökkenteni az indukált ICAM-1 receptor expressziót a HCAEC sejteken gyulladásos körülmények között .	56
5.14 A mikropartikulák internalizációjának gátlása megakadályozza az endothelsejtek miRNS expressziójának változását.....	58
5.15 A mikropartikulák által megváltoztatott endothelsejt miR-223 expresszió nem az emelkedett <i>Dicer1</i> enzim szint következménye a HCAEC sejtekben	60
5.16 A szepszis eredetű PMP-vel történő kezelés után csökken a leukocyták adhézioja az endothelsejtek felszínéhez.....	61
6. Megbeszélés	63
7. Összefoglalás	73

8. Summary.....	74
9. Az értekezés új tudományos eredményei, a jelölt saját megállapításai	75
10. Irodalomjegyzék és publikációs lista.....	76
10.1 Irodalomjegyzék	76
10.2 Publikációs lista	88
11. Tárgyszavak – keywords	90
12. Köszönetnyilvánítás	91
13. Függelék	92

Rövidítések jegyzéke

Ago2: Argonaute 2

cDNS: komplementer DNS

CRP: C-reaktív protein

DE: Differentially expressed

DGCR8: DiGeorge syndrome Critical/Chromosomal Region 8

DNS: Dezoxiribonukleinsav

dNTP: Deoxynucleotide triphosphate

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

ERK1/2: Extracellular signal-regulated kinase 1/2

FBS: Fetal bovine serum

FITC: Fluorescein isothiocyanate

GO: Gene ontology

HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution

HCAEC: Human coronary artery endothelial cell (humán koronária artériás endothelsejt)

ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1

ICU: Intensive care unit

IL-1 β : Interleukin-1 β

JNK: c-Jun N-terminal kinase

LBP: Lipoprotein binding protein

LDP: Leukocyte-depleted platelet

LPS: lipopoliszacharid

MAPK: mitogen-activated protein kinase

miRNS: mikroRNS

MK: Megakaryocita

MPV: Mean platelet volume (átlagos thrombocyta térfogat)

mRNS: Messenger (hírvivő) RNS

NF- κ B: Nuclear factor-kappa B

P2RY12: P2Y12 receptor gén

PAI-1: Plazminogén aktivátor inhibitor 1

PBMC: peripheral blood mononuclear cell (perifériás vér eredetű mononukleáris sejt)

PBS: Phosphate buffered saline
PCT: Procalcitonin
PE: Phycoerythrin
PMP: Platelet-derived microparticle (thrombocyta-eredetű mikropartikula)
PPP: Platelet poor plasma (thrombocyta-szegény plazma)
PRP: Platelet rich plasma (thrombocyta-dús plazma)
RAN-GTP: Ras-related nuclear protein guanosine triphosphate
RISC: RNA-induced silencing complex
RNáz: ribonukleáz
RNS: ribonukleinsav
RPLP0 (36B4): Ribosomal Protein P0
RT: Room temperature (szobahőmérséklet)
RT-qPCR: valós idejű kvantitatív polimeráz reakció
SELP: P-szelektin gén
siRNS: kis interferáló RNS
SOFA-score: Sequential Organ Failure Assessment score
TF: transzkripció faktor
TLR: Toll-szerű receptor (Toll-like receptor)
TNF- α : Tumor necrosis factor- α
TRAP: thrombin-receptor activating peptide
UPL: Universal ProbeLibrary
UTR: untranslated region
vWF: von Willebrand faktor

1. Bevezetés

A szepszis vagy régies nevén vérmérgezés egy nagyon súlyos klinikai kórkép, amelynek során a fertőzés hatására egy kontrollálatlan szisztémás reakció alakul ki a szervezetben. A szepszistől még súlyosabb állapot a szeptikus sokk, amely további metabolikus és celluláris rendellenességekkel jár együtt. Napjainkban a szeptikus kórképek még mindig nagyon magas (kb. 15-20%-os) mortalitást mutatnak a fejlett diagnosztikai lehetőségek és terápiás beavatkozások ellenére, ezért a korai felismerésnek és a hatékony gyógyszeres beavatkozásnak nagy népegészségügyi jelentősége van. A szepszis kialakulásában az extrém gyulladás, az abnormális immunológiai folyamatok és különböző sejtek aktivációja játszanak döntő szerepet. Ebben az inflammatorikus környezetben gyakran jelentős mértékű vérlemezke- és endothelsejt-aktiváció, illetve károsodás következik be, és mindez rövid időn belül sokszervi elégtelenséghez, illetve a beteg korai halálozásához vezethet.

Az aktiválódott vérlemezkek prothrombotikus állapotának kialakításához nemcsak a kórokozó és a gyulladásos mediátorok által közvetlenül indukált thrombocyta aktiváció járul hozzá, hanem a csontvelőben a megakaryocyták is ki vannak téve ezen stimulusoknak, ami megváltozott fenotípusú és funkciójú vérlemezkek termeléséhez vezet. Mindebben a megakaryocyta-eredetű fehérjéknek, enzimeknek, valamint RNS molekuláknak, köztük a nem kódoló mikroRNS-eknek (miRNS) is nagy szerepe van, melyek képesek befolyásolni a thrombocyták fehérje/receptor expresszióját, így hozzájárulva az „előaktivált” celluláris állapothoz. Ugyanakkor a stimulált vérlemezkek nagy mennyiségben szekretálnak mikropartikulákat a keringésbe, ami a thrombocyta miRNS-ek szállítását is lehetővé teszi a véráramon keresztül. A keringő vérlemezke-mikropartikulák internalizációja révén ezen miRNS-ek többek között az endothelsejtek génexpresszióját és működését is modulálhatják. Ezek a folyamatok tehát hozzájárulhatnak a szepszis miatt bekövetkező túlzott mértékű és akár tartósan fennálló endothelsejt aktiváció visszaszorításában mint kompenzatorikus válaszreakció.

A disszertációban a súlyos gyulladásos környezetben a megakaryocyta-thrombocyta tengelyben bekövetkező számos RNS-expresszió-változások közül a miR-26b-*SELP* interakció mechanizmusát és szerepét, illetve a vérlemezke miR-223-nak az endotheliális ICAM-1 receptor expressziót moduláló hatását vizsgáltuk. Célunk az volt, hogy ezen finomszabályozó folyamatokról minél több információ álljon a

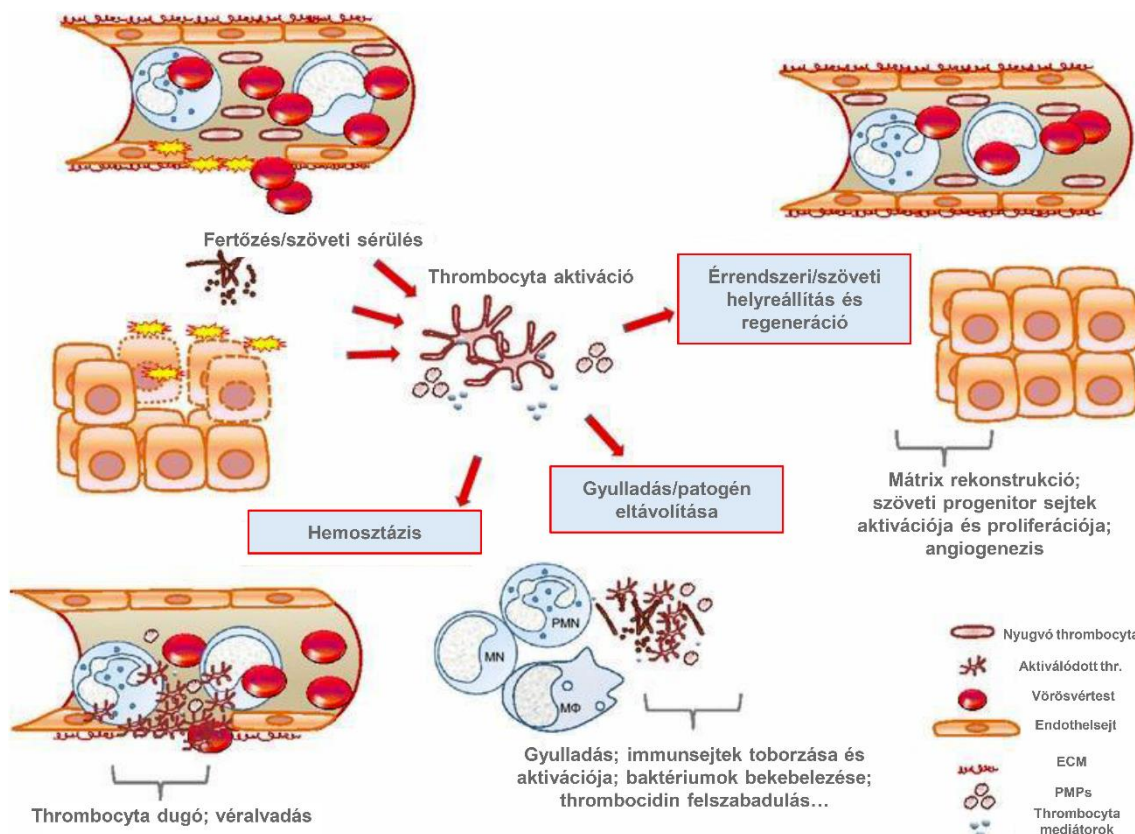
rendelkezésünkre a szepszis komplex kórfolyamatainak jobb megismerése és megértése érdekében.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A vérlemezkék aktiválódása és annak szerepe szepszisben

A szepszis egy életet veszélyeztető klinikai állapot, amely a szervezet fertőzés által kiváltott kontrollálatlan szisztémás válaszreakciója eredményeként alakul ki. A szepszistől megkülönböztetjük a septicus sokkot, amely még súlyosabb metabolikus és celluláris rendellenességekkel jár együtt [1]. A szepszis patofiziológiai alapját a túlzott mértékű gyulladás és az ezzel összefüggő sejtaktivációk, illetve az abnormális immunológiai folyamatok jelentik. Az előbbi eltérés többek között a koagulációs kaskád indukálásához és az ezt kivédő ellenregulációs mechanizmusok, valamint a fibrinolízis gátlásához vezethet, ami súlyos komorbiditásba, ún. disszeminált intravaszkuláris koagulopáthiába (DIC) torkollhat [2]. Ebben a hyperinflammatorikus környezetben óhatatlanul jelentős mértékű endothelsejt károsodás és vérlemezke-aktiváció következik be, amit tovább fokozhat a thrombocyták pathogénnel való interakciója. A szepszishoz gyakran társuló alacsony thrombocytaszám és abnormális vérlemezke-funkció pedig tovább ronthatja a betegség kimenetelét. A fentiek eredményeképpen akár rövid időn belül bekövetkező sokszervi elégtelenség a beteg korai halálozásához vezethet [3].

A thrombocyták aktiválódása központi szerepet játszik a különböző szepszis indukálta celluláris folyamatok párhuzamos lejátékozódásában [4]. A reaktív vérlemezkék ugyanis összehangolják a hemosztatikus, a proinflammatorikus, a pathogén elleni immunológiai és a szöveti helyreállító („repair”) folyamatokat. Maguk az aktivált vérlemezkék és az általuk kibocsátott mediátorok nemcsak a vérzés megelőzésében vesznek részt, hanem direkt, illetve indirekt módon a fertőzés eliminálásában és az immunsejtek funkciójának kialakulásában is, sőt a későbbi fázisban a szöveti „remodeling”-ben. A reaktív vérlemezkékből emellett különböző méretű vezikulák, így pl. mikropartikulák fűződnek le, amelyek többféle thrombocyta funkciót képesek közvetíteni (1. ábra) [4].



1. ábra A thrombocyták aktiválódás központi szerepe a szepszis indukálta celluláris folyamatok párhuzamos lejátszódásában. A reaktív vérlemezkék összehangolják a hemostatikus, a proinflammatorikus, a patogén elleni immunológiai és a szöveti helyreállító („repair”) folyamatokat. Az aktivált vérlemezkék és az általuk kibocsátott mediátorok nemcsak a vérzés mielőbbi elállításában vesznek részt, hanem direkt, illetve indirekt módon a fertőzés eliminálásában és az immunsejtek funkciójának kialakulásában, sőt a későbbi fázisban a szöveti „remodeling”-ben is. Ezen felül a vérlemezke-eredetű mikropartikulák képesek közvetíteni számos thrombocyták funkciót is. ECM: extracelluláris mátrix, MN: monocyták, PMN: polymorphonuclearis neutrophil, MΦ: macrophag, PMP: thrombocyták-eredetű mikropartikula. Forrás: Dewitte A és munkatársainak 2017-es közleményéből adaptálva [4].

Mindezek ellenére a szepszises thrombocyták funkciójára vonatkozóan némileg ellentmondásos adatokat publikáltak. Egyrészt a vérlemezkék fokozott felszíni P-szelektin receptor (CD62P) expressziót mutattak, ami a szolubilis P-szelektin magas plazmaszintjéhez vezetett [5]. Ezen eredmények a thrombocyták emelkedett aktiváltsági állapotát jelezték, amit magas trombospondin szinttel [6], illetve egy thrombocyták funkciós teszttel (VerifyNow assay) emelkedettnak talált thrombocyták reaktivitási index értékkel is alátámasztottak már a betegség korai szakaszában [7]. Ezzel szemben mások hiporeaktív thrombocytákról számoltak be szepszisben csökkent *ex vivo* aggregációs képességgel, ami a vérlemezke aktiváció időbeni „kimerülését” jelezheti [8, 9]. A szepszis első fázisában tehát a vérlemezkék fokozott aktivációs állapota nem kérdéses,

amihez több thrombocyta receptor (pl. CD62P, CD63, CD31 stb.) magasabb expressziója, valamint fokozott felszíni fibrinogén köt(őd)és és emelkedett szolubilis glycoprotein VI (GPVI) szint is társul [10]. A fentiekben említett megváltozott thrombocyta funkciós eredmények hátterében - a betegség különböző fázisában történt mintavétel mellett - eltérő preanalitikai körülmények is állhatnak, pl. még nem kezelt vagy már kezelés alatt álló szepszis betegek bevonása, más kórokból kialakult szeptikus állapot vizsgálata, vagy más mintatípus feldolgozása.

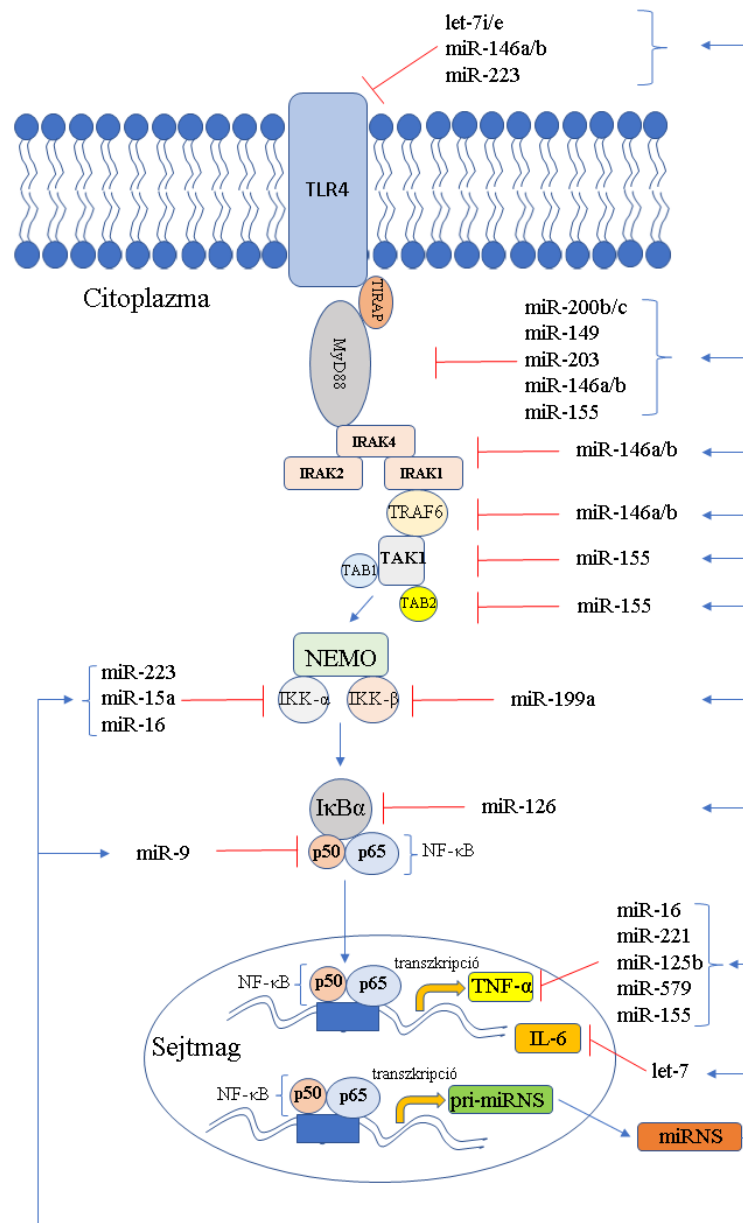
A P-szelektin receptor vagy CD62P a vérlemezke-aktiváció egyik legérzékenyebb specifikus markere, amely a nem aktiválódott keringő vérlemezkéken csak nagyon kis mennyiségben van jelen, ugyanakkor stimuláció hatására percekben belül jelentős mértékben expresszálódik a sejtfelületre és így részt vesz az ún. heterotipikus (pl. thrombocyta-leukocyta) aggregátumok képződésében [11]. A különböző fehérvérsejt alakokkal kialakított sejt-sejt interakciók tovább segítik szepszisben a proinflammatorikus és protrombotikus folyamatok lezajlását [12]. A vérlemezék fokozott P-szelektin expressziója magasabb halálozási kockázattal járt különösen idősebb szeptikus betegek esetén [13], ráadásul a szolubilis P-szelektin emelkedett koncentrációja szoros összefüggést mutatott a szepszishoz társult véralvadási rendellenességek gyakoriságával és a kórkép súlyosságával [14]. A fentiek alapján a vérlemezke P-szelektin expressziójának változása jelentős hatással bír a szeptikus kórfolyamatok lezajlásában.

Szepszisben a kórokozók inváziójára első vonalban a veszélyeztetett immunrendszer sejtjei, így a monocyták/macrophagok, a granulocyták és a természetes ölősejtek (NK-sejtek) reagálnak, de a veszélyeztetett immunrendszer részét képezik a vaszkuláris endothelsejtek is [15]. Ezeknek a sejteknek a felületén ún. mintázatfelismerő receptorok (Toll-szerű receptorok, TLR) expresszálódnak [15]. Ezekhez kötődnek a kórokozók különböző komponensei (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), valamint az elhalt sejtekből felszabaduló molekulák (damage-associated molecular pattern, DAMP) [15], és ezen interakciók a TLR-eken keresztül intracelluláris szignálútvonalak aktiválásához vezetnek [16]. Számos TLR receptor, pl. a TLR4 a vérlemezkéken, sőt azok anyasejtjein, a megakaryocytákon (MK) is expresszálódik és funkcionál is [17]. A vérlemezék TLR4-dependens aktiválódása, az érfalhoz való kitapadása és így a keringésből való kikerülése akár súlyos thrombocytopeniához vezethet, amihez az aktivált vérlemezék neutrophilek általi szekvesztrálódása is

hozzájárul [17]. Egy Gram-pozitív bakteriális fertőzés a TLR2-n keresztül is képes modulálni nemcsak a vérlemezke aktivációt [18], hanem a trombopoézist és a MK-érest is [19]. Ezen adatok is azt igazolják, hogy a vérlemezkék és az MK-k is aktívan részt vesznek a szepszishez társuló gyulladásos folyamatok kialakításában és annak következményeiben [20, 21].

2.2 Az NF- κ B-út vonal aktiválódása szepszisben a TLR4 receptoron keresztül

A TLR-eken keresztül bekövetkező sejtstimuláció hatására aktiválódik többek között az NF- κ B (nukleáris faktor kappa B) mediálta szignálút vonal, ami a szeptikus állapot kialakulása során proinflammatorikus citokinek termelődését indukálja a monocytákban/macrophágokban [22]. A TLR-eknek eddig tíz különböző típusát azonosították az emberi szervezetben (TLR1-TLR10). Ezek a receptorok különféle agonisták hatására aktiválódnak, pl. a TLR2-t a Gram-pozitív baktériumokból származó peptidoglikán aktiválja. A receptorok celluláris elhelyezkedése is eltérő: a TLR2 és a TLR4 a sejtfelszínen, míg a nukleotid molekulákat felismerő TLR3, TLR7, TLR8 és TLR9 intracelluláris vezikulák membránjában helyezkednek el [23]. A szeptikus folyamatokban központi szerepet játszó TLR4 a Gram-negatív baktériumok sejtfalának lipopoliszacharid (LPS) komponensét ismeri fel. Az agonista bekötődése után a TLR4 intracelluláris részéhez kapcsolódik a MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88) fehérje (2. ábra). Ezt követően a MyD88 olyan IL-1R-asszociált kinázokat „toboroz” (IRAK4, IRAK1 és IRAK2), amelyek aktiválják és ubiquitinálják a TRAF6-ot (TNFR-hez társult 6-os faktor). A TAB2 (TAK1-kötő fehérje 2) következményes ubiquitinációja miatt a TAK1 aktiválódik. Ezek az események az NF- κ B kináz komplex inhibitorainak az aktivációjához vezet, ami magában foglalja az IKK- α -t, IKK- β -t és az NF- κ B esszenciális modulátort (NEMO vagy IKK- γ), amely foszforilálja az IKB α -t. Mindez végül felszabadítja a p50 és p65 alegységeket tartalmazó transzkripciós faktort a sejtmagba történő transzlokációhoz. Ez lehetővé teszi a gyulladást promótáló fehérjék génjeinek, például az *IL6* és a *TNF* átírását [24]. Fontos hozzátenni, hogy az NF- κ B-út vonal aktiválódása modulálja számos gyulladásfüggő proteint szabályozó mikroRNS (miRNS) szintjét is, illetve a megváltozott expressziójú miRNS-ek finomszabályozzák az NF- κ B-út vonalban résztvevő különböző fehérjék/enzimek kifejeződését és működését. A 2. ábra a vérlemezkékben és az MK-ban is működő TLR4 mediálta NF- κ B-út vonal [21] legfontosabb jelátviteli eseményeit mutatja be.

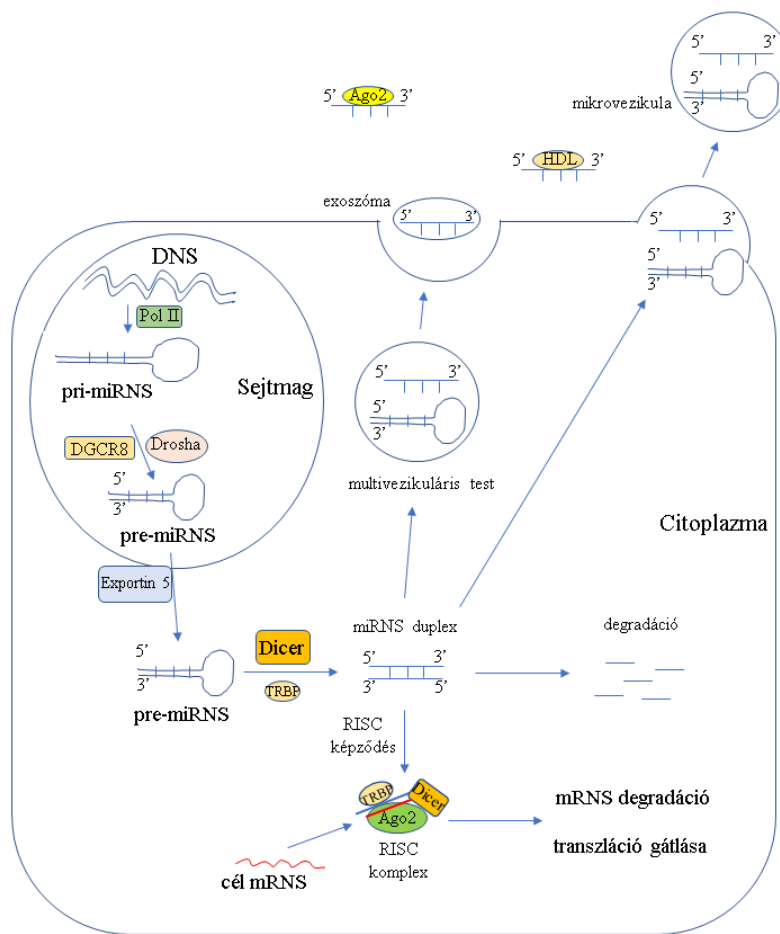


2. ábra A TLR4 indukálta NF-κB jelátviteli útvonal fő komponensei. Az LPS-nek a TLR4 receptorhoz való bekötődése egy komplex intracelluláris szignálútvonalt indít el, melynek eredményeképpen a p50 és p65 alegységek belépnek a sejtmagba és iniciálják a proinflammatorikus gének expresszáldását. Az ábrán feltüntetett intracelluláris miRNS-ek expressziója szintén megváltozik, ami finomhangolja a kaszkád útvonal fehérjéinek kifejeződését. Rövidítések: a MyD88: myeloid differentiation primary response protein 88, IRAK: IL-1R-asszociált kináz, TRAF6: TNFR-hez társult 6-os faktor, TAB2: TAK1-kötő fehérje 2, IKK: NF-κB kináz inhibitor, NEMO: NF-κB esszenciális modulátor. Forrás: Szilágyi B és munkatársai által írt 2019-es összefoglaló közleményéből adaptálva [25].

2.3 A miRNS-ek biológiai jelentősége, keletkezése és működése

A miRNS-ek erősen konzervált, kb. 20-25 nukleotid hosszúságú, egyszálú nem kódoló RNS molekulák, melyek fontos szerepet játszanak a sejtek megfelelő működéséhez szükséges gének működésének szabályozásában [26]. A miRNS-eken keresztül megvalósuló génszabályozás egy komplex folyamat, mivel egy miRNS akár több tucat cél messenger vagy hírvivő RNS (mRNS) működését befolyásolhatja, másrészt egy mRNS-t akár több miRNS is szabályozhat. A miRNS-ek az emberi fehérjéket kódoló gének kb. 60 %-át regulálják a cél mRNS és fehérje szintek csökkentése révén [27] és részt vesznek olyan alapvető celluláris folyamatokban, mint sejtproliferáció, differenciálódás, illetve apoptózis, de befolyásolják az összejtképződést és az izomsejt-differenciáció folyamatát is [28]. A miRNS-ek abnormális expressziója és funkciója döntő szerepet játszik számos betegség, pl. metabolikus, kardiovaszkuláris és daganatos betegségek kialakulásában és progressziójában [29, 30].

A miRNS-ek biogenezeise során első lépésben az elsődleges (primer) miRNS-ek (pri-miRNS) kerülnek átírásra az RNS-polimeráz II aktivitása révén a sejtmagban (3. ábra) [31]. Ezt követően a pri-miRNS-ekből az RNáz III-as típusú Drosha endonukleáz aktivitásának köszönhetően 70 bp-os hajtúszerkezetű miRNS-prekurzor (pre-miRNS-ek) alakul ki [32]. Ezt a reakciót a DGCR8 (DiGeorge syndrome critical/chromosomal region 8) komplex katalizálja. A pre-miRNS-ek a Ran-GTP-függő Exportin-5 transzporter fehérjéhez kötődnek, amelynek segítségével a pre-miRNS-ek a sejtmagból a citoplazmába kerülnek. Itt zajlik a miRNS-ek második érési folyamata. Az III-as típusú RNáz Dicer1 endonukleáz enzim a TRBP (transactivation-responsive RNA-binding protein) kofaktor jelenlétében lehasítja a hajtúszerkezetet [33]. Ennek a lépésnek az eredményeként érett miRNS duplexek jönnek létre, amelyek kb. 22 nukleotid hosszúságúak. Ezek közül a vezető szál beépül az ún. RISC (RNA-induced silencing complex) komplexbe, melyet a TRBP, a Dicer1 enzim és az Ago2 (Argonaute 2) fehérje alkot, míg a másik (követő) miRNS szál lebomlik (3. ábra) [34].



3. ábra A miRNS-ek érési folyamatának főbb lépései. A pri-miRNS-ek a sejtmagban képződnek, majd egy több lépésből álló érési folyamaton mennek keresztül. A citoplazmában a Dicer1 enzim lehasítja a pre-miRNS-ekre jellemző hajtúszerkezetet, majd ezt követően az érett miRNS beépül a RISC komplexbe. Az érett miRNS a cél mRNS 3' UTR régiójához kötődik, aminek eredményeként az mRNS által kódolt fehérje kifejeződése gátlódik vagy időben késik, illetve az mRNS degradálódik. Az érett miRNS-ek később exoszómákba, mikrovezikulákba, vagy szabad (HDL-hez vagy Ago2 fehérjéhez kötötten) formában kikerülhet a sejtből. Rövidítések: pre-miRNS: prekursor-miRNS, pri-miRNS: primer-miRNS, RISC: RNA-induced silencing complex, TRBP: transactivation-responsive RNA-binding protein, UTR: untranslated region, DGCR8: DiGeorge syndrome critical/chromosomal region 8, HDL: high density lipoprotein. Forrás: Szilágyi B és munkatársai által írt 2019-es összefoglaló közleményéből adaptálva [25].

A miRNS-ek a génexpresszióra kifejtett gátló hatásukat oly módon fejtik ki, hogy bázispárosodással a cél mRNS-hez kötődnek. Az érett miRNS-ek többségében a 2-8. nukleotid közötti szekvencia az ún. „seed” régió, amely a cél mRNS 3' UTR (untranslated region) részéhez kötődik [30]. A génexpresszió szabályozása ezt követően többféle módon történhet. A cél mRNS sorsa a seed régió kívüli komplementaritástól és a RISC komplexben található Ago2 fehérje aktivitásától függ [35, 36]. Amennyiben a miRNS és a cél mRNS közötti bázispárosodás tökéletesen komplementer és a miRISC komplex

tartalmazza az endonukleáz aktivitással bíró Ago2-t, az mRNS szekvenciafüggően hasítódik úgy, mint pl. a növényekben [37]. Ezzel szemben a nem tökéletes komplementaritás, ahogy általában az állatvilágban és az emberben is jelen van, a transláció gátlásához vagy a cél mRNS Ago2-függő degradációjához vezet [38].

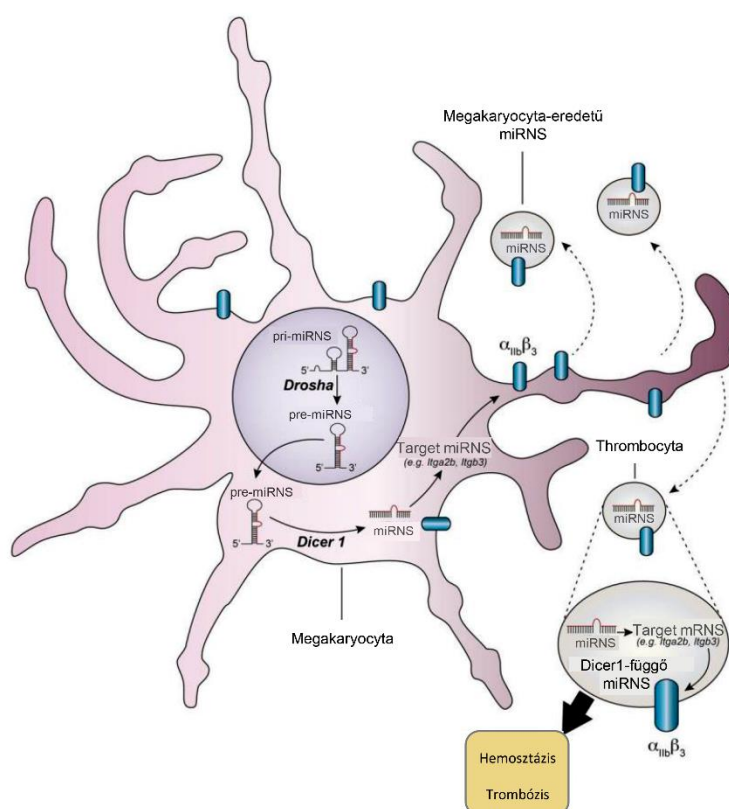
2.4 Az extracelluláris miRNS-ek funkciója

A miRNS-ek jelenlétét számos testnedvben azonosították, mint például szérumban, plazmában, vizeletben, liquorban, nyálban, könnyben, anyatejben és a magzatvízben. Kimutatták, hogy egyes miRNS-ek funkcionális szerepet játszanak a környező szövetekben lévő sejtek működésének befolyásolásában, valamint a testfolyadékokban keringő miRNS-ek alkalmas biomarkereknek bizonyultak különféle betegségek, így a szepszis diagnosztizálására és monitorozására [39, 40]. A miRNS-ek többféleképpen is kijuthatnak az anyasejtekből a környezetükbe és stabilak maradnak a keringésben [41]. Rendkívül ellenállóak az endogén és exogén RNáz aktivitással, valamint a megváltozott pH és hőmérsékleti viszonyokkal szemben [42]. A különböző sejttípusokból aktív transzport révén exoszómákba és apoptotikus testekbe, a vérlemezkék esetén főként mikropartikulákba csomagolódva szállítódnak [43]. A miRNS-ek egyik sejtől a másikba történő szállítása történhet RNS-kötő fehérjékhez, pl. Ago2-höz vagy HDL-hez (high density lipoprotein) kötötten is (3. ábra). Ezen transzportmechanizmusok révén a miRNS-ek eljuthatnak és bekerülhetnek a környező vagy akár távoli sejtekbe és megváltoztathatják azok működését [41, 43].

2.5 A vérlemezke miRNS-ek jelentősége

A keringő vérlemezkék – bár sejtmaggal nem rendelkeznek – mégis nagyszámban hordoznak miRNS-t, mRNS-t, továbbá a miRNS-ek érésében szerepet játszó fehérjéket (pl. Dicer1), illetve a fehérjetranszlációhoz nélkülözhetetlen egyéb komponenseket (pl. riboszómák, enzimek), amelyek az MK-ból kerülnek a képződő vérlemezkékbe a csontvelőben (4. ábra) [44, 45]. Landry P és munkatársai 2009-ben számoltak be először a thrombocyta miRNS-ek létezéséről, és a miR-223-at írták le az egyik legmagasabb expressziós szintet mutató vérlemezke miRNS-nek [44-48]. Mára több, mint 500 miRNS-t azonosítottak a vérlemezkékben, melyek közül a let-7 család adja a teljes miRNS állomány kb. felét [49]. Annak ellenére, hogy a vérlemezkék lényegesen kevesebb miRNS-t tartalmaznak a maggal rendelkező sejtekhez képest [50], meglehetősen

változatos a miRNS összetételük, ez az összes humán miRNS körülbelül 30%-át teszi ki [51]. Azóta a miR-223 az egyik legszélesebb körben vizsgált miRNS-é vált, mivel megváltozott szintje - sok más között - hozzájárul a szív- és érrendszeri betegségekben az endothelium-diszfunkció [52] és az endothelsejt apoptózis kialakulásához is [53]. Predikciós programok (pl. www.targetscan.org) szerint a szekvencia komplementaritás alapján a miR-223 egyik célgénje az *ICAM1*, ezáltal képes modulálni az endothelsejtek ICAM-1 receptor expresszióját *in vitro* [54, 55].



4. ábra Az RNS molekulák és más, a translációhoz szükséges fehérjék bejutása az MK-ból a vérlemezkékbe. Nemcsak az MK-k, de a vérlemezkék is tartalmaznak miRNS-t, azok prekurzorait, mRNS-t, és olyan sejtalkotókat (pl. riboszóma), fehérjéket (pl. Ago2) és enzimeket (pl. Dicer1), amelyek lehetővé teszik akár a *de novo* fehérjeszintézist bizonyos stimulusok hatására. Ezek a komponensek a thrombocytákba az MK-ból való lefűződés során kerülnek át. A Dicer1 enzim jelenlétében a pre-miRNS-ek érése is bekövetkezik az Ago2 fehérjéhez kapcsolódva a RISC komplexen belül. Rövidítések: miRNA: microRNA, mRNA: messenger RNA, pre-miRNA: prekurzor miRNA, pri-miRNA: primer miRNA. Forrás: Boilard E és munkatársának 2016-as közleményéből adaptálva [56].

A vérlemezkékben jelenlévő mRNS-ek és a fehérjetranszlációhoz nélkülözhetetlen riboszómák és enzimek lehetővé teszik a saját fehérjék *de novo* szintézisét is, amit általában valamilyen stimulus vált ki [45, 57]. Az érett intracelluláris

miRNS-ek képesek szabályozni a thrombocyták saját cél mRNS-einek funkcióját, így akár a hemosztázis és a vérlemezke aktiváció szempontjából fontos fehérjék szintetizálódhatnak [58, 59]. A vérlemezkéket ért direkt stimulusok, pl. thrombinaktiváció [59], vagy a kóros metabolikus milieu úgy, mint hyperglycemia diabetes mellitusban a miRNS-ek megváltozott expressziójához vezet [60], és ezek a miRNS szintek jól korrelálnak a vérlemezke reaktivitásával [46]. Hasonlóan a vérlemezkékhöz, az MK-k működését is modulálják a miRNS-ek, így a miR-15a-5p a GPVI-mediálta szignálút vonal befolyásolásán keresztül kihat az α IIb β 3 integrin aktivációra és az α -granulum szekrécióra [61]. Ezzel párhuzamosan a miR-126-3p-ről igazolódott MK kísérletekben, hogy regulálja a disintegrin és metalloproteinase-9 (ADAM9) felszíni receptor és az aktin regulációban résztvevő Plexin B2 fehérje expresszióját [62]. Mindezen eredményekből az következik, hogy a thrombocytákban és az MK-kban a miRNS, a cél mRNS és az általuk szabályzott fehérje expressziója nem állandó, hanem a sejtek fenotípusának megfelelően dinamikusan változik [45, 60, 63]. Arról azonban még kevés adat áll rendelkezésre, hogy a „MK-vérlemezke-tengely” miRNS profilja milyen mértékben változik meg szepszisben, és ennek eredményeként mely további cél mRNS-ek/fehérjék szintje modulálódik, ami a vérlemezke funkció eltérését okozza. Korábban csak egy közlemény született, mely szepszisben vizsgálta a miRNS expressziókat: az analízis exoszómákban, a szérumban és a vér különböző alakos elemeiben együttesen történt [64]. Mivel a fehérvérsejtek és a thrombocyták nagyon eltérő miRNS repertoárral rendelkeznek [49], további vizsgálatok váltak szükségessé, hogy „tisztított” vérlemezke mintákban is megtörténjen a miRNS-ek analízise szepszisben.

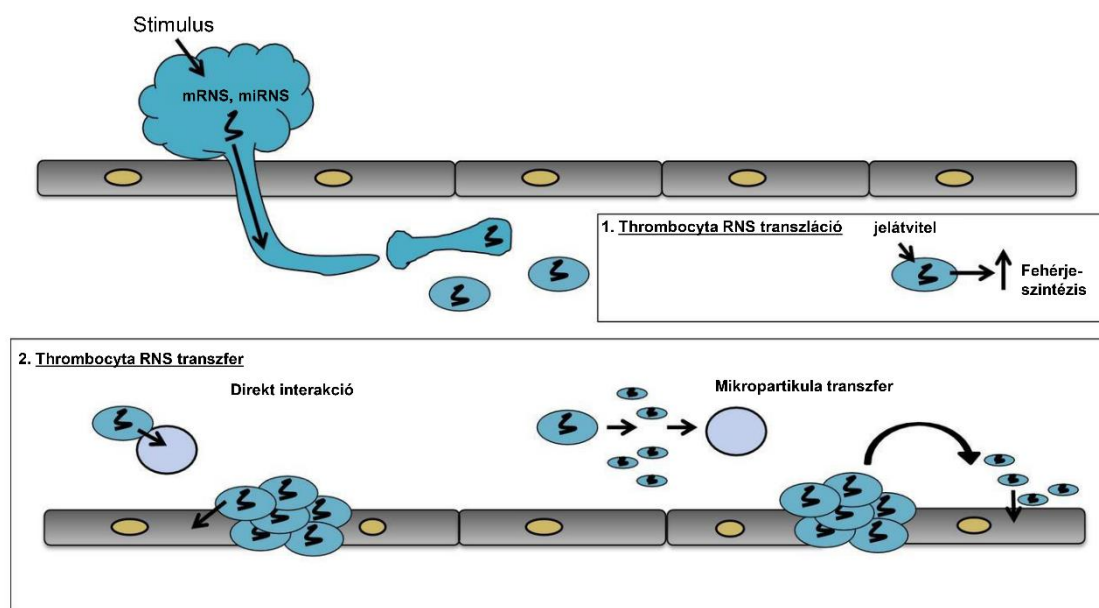
2.6 A vérlemezke-fehérjék expressziójának indukált változásai

Egy viszonylag régi felismerés, hogy a thrombocyták *in vitro* thrombin aktiváció hatására képesek plazminogén aktivátor inhibitor 1-et (PAI-1) termelni [65]. Ennek az intracelluláris mechanizmusát igazolták mások jó néhány évvel később, amikor kimutatták, hogy a gátló hatású Ago2 fehérje leválva a SERPINE1 mRNS-ről lehetőséget teremt arra, hogy a PAI-1 protein expresszálódjon a thrombocytákban [66]. Diabetes mellitusban a P2Y₁₂ ADP-receptor expresszióját találták négyszer magasabbnak, mint az egészséges személyekben, amit emelkedett P2RY₁₂ mRNS és magasabb receptor fehérje szinttel magyaráztak hozzájárulva a fokozott vélemezke aktivációs állapothoz

[67]. Korábbi szepszist modellező *in vitro* vizsgálatokban az IL1B (interleukin-1 β , IL-1 β) és az F3 (szöveti faktor) mRNS expressziója jelentősen megemelkedett a vérlemezkékben, és igazolt transzlációjuk révén nagyobb mennyiségben voltak kimutathatók a TLR4 agonista LPS hatására [68, 69]. Azóta *in vivo* kísérletek alapján mind a humán, mind az egér vérlemezkék transzkripció és transzláció folyamatait a szepszis képes jelentősen felülírni, ami az α IIb thrombocyta fehérje *de novo* szintézisét eredményezte az α IIb β 3 integrin aktivációjával [70]. Tekintettel arra, hogy számos további fontos fehérje/receptor funkcionális a vérlemezkékben, újabb vizsgálatok szükségesek az expressziójukat reguláló folyamatok tisztázására.

2.7 Thrombocyta eredetű mikropartikulák szepszisben

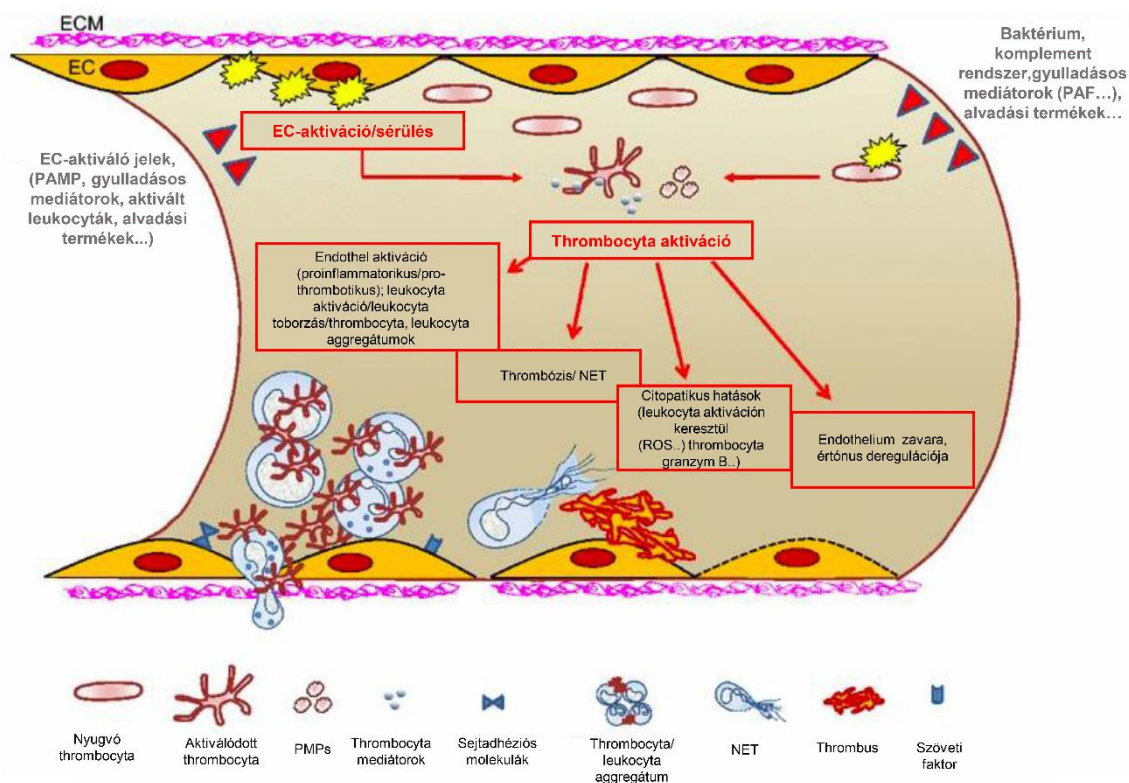
A vérlemezkék felszínéről - aktiválódásuk hatására - eltérő méretű vezikulák, így kisméretű exoszómák (< 100 nm átmérő), valamint nagyobb méretű mikropartikulák (PMP) és apoptotikus testek (100 nm -1000 nm) válnak le [71, 72]. Érdekesség, hogy a szekretált mikrovezikulák mennyisége és tartalma nagyban függ a thrombocytát ért stimulus milyenségétől. Egy tanulmányban míg a thrombin váltotta ki a legtöbb mikropartikula termelődését, addig az LPS jóval gyengébb agonistának mutatkozott ilyen tekintetben, és közben eltérő fehérjeösszetételű mikropartikula populációk is keletkeztek a két stimulációt követően [73]. Ezek a „sejtdarabkák” számos MK-eredetű citoplazmatikus fehérjén, illetve a membránra még nem expresszáldott receptoron túl funkcionális miRNS-eket is hordoznak. Egyfajta vektorként szerepet játszhatnak a sejtek közötti kommunikációban, akár egy másik sejt mRNS funkciójának a szabályozásában (5. ábra) [43, 74, 75], továbbá különböző betegségek, így kardiovaszkuláris és septicus kórképek kialakulásában [64, 76]. Ezért a mikropartikula miRNS-ek - parakrin hatásuk miatt - fontos terápiás célpontokká válhatnak, ugyanakkor újfajta diagnosztikai markerek is lehetnek a szív- és érrendszeri, valamint rosszindulatú betegségek felismerésében [43].



5. ábra A vérlemezke RNS-ek reguláló szerepe a vaszkulátúrában. 1) Az RNS-ről történő szignál-dependens transzláció lehetővé teszi a thrombocyta funkció módosulását és egyben elősegíti a vérlemezkek diverzitását. 2) A vérlemezkekben szállított RNS molekulák közvetlen „transzfekció” révén vagy mikropartikulákba csomagolva képesek bejutni a vaszkuláris sejtekbe és befolyásolni azok fehérje expresszióját és homeosztázisát. Forrás: Clancy L és munkatársa 2015-ös közleményéből adaptálva [74].

2.8 Az endothelsejt aktiváció szerepe szeptikus körülmények között

Szepszisben az aktiválódott vérlemezkek számos olyan gyulladásos mediátort és citokint bocsátanak ki a környezetükbe, melyek elsősorban az endothelsejtekre és a fehérvérsejtekre vannak hatással [4]. Az endothelsejtek aktiválódásuk során morfológiai változáson mennek keresztül, melynek során von Willebrand faktort (vWF) és különböző sejtadhéziós molekulákat expresszálnak a felszínükön, pl. intercelluláris adhéziós molekula-1-et (ICAM-1) vagy E-szelektint [4, 77]. Mindez elősegíti a reaktív thrombocyták kitapadását a gyulladt érfalhoz megzavarva a vaszkuláris integritást. A vérlemezkek mellett aktivált fehérvérsejtek is interakcióba lépnek a károsodott endotheliummal [4]. Az aktiválódott leukocyták neutrophil extracelluláris hálók (NET) kialakulásához, és a reaktív oxigéngyökök (ROS) képződéséhez vezet, amely tovább ronthatja a mikrovaszkulúra barrier funkcióját (6. ábra).



6. ábra A mikrovaskulátúra a vérlemezke aktiváció egyik kritikus célpontja szepszisben.

A thrombocyták közel kerülve az érfalhoz érzékelik az endothelium eltéréseit. Számos celluláris és szolubilis mediátor aktiválja az endothelsejteket, melyek fő induktori további vérlemezke aktivációnak az infekció, a kialakult gyulladás és az alvadásaktiváció mellett. A kontrollálatlan vérlemezke aktiváció hozzájárulhat az endothelium barrier károsodásához, ami az érintett szövet/szerv elégtelenségéhez vezethet. ROS: reactive oxygen species, EC: endothelial cells, NET: neutrophils extracellular traps, PMPs: platelet microparticles, ECM: extracellular matrix. (Forrás: Dewitte A és munkatársainak 2017-es közleményéből adaptálva. [4])

A fehérvérsejtek kitapadásában, lassú „rolling” mechanizmusában az ICAM-1/LFA1 (leukocyte function-associated antigen 1) receptorkötődésnek van fontos szerepe [78]. Az ICAM-1 továbbá részt vesz a leukocyták transzcelluláris diapedesisében is. Súlyos gyulladásban az ICAM-1 receptor nagy mértékben expresszálódik az endothelsejtek felszínén az aktivált thrombocyták jelenlétében egy IL-1-függő mechanizmus révén [79], ugyanakkor proteolitikus hasításra szolubilizálódik [78]. A keringő ICAM-1 magas koncentrációja a szepszis megbízható biomarkereként használható, amely jól korrelál a betegség progressziójával és a klinikai kimenetellel [80, 81].

Az ICAM-1 receptor expresszióját több miRNS is közvetlenül szabályozza. Gidlöf O és munkatársai azt elemezték, hogy myocardialis infarktust követően a

vérlemezkék aktiválódásuk miatt miRNS-eket veszítenek, melyek exoszómákba csomagolva jutnak el az endothelsejtekhez. Ezek közül az egyik a miR-320b, mely jelentős parakrin hatást gyakorolva csökkenti az ICAM-1 expresszió mértékét [82]. A receptor miR-223 általi finomszabályozásával eddig két tanulmány foglalkozott [54, 55], de nem vizsgálták annak körülményeit szeptikus viszonyok között. Mivel a miR-223 az egyik legmagasabb expressziót mutató thrombocyta miRNS [49] és a PMP-kben is nagy mennyiségben jelen van [43], ezért felmerül a kérdés, hogy vajon a vérlemezke-eredetű miR-223 a mikropartikulákon keresztül képes-e befolyásolni az endothelsejtek ICAM-1 expresszióját szepszisben. Ez a folyamat annak a miRNS-ek által kifejtett ellenregulációs mechanizmusnak lenne a része, amikor a szervezet a túlzott gyulladással és szövethárosodással járó elváltozásokat próbálja fékezni és megakadályozni a további destrukciót [75]. Hasonlót figyeltek meg myocardialis ischaemia-reperfúziós (I/R) károsodást követően, amikor a miR-141 jelentősen csökkentette az ICAM-1 expresszióját a sérült endothéliumon [83].

3. Célkitűzések

A kísérletes munkánk célja a megakaryocita-thrombocyta eredetű miRNS-ek vizsgálata volt szeptikus körülmények között annak érdekében, hogy jobban megismerhessük a megváltozott miRNS expressziók kialakulását és hatását a különböző sejtaktivációval járó kórképben.

3.1 Megakaryocita-thrombocyta eredetű miRNS-ek vizsgálata szepszisben:

- Célunk volt szeptikus betegek vérlemezkéiben a miRNS-profil analízise összehasonlítva egészséges kontrollok mintáival.
- Vizsgáltuk a miR-26b és a *SELP* (P-szelektin) mRNS funkcionális kapcsolatát szeptikus körülmények között specifikus mimic segítségével.
- Értékeltek, hogy a thrombocyta miR-26b expresszió változása milyen összefüggést mutat a betegség súlyosságával és a szepszis okozta halálozással.
- A szeptikus körülményeket MEG-01 sejttenyészetekben *in vitro* modelleztük LPS és TNF- α kezelés alkalmazásával és RNS szekvenálással analizáltuk a génexpressziók változásait.
- Vizsgáltuk a Dicer1 enzim expressziójának változását a szeptikus vérlemezkékben és az LPS-stimulált MEG-01 sejtekben.

3.2 Vérlemezke mikropartikulákon keresztüli miRNS transzfer szerepének vizsgálata az endothelsejt aktiváció szabályozásában:

- Célunk volt szeptikus betegekből izolált vérlemezkék, thrombocyta-eredetű mikropartikulák és plazma minták miR-223-expressziójának kvantálása és annak összehasonlítása kontroll személyek mintáival.
- *In vitro* sejtkultúra felhasználásával vizsgáltuk a szepszises mintákból kinyert vérlemezke-eredetű mikropartikulák internalizációját az endothelsejtekbe.
- Analizáltuk, hogy a mikropartikulákból az endothelsejtekbe jutott miR-223 hogyan befolyásolta az ICAM-1 expressziót és a leukocyta adhéziót.

4. Anyagok és módszerek

A PhD értekezés alapjául szolgáló 2 eredeti tudományos közleményben számos metodikát alkalmaztunk az *in vitro* kísérletek elvégzése érdekében.

4.1 Betegek és kontrollok

A kutatómunkánk során szeptikus betegektől Na₃-citrátot (0,105 M) tartalmazó Vacutainer[®] mintavételi csövekbe (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) vett vérmintákat, illetve szérum mintákat gyűjtöttük össze a Debreceni Egyetem Klinikai Központ három klinikájának (Belgyógyászati Intézet, Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Klinika és Tüdőklinika) intenzív osztályairól. Az első vizsgálatba 21 szeptikus beteget (16 férfi, 5 nő, életkoruk: medián [IQR] 64 [51–70] év) (3. táblázat), míg a második vizsgálatba 13 szepszises személyt (10 férfi, 3 nő, életkoruk: medián [IQR] 57 [42–81] év) válogattunk be (4. táblázat). A szepszis és szeptikus sokk diagnózisa az American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus kritériumai alapján történt [84], mely szerint a szisztémás fertőzés bizonyított és az alábbiak közül még két körülmény teljesül:

- testhőmérséklet > 38°C vagy < 36°C,
- szívfrekvencia > 90/perc,
- légzési ráta > 20 belégzés/perc vagy PaCO₂ < 32 Hgmm,
- fehérvérsejtszám > 12.000/mm³ vagy < 4000/mm³ vagy > 10 % éretlen neutrofil a vérképben.

A mintavétel a betegek intenzív osztályra való bekerülésüktől, illetve a szepszis diagnózis felállításától számított 24 órán belül történt. A résztvevő klinikus kollégák felé az volt a kérésünk, hogy azelőtt kapjunk a bevont betegektől extra vizsgálati mintákat, mielőtt a kombinált szepszis-elleni gyógyszeres kezelés megkezdődött volna, hogy a gyulladáscsökkentő, antimikrobiális, antikoaguláns, esetenként a thrombocyta funkciógátló kezelés és egyéb beavatkozások érdemben ne tudják befolyásolni az abnormális thrombocyta funkciót, és ezen keresztül az RNS expressziót.

A klinikai SOFA-score (Sequential organ failure assessment) pontértékét a klinikusok határozták meg, a thrombocyta funkciót befolyásoló gyógyszeres kezelést és a 28-napos mortalitási adatokat a kezelőorvosok dokumentálták. A betegek beválogatásában segítséget nyújtott Dr. Nagy György, Dr. Kerekes György, Dr. Halmi

Sándor és Dr. Griger Zoltán (Belgyógyászati Intézet), Dr. Berhész Mariann (Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Klinika), és Dr. Szűcs Ildikó (Tüdőklinika).

Ezzel párhuzamosan az első tanulmányba 21 korban és nemben illesztett egészséges kontroll személyt (14 férfi, 7 nő, életkoruk: 58 [42–65] év) (3. táblázat), míg a második vizsgálatba 13 kontroll személyt (8 férfi, 5 nő, életkoruk: 54 [43–60] év) vontunk be (4. táblázat), akik a Debreceni Egyetem dolgozói voltak. Az egyének beválogatásánál kizárási kritérium közé tartozott a rosszindulatú daganat, az autoimmun betegség, a terhesség, a súlyos thrombocytopenia, és akut myocardialis infarktus vagy akut ischaemiás stroke bekövetkezése 1 hónapon belül.

4.2 Mintavétel és mintafeldolgozás

4.2.1 Leukocyta-depletált thrombocyta minták előkészítése

A leukocyta-depletált thrombocyta (LDP) mintákat anti-CD45 antitesttel konjugált mágneses mikrogönggyökkel (Dynabeads, Invitrogen, Oslo, Norvégia) tisztítottuk a mintavételtől számított 30 percen belül. A vérmintákat először centrifugáltuk (170 g, 15 perc, szobahőmérséklet) és thrombocyta-dús plazmát (PRP) kaptunk. Ezt követően 2 mL PRP-t a mágneses gönggyökkel 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A mintákat 2×2 percre mágneses szeparátorba (Becton Dickinson) helyeztük, majd az LDP-t egy új csőben tovább centrifugáltuk (1500 g, 15 perc, szobahőmérséklet). A vérlemezke pelletet 750 µL TRI reagenssel (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) lizáltuk és -20°C-on tároltuk az RNS izolálása előtt.

4.2.2 Thrombocyták aktiválása szepszist mimikáló in vitro körülmények között

Egészséges egyének (n=5) mintájából készített LDP mintákat LPS-sel (O55:B5, 100 ng/mL, Sigma-Aldrich), LBP-vel (lipoprotein binding protein) (100 ng/mL, Sigma-Aldrich) és szolubilis CD14-gyel (150 ng/mL, Sigma-Aldrich) együtt, vagy PBS-sel (negatív kontroll) kezeltük 4 órán keresztül 37°C-on. Pozitív kontrollként TNF- α -val (Tumor nekrosis-faktor- α) (100 ng/mL, Gibco, Grand Island, NY, USA) stimulált mintákat használtunk. A vérlemezkéket ezután centrifugáltuk (1500 g, 15 perc, szobahőmérséklet), és a vérlemezke pellet-et 750 µL TRI reagenssel lizáltuk és az össz RNS izolálása előtt -20°C-on tároltuk. Az izolálás után az RNS koncentrációk egységesen

20 ng/ μ L-re lettek beállítva. Azért, hogy igazoljuk a vérlemezék TLR4-mediálta útvonalon keresztüli aktivációját, IL1B mRNS szintet kvantáltunk párhuzamosan a SELP mRNS-sel valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR) módszerrel.

4.2.3 Thrombocyták in vitro aktiválása mikropartikula termelődé generálása céljából

Egészséges egyének (n=6) mintájából készített LDP mintákat TRAP-pal (thrombin receptor activating peptide) (40 μ M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kezeltük 2 órán keresztül 37°C-on. A vérlemezéket ezután centrifugáltuk (1500 g, 15 perc, szobahőmérséklet), és a vérlemezke pellet-et 1 mL, míg a 250 μ L thrombocyta felülúszót 750 μ L TRI reagenssel lizáltuk és az össz RNS izolálása előtt -20°C-on tároltuk. A mintákból RT-qPCR méréssel a miR-223 szintet vizsgáltuk, hogy a TRAP aktiváció hogyan befolyásolta a vérlemezék és a belőlük termelődött mikropartikulák miRNS tartalmát.

4.2.4 Vérlemezke-eredetű mikropartikulák izolálása

A PRP felső részét egy másik csőbe pipettáztuk – közben fokozottan ügyelve a leukocyta kontaminációra – és tovább centrifugáltuk (1500 g, 15 perc, szobahőmérséklet), hogy thrombocyta-szegény plazmát (PPP) kapjunk. A PPP-t még tovább centrifugáltuk (13,000 g, 2 perc, szobahőmérséklet), hogy megszabaduljunk a vérlemezkékből származó törmelékektől. Ezt követően a mikropartikulákat két centrifugálási lépéssel (16,100 g, 45 perc, szobahőmérséklet) nyertük ki. A centrifugálások között a mikropartikula pellet-et PBS-sel (phosphate buffered saline) mostuk. A thrombocyta mikropartikulák mennyiségét áramlási citometriával határoztuk meg a későbbiekben leírtak szerint.

4.2.5 Thrombocyták aktivációs állapotának vizsgálata és a mikropartikulák kvantálása áramlási citometriával

Az áramlási citometria vizsgálatokat egy korábbi közleményünkben leírt protokoll alapján végeztük el [85]. A vérlemezék aktiválódását a felszíni P-szelektin (CD62P) expressziójának mértékén keresztül vizsgáltuk áramlási citometriával. A vizsgálat során 40 μ L teljes vért fixáltunk 1 mL 1% -os PFA-ban (paraformaldehyde) 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A vérlemezéket fluorescein isothiocyanate (FITC)-konjugált anti-CD42a antitesttel azonosítottuk (Becton Dickinson). A thrombocyta

aktiváció hatására expresszáldó felszíni P-szelektin jelölésére pedig phycoerythrin (PE) konjugált anti-CD62 (Becton Dickinson) antitestet használtunk. Izotípus kontrollként PE konjugált IgG₁ antitestet (Becton Dickinson) alkalmaztunk. A vérlemezkéket 20 percig jelöltük szobahőmérsékleten. A mérést FC-500 áramlási citométeren (Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA) végeztük. Az eredmények analizálásakor a thrombocyta aktiváció mértékét a dupla pozitív sejtek eredményéből 10,000 esemény kiértékelésével határoztuk meg.

Az izolált mikropartikulákat Annexin V-FITC és anti-CD41a-PeCy5 antitesttel jelöltük, majd a dupla pozitív események alapján azonosítottuk őket. Minden előkészített mintából 60 másodperc időtartamig gyűjtöttük az áramlási citométeren és az FSC-SSC (forward scatter-side scatter) paraméterek alapján történt a mikropartikulák kapuzása. A mikropartikulaszámot az egységnyi idő alatt begyűjtött eseményszámból határoztuk meg a thrombocytaszámra normalizálva.

4.2.6 Szolubilis ICAM-1, P-szelektin és TNF- α koncentrációinak meghatározása ELISA-val

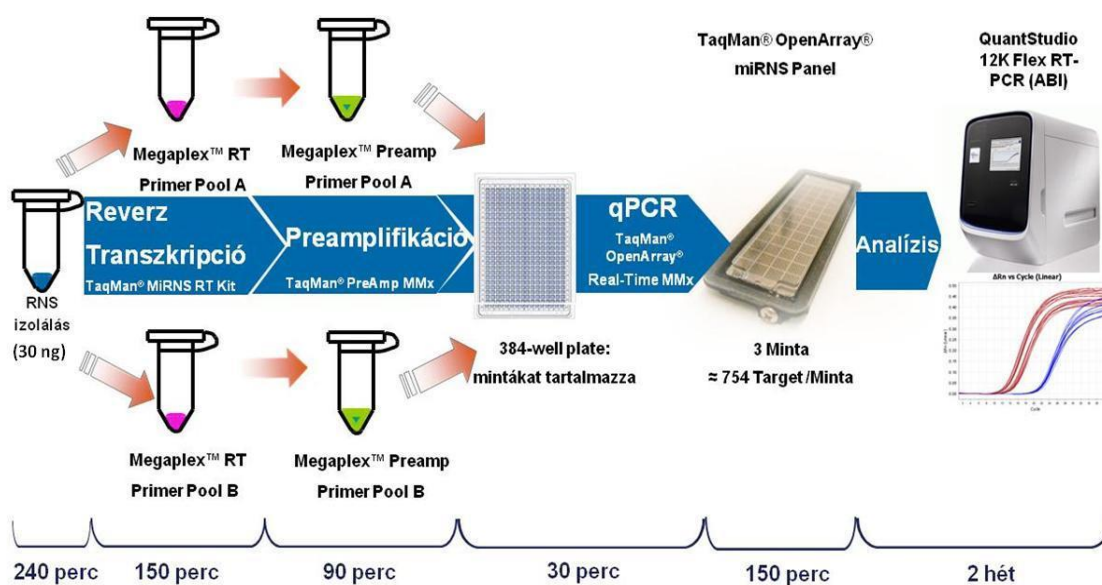
A szepszises és kontroll szérum mintákból, valamint humán koronária artériás endothelsejtek (HCAEC) felülúszóiból az ICAM-1 fehérje koncentrációt ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) kit (Sigma-Aldrich) segítségével mértük le a gyártó utasításait követve. Ezen kívül a TNF- α szinteket is mértük a beteg és kontroll plazma mintákban egy TNF- α -ra specifikus ELISA kit segítségével (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). A szolubilis P-szelektin koncentrációkat 10-10 random módon kiválasztott szepszises és egészséges plazma mintában határoztuk meg egy Quantikine ELISA kit (R&D Systems) segítségével. A mérések előtt a kiolvasztott mintákat centrifugáltuk (10,000 g, 1 perc, szobahőmérséklet).

4.2.7 Össz RNS izolálás

Az LDP mintákból, az izolált mikropartikulákból, a plazma mintákból, valamint az MK (MEG-01) és endothelsejt (HCAEC, human coronary arterial endothelial cell) tenyészetekből kinyerhető össz RNS-t TRI reagenssel izoláltuk a gyártó ajánlása szerint. Az RNS minták tisztaságát és koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) ellenőriztük. Az RNS-mintákat -80°C-on tároltuk.

4.2.8 TaqMan OpenArray

A szeptikus betegek és kontroll személyek thrombocyta miRNS profiljának meghatározásához véletlenszerűen kiválasztottunk az LDP mintákból izolált 3-3 RNS mintát csoportonként és 754-féle miRNS-t elemeztünk TaqMan OpenArray technológiával (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a gyártó protokollját követve (7. ábra). Első lépésben a szeptikus betegek és kontrollok mintáiból izolált össz RNS-ből (100 ng) komplementer DNS (cDNS) mintákat készítettünk reverz transzkripcióval (TaqMan microRNA RT kit, Applied Biosystems) Megaplex primer pool A és B (Megaplex RT Primers Human Pool Set v3.0) felhasználásával. Ezután egy preamplifikációs reakció következett, TaqMan PreAmp master mix (Applied Biosystems) és Megaplex PreAmp primerek (Set v3.0, Applied Biosystems) felhasználásával. Az így kapott terméket és a TaqMan Open Array Real Time PCR Master Mix-et (Applied Biosystems) tartalmazó PCR reakcióelegyet 384-lyukú lemezre vittük fel és az OpenArray AccuFill rendszer betöltötte a mintákat az előkészített TaqMan OpenArray Human MicroRNA panelekre (Applied Biosystems). Végül a méréseket QuantStudio 12 K Flex qPCR készüléken (Applied Biosystem) végeztük a gyártó által megadott beállítások szerint. A kapott adatokat a Thermo Fisher Cloud System (Thermo Fischer Scientific) és az Expression Suite Software v1.0.3 programmal (Applied Biosystems) analizáltuk. Az adatok normalizálásához az RNU-48-at használtuk. A méréseket Dr. Póliska Szilárd (Debreceni Egyetem, ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) vezetésével végeztük.



7. ábra A TaqMan OpenArray módszer működésének és kivitelezésének rövid összefoglalása. A TaqMan Open Array egy többlépéses komplex metodikai folyamat, melynek előkészítő lépése az össz RNS izolálás. Ezután cDNS-t szintetizálunk, az erre a célra készített primer pool-ok segítségével. Ezt követően egy preamplifikációs lépés következik, mely során a templátokat felsokszorozzuk. A mintákat 384 lyukú plate-be pipettázzuk és hozzáadjuk a master mix-et. A miRNS-ekre specifikus assay-eket tartalmazó OpenArray lemezre a készülék viszi fel a mintákat, majd elindítjuk a kvantitatív PCR reakciót. Az eredmények analízisét a Thermo Fisher Cloud System és az Expression Suite Software v1.0.3 program segítségével végezzük.

4.2.9 Az mRNA és prekursor miRNA expressziójának meghatározása

A cDNS készítéséhez a High Capacity cDNA RT kitet (Applied Biosystems) használtuk a gyártó ajánlásának megfelelően. A kiindulási RNS mennyiség a vérlemezkék esetén 200 ng, az endothelsejtek esetében 500 ng, az MK minták esetén 1000 ng volt. Az RNS-ek mennyiségét SYBR Green I Master mix (Roche) és az RNS-ekre specifikus primer párok (forward: 10 µM, reverse: 10 µM Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium) segítségével határoztuk meg QuantStudio 12 K Flex qPCR készüléken (Applied Biosystems). Az eredmények validálásához az RPLP0 (36B4) referencia gént használtuk. A használt primerek szekvenciáit az alábbi táblázatban foglaltuk össze (1. táblázat).

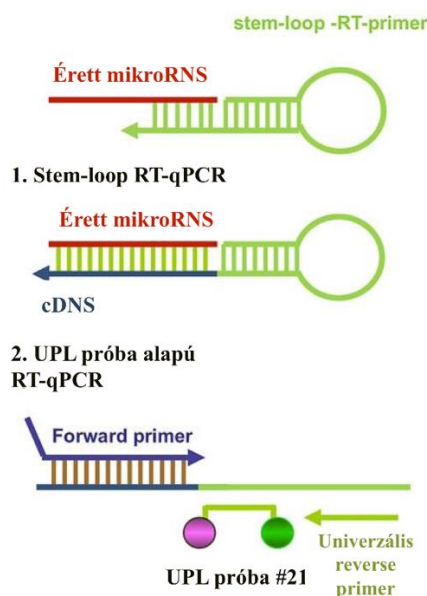
mRNA, pre-miRNA	Forward primer (5' – 3')	Reverse primer (5' – 3')
SELP	CCATTGTCTAGAGGGCCAGT	GGGCTTCCTGGATAGTCAATG
DICER1	TGTTCCAGGAAGACCAGGTT	ACTATCCCTCAAACACTCTGGAA
IL1B	AGCCAGGACAGTCAGCTCTC	AGAGGCCTGGCTCAACAA
ICAM1	CCTTCCTCACCGTGTACTGG	AGCGTAGGGTAAGGTTCTTGC
pre-miR-223-3p	CGCTCCGTGTATTTGACAAG	CGCACTTGGGGTATTTGACA
RPLP0 (36B4)	ATGCAGCAGATCCGCATGT	TCATGGTGTTCTTGCCCATCA

1. táblázat Az mRNA és prekursor miRNA expresszióinak méréséhez használt primerek szekvenciái.

4.2.10 A miRNA expressziók meghatározása specifikus stem loop primerekkel

A miRNA-ek expresszióját Czimmerer Z és munkatársai által kifejlesztett miRNA-specifikus Universal ProbeLibrary (UPL)-próba alapú stem loop RT-qPCR módszerrel mértük [86]. Ez a módszer két lépésből áll (8. ábra). Első lépésben a miRNA-eket specifikusan írjuk át cDNS-sé. Ehhez a lépéshez TaqMan microRNA reverz transzkripció kitet (Applied Biosystems), miRNA specifikus stem loop primereket (500

nM, Sigma) és 10 ng össz RNS-t használunk. Második lépésben a miRNS-ek mennyiségi meghatározásához univerzális reverz primert (100 μ M, Sigma), stem loop primer specifikus UPL-21 próbát (10 μ M, Roche) és miRNS specifikus forward primert (100 μ M, Sigma), Taq polimeráz enzimet (5 U/ μ L, Thermo Scientific) és dNTP-ket (2,5 mM, Thermo Scientific) használtunk.



8. ábra Az UPL-alapú (Universal ProbeLibrary) valósídejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR) lépései. Első lépés: reverz transzkripció (RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction) futtatása miRNS specifikus stem-loop primert használva. Második lépés: valósídejű kvantitatív PCR reakció futtatása. Forrás: Czimmerer Z és munkatársainak 2013-as közleményéből adaptálva. [86]

A miRNS-ek kvantitatív meghatározását QuantStudio 12 K Flex qPCR készüléken (Applied Biosystems) végeztük és az eredmények validálásához az RNU-43 referencia gént használtuk. A miRNS-ek méréséhez használt primereket a miRNA Primer Designed Tool (<http://genomics.dote.hu:8080/mirnadesigntool>) szoftverrel terveztük, melyek szekvenciáit a 2. táblázat foglalja össze.

miRNS	Stem loop RT primer	Forward primer	Univerzális reverse primer
hsa-miR-223-3p	5'- GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC TGGGGT -3'	5'- GTTGGGTGTCAGTTTGTC AAAT -3'	5'- GTGCAGGGTCCGAGGT -3'
hsa-miR-26b-5p	5'- GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC ACCTAT -3'	5'- GTTTGGGTTCAGTAATT CAGG -3'	5'- GTGCAGGGTCCGAGGT -3'
hsa-miR-451 (5')	5'- GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC AACTCA -3'	5'- GTTTGGAAACCGTTACCA TTAC -3'	5'- GTGCAGGGTCCGAGGT -3'
hsa-RNU-43	5'- GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC AATCAG -3'	5'- GTGAACCTATTGACGGGCG -3'	5'- GTGCAGGGTCCGAGGT -3'

2. táblázat A miRNS mérésekhez használt primerek szekvenciái. A reverz transzkripcióban használt stem-loop primerek szekvenciáiban piros színnel került kiemelésre a miRNS specifikus rész. RT: reverz transzkripció.

4.3 Sejtkultúrák tenyésztése és kezelése

4.3.1 Megakaryocyták (MEG-01) tenyésztése gyulladásos körülmények között

A szepszises körülmények *in vitro* modellezéséhez humán megakaryoblastos leukémia (MEG-01, Sigma-Aldrich) szuszpenziós sejteket 10% FBS-t (fetal bovine serum, Sigma-Aldrich), 100 U/mL Penicillin és 100 µg/mL Streptomycin antibiotikumot (Sigma-Aldrich), valamint 2 mM L-glutamint tartalmazó RPMI-1640 médiumban (Sigma-Aldrich) 5% CO₂ és 95% relatív páratartalom mellett 37°C-os termosztátban tenyésztettük. A MEG-01 sejtvonal egy régóta alkalmazott, könnyen fenntartható és jól kezelhető *in vitro* sejtmodellje az MK funkcióknak. [59, 60, 87, 88, 89]

A kísérletek alatt a sejtszámot $0,3 \times 10^6$ sejt/mL-re állítottuk be. A MEG-01 sejteket LPS-sel stimuláltuk (O55: B5, 100 ng/mL, Sigma-Aldrich) LBP (100 ng/mL, Sigma-Aldrich) és szolubilis CD14 (150 ng/mL, Sigma-Aldrich) jelenlétében 4-24 órán keresztül a szeptikus milieu modellezése érdekében hasonló körülmények között, mint amit egy korábbi vizsgálatban mások használtak [68]. A kísérletben pozitív kontrollként a MEG-01 sejteket TNF-α-val (100 ng/mL, Gibco) kezeltük, míg a negatív kontroll mintákban a sejtekhez PBS-t adtunk. A kezelési idő lejárta után a sejteket steril PBS-sel mostuk, majd 750 µL TRI reagensben lizáltuk és az RNS izolálásáig a mintákat -20°C-on tároltuk. A gyulladásos stimulusok hatására az MK-sejtekben bekövetkező NF-κB-út vonal aktivációját IL1B mRNS szint meghatározással igazoltuk RT-qPCR módszerrel.

4.3.2 Endothelsejtek tenyésztése és inkubálása szepszises és normál vérmintákból izolált mikropartikulákkal, illetve *in vitro* TRAP-indukált PMP mintákkal

A humán koronária artériás endothelsejteket (HCAEC, Cell Applications, San Diego, CA, USA) használatra kész MesoEndo Cell Growth médiumban (Cell Applications) tenyésztettük 5% CO₂ és 95% relatív páratartalom mellett 37°C-os termosztátban hasonlóan, mint korábban a munkacsoportunk [90], illetve mások is egyéb vizsgálatsorozatban [91]. A 24-lyukú lemezben letapasztott HCAEC sejteket 1×10^5 /lyuk sejtsűrűség mellett ezután szeptikus betegek vagy kontroll személyek plazmájából izolált mikropartikulákkal inkubáltuk 24 óráig. Ezzel párhuzamosan normál vérlemezke

mintákból indukált, majd izolált mikropartikulákkal is elvégeztük a HCAEC sejtek inkubációját TNF- α előkezelés után, hogy a szepszises körülményeket biztosítsuk. Kontroll mintának a sejteket 24 órán át csak TNF- α -val (100 ng/mL, Gibco) kezeltük. A kezelés után a sejteket egyszer steril HBSS oldattal (Sigma-Aldrich) mostuk, majd 1 mL TRI reagensben lizáltuk és -20 °C-on tároltuk az RNS izolálásáig. Az endothelsejtek különböző mikropartikula mintákkal való interakciójának hatását a miR-223 és az ICAM1 mRNS szint meghatározásával igazoltuk RT-qPCR módszerrel.

4.4 Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok

4.4.1 Az NF- κ B-útvonal aktiválódásának vizsgálata MEG-01 sejtekben

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

4.4.2 A Dicer1 fehérje szintjének vizsgálata MEG-01 sejtekben

MEG-01 sejtekben fluoreszcens mikroszkóppal a Dicer1 fehérje szintjét is vizsgáltuk a fenti körülmények beállítása után. A szuszpenziós sejtenyészetet 24 órán át LPS-sel és kontrollként PBS-sel kezeltük 37°C-on. A fixált sejteket egérben termelt anti-humán Dicer1 antitesttel (2 μ g/mL, Abcam, Cambridge, UK) jelöltük, majd másodlagos antitestként Alexa Fluor 488-konjugált kecskében termelt anti-egér IgG antitestet (5 μ g/mL, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) alkalmaztunk.

4.4.3 A thrombocyta-eredetű mikropartikulák endothelsejtekbe való internalizációjának vizsgálata

Annak érdekében, hogy megvizsgálhassuk és igazoljuk az izolált szepszis eredetű mikropartikulák internalizációját az endothelsejtekbe, a HCAEC sejteket 8-lyukú lemezekben (Millipore, Sigma-Aldrich) tenyésztettük 2 napig beállítva az optimális sejtsűrűséget ($0,25 \times 10^5$ sejt/lyuk). Ezt követően a sejteket szepszises vagy kontroll személyek mintáiból izolált mikropartikulákkal vagy PBS-sel (kontroll minta) kezeltük 24 órán keresztül 37°C -on. A mikropartikulák endothelsejtekbe való bejutásának megakadályozása érdekében a HCAEC sejteket 6 óráig 4°C -on inkubáltuk a szeptikus plazma mintákból nyert mikropartikulákkal, így megelőzve a PMP-k endocitózist, mint ahogyan mások korábban végezték. [92, 93] A fluoreszcens jelöléshez a HCAEC sejteket anti-CD146-PE antitesttel (Becton Dickinson) inkubáltuk 1 órán át, míg a mikropartikulákat anti-CD42a-FITC antitesttel (Becton Dickinson) jelöltük.

4.4.4 A leukocyták endothelsejtekhez történő adhéziójának követése fluoreszcens mikroszkópiával

Ehhez a vizsgálathoz a sejteket 8-lyukú lemezekben (Millicell $\rightarrow$ EZ slide, Millipore, Sigma-Aldrich) tenyésztettük 2 napig $0,25 \times 10^5$ sejt/lyuk sejtsűrűséget alkalmazva. A HCAEC sejteket ezután szepszises mintából nyert mikropartikulákkal vagy PBS-sel (kontroll minta) előkezeltük 24 órán át 37°C -on. A kísérlethez perifériás mononukleáris sejteket (PBMC) szeparáltunk normál minták „buffy coat” részéből Ficoll-Histopaque-1077 felhasználásával (Sigma-Aldrich). Az izolált fehérvérsejteket TNF- α -val (10 ng/mL) stimuláltuk 30 percig, majd 1 órán át 37°C -on a HCAEC sejtekhez adtuk. Az inkubáció után a nem kötődött leukocytákat háromszor mostuk HBSS-sel. A HCAEC sejteket anti-CD146-PE antitesttel (Becton Dickinson), míg a leukocytákat anti-CD45-FITC antitesttel jelöltük (Becton Dickinson).

A fentiekben bemutatott összes fluoreszcens mikroszkópos kísérlet során a sejtmagokat Hoechst 33342 (Invitrogen) festékkel jelöltük. A mintákat minden esetben Zeiss Axio Scope. A1 fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Németország) vizsgáltuk és a képeket a ZEN 2012 szoftver (1.1.0.0 verzió) segítségével elemeztük (Carl Zeiss Microscopy GmbH) a következő hullámhosszon: DAPI: excitáció 365 nm, emisszió BP 445/50 nm; fluorescein: excitáció BP 470/40 nm,

emisszió BP525/50 nm, PE: excitáció BP 546/12 nm, emisszió 575-640 nm. Az NF- κ B p65 festésnél kiszámítottuk a sejtmag és a citoplazma fluoreszcencia intenzitásának az arányát. Az LPS-sel és TNF- α -val kezelt MK sejtkultúrák Dicer1 fehérjeszintjét a MEG-01 sejtek citoplazmájában mért specifikus fluoreszcencia intenzitás alapján határoztuk meg. A fluoreszcens mikroszkóppal végzett kísérletek kivitelezését, valamint az eredmények értékelését Dr. Fenyvesi Ferenc, Dr. Váradi Judit és Dr. Rusznyák Ágnes (Debreceni Egyetem, GYTK, Gyógyszertechnológiai Tanszék) segítségével végeztük el.

4.5 A Dicer1 enzim és a P-szelektin fehérje mennyiségi meghatározása Western blot-tal

A szeptikus betegek és egészséges egyének mintáiból szeparált vérlemezkéket egy proteáz-inhibitor keveréket tartalmazó RIPA pufferben lizáltuk (Sigma-Aldrich). A fehérjéket 7,5%-os poliakrilamid gélen elektroforézissel elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra vittük át a fehérjéket (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A nem specifikus kötődések elkerülése érdekében (blokkolás) 5%-os BSA (bovine serum albumin) (Sigma-Aldrich) tartalmú TBST puffert (Tris-buffered saline/Tween; 20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1% (vol/vol) Tween 20) használtunk. Elsődleges antitestként a Dicer1 enzim vizsgálatokhoz egy monoklonális egér anti-humán Dicer1 (1:100) (ab14601, Abcam) antitestet, a szeptikus és kontroll trombocyták P-szelektin tartalmának detektálásához egy monoklonális egér anti-humán P-szelektin (1:100) (sc-19672, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) antitestet alkalmaztunk. A különböző minták egységes fehérjefelvitelének igazolásáért anti- β -aktin antitestet (1:1000) (ab8227, Abcam) használtunk egy éjszakán keresztül. Másodlagos antitestként Horseradish Peroxidase (HRP)-konjugált kecske anti-egér antitestet (1:100.000, Bio-Rad) használtunk és a membránokat 1 óráig át inkubáltuk. Az immunreakciót az Immobilon Western Chemiluminescent HRP szubsztráttal (Millipore) tettük láthatóvá. Végül a P-szelektin, illetve a Dicer1 fehérjesávok relatív intenzitásának meghatározását a β -aktin sávok intenzitásához történő normalizációval végeztük.

4.6 A Dicer1 enzim expressziójának represszálása siRNS transzfekcióval kétféle sejtvonalban

A Dicer1 expresszió artifiális manipulálását, csendesítését kétféle okból is elvégeztük két különböző sejtvonal bevonásával: 1) annak érdekében, hogy

megvizsgáljuk a MEG-01 sejtekben, hogy szepszisben a vérlemezkében a miR-26b szint csökkenésének hátterében a Dicer1 enzim alacsonyabb expressziója áll-e, valamint 2) a másik kísérletsorozatban a szepszises mikropartikulákkal kezelt HCAEC sejtekben a miR-223 expressziójának fokozódásához miRNS-sel összefüggő más intracelluláris folyamat hozzájárul-e valamilyen módon.

Ennek kivitelezése érdekében a MEG-01 és külön a HCAEC sejtekbe specifikus Dicer1 ellenes siRNS-t (ID: S23756, 40–80 pmoL) és negatív kontrollként NEG-01 siRNS-t (Silencer Select Negative Control No. 1) (Invitrogen) transzfektáltunk Lipofectamine RNAiMAX transzfekciós reagenssel (Invitrogen) és inkubáltuk vele 24–48 órán keresztül 37°C-on. A MEG-01 transzfekciót 6 lyukú lemezen végeztük és a sejtszámot $0,3 \times 10^6$ /mL-re állítottuk be, míg a HCAEC sejteket 1×10^5 /lyuk sejtsűrűség mellett tapasztottuk le 24 óráig a transzfekció előtt. Az optimális körülményekhez 3%-os FBS-t (Sigma-Aldrich), valamint 100 U/mL penicillint és 100 µg/mL streptomycint (Sigma-Aldrich) tartalmazó OPTI-MEM médiumot használtunk. A transzfekció után a mintákból össz RNS-t izoláltunk. A transzfekció hatékonyságát a Dicer1 siRNS szint mérésén keresztül TaqMan siRNA assay-vel (ID: S23756_asy, Invitrogen) ellenőriztük. A transzfekciót követően a MEG-01 sejtes kísérletben a miR-26b, a Dicer1 működésétől független miR-451, valamint a DICER1 és SELP mRNS-ek expresszióját, továbbá a HCAEC-mikropartikula interakciót követően a miR-223, a pre-miR-223 és a DICER1 mRNS expressziót kvantáltuk RT-qPCR módszerrel (1. és 2. táblázat).

4.7 A miR-26b és a SELP mRNS funkcionális kapcsolatának igazolása szeptikus körülmények között

A MEG-01 sejtekben - specifikus miRNS mimic segítségével - „miRNS-felülexpresszáció (overexpression)” révén kívántuk igazolni, hogy a miR-26b modulálja a SELP mRNS szintet. A sejteket LPS-sel (100 ng/mL), illetve TNF-α-val (100 ng/mL) kezeltük 4 órán át 37°C-on. A transzfekcióhoz az előzőekben bemutatott 3%-os FBS-t (Sigma-Aldrich) tartalmazó OPTI-MEM médiumot használtunk. A miRVana miR-26b mimic-et (40 pmoL, Ambion, Austin, TX, USA) Lipofectamine RNAiMAX transzfekciós reagens (Invitrogen) használatával juttattuk be a sejtekbe és inkubáltuk 24 órán keresztül. Negatív kontrollként NEG-01 mimic-et (40 pmoL, Ambion) transzfektáltuk a MEG-01 sejtekbe. A transzfekció után a sejtekből össz RNS-t izoláltunk és RT-qPCR módszerrel mértük a miR-26b és a SELP mRNS expresszióját.

4.8 A miRNS expressziók Dicer1 függőségének vizsgálata calpain gátlása révén MEG-01 sejtekben

A MEG-01 sejtekhez calpain inhibítort, calpeptint (40 $\mu\text{mol/L}$, Sigma-Aldrich) adtunk 24 óráig 37°C-on. A különböző sejt mintákat csak LPS-sel, LPS-sel és calpeptinnel együtt, valamint pozitív kontrollként önmagában calpeptinnel kezeltük. A mintákból a kezelés után össz RNS-t izoláltunk, majd RT-qPCR módszerrel vizsgáltuk a miR-26b expressziókat RT-qPCR módszerrel.

4.9 RNS szekvenálás és a szekvenálási adatok elemzése

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

A nyers szekvenálási adatokat, az úgynevezett fastq fájlokat a HISAT2 algoritmus segítségével összehasonlítottuk a GRCh37 humán referencia genommal. Az elemzést a StrandNGS szoftver segítségével végeztük el. A szekvenált mintákban eltérő mértékben expresszálódó gének azonosításához és elemzéséhez R-programcsomagokat (pheatmap és ggplot2) használtunk. A nem kezelt és LPS-sel kezelt sejtekben mért gének

expressziójában lévő különbséget Tukey *post hoc* teszttel kiegészített ANOVA teszttel állapítottuk meg.

4.10 Egyéb rutin laboratóriumi vizsgálatok

A fehérvérsejtszámot, a thrombocytaszámot és az átlagos thrombocyta térfogatot (MPV) Advia® 2120 Hematology System automatán (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NJ, USA) határoztuk meg. A szérum CRP és PCT szintje elektro-kemilumineszcens immunoassay módszerrel Cobas® 8000 automatán (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) kerültek le mérésre rutin diagnosztikai vizsgálatkérés keretén belül.

4.11 Statisztikai kiértékelés

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy az adataink normál vagy nem normál eloszlást mutatnak, Kolmogorov-Smirnov tesztet, esetenként Shapiro-Wilk tesztet használtunk. Az eredményeket átlag $\pm$ szórás (standard deviation, SD vagy standard error of the mean, SEM), illetve medián és interkvartilis tartomány (IQR) formában fejeztük ki. Két csoport összehasonlítására - normál eloszlás esetén – Student-féle t-próbát használtunk, míg nem normál eloszlás esetén Mann-Whitney U-tesztet vagy Chi-négyzet próbát alkalmaztunk. Kettőnél több csoport esetén ANOVA vagy Kruskal–Wallis tesztet végeztünk kiegészítve a releváns *post hoc* teszttel. Ha csak 4 minta volt egy csoportban, ez esetben mind t-próbával, mind Mann-Whitney teszttel elvégeztük az összehasonlítást. Az elsőfajú hiba csökkentése érdekében ANOVA-t és *post-hoc* (Bonferroni) tesztet használtunk. Statisztikailag szignifikánsnak tekintettük a különbséget, amennyiben a p érték kisebb volt, mint 0.05 ($p < 0.05$). A statisztikai számítások és az ábrák a GraphPad®Prism szoftverrel (6.01 verzió, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) készültek.

5. Eredmények

5.1 A szepszises betegek és kontroll személyek főbb klinikai jellemzői

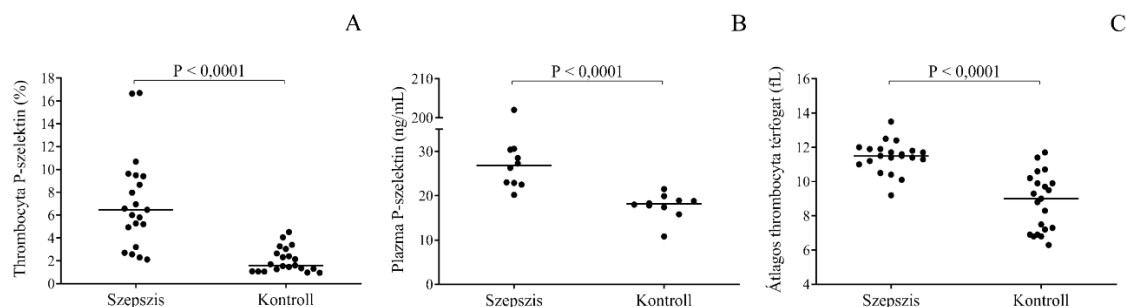
A gyulladásos laboratóriumi paraméterek úgy, mint a fehérvérsejtszám, szérum CRP és PCT szintek szignifikánsan emelkedettek voltak a szeptikus betegek mintáiban a kontrollokhoz képest (3. táblázat). A 21 beteg közül tizenhárman szenvedett tüdőgyulladással járó szepszisben. A thrombocytaszám szignifikánsan alacsonyabb volt a szepszises csoportban ($p < 0,01$). Kiemelendő, hogy a két csoport között nem volt különbség a vérlemezkefunkciót gátló gyógyszerek (pl. aspirin, clopidogrel stb.) használata tekintetében. A betegcsoportban 14 személy szenvedett szepszisben, míg 7 esetben szeptikus sokk alakult ki. A kontroll személyekben a gyulladásos paraméterek nem voltak emelkedettek.

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

3. táblázat A szepszises betegek és a kontrollok legfontosabb demográfiai és klinikai jellemzőinek összefoglaló táblázata. Az adatokat medián (IQR) formában vagy átlag ± SD értékkel fejeztük ki. A klinikai állapot súlyosságának jellemzésére SOFA-score-t alkalmaztunk. A statisztikai elemzéshez t-próbát vagy Mann-Whitney U-tesztet, illetve Chi-négyzet próbát használtuk. CRP: C-reaktív fehérje; PCT: procalcitonin; n.s.: nem szignifikáns; n/a.: nem elérhető adat.

Fokozott vérlemezke aktivációt észleltük a szeptikus betegekben a magas felszíni P-szelektin expresszió ($p < 0,0001$) és az emelkedett szolubilis P-szelektin plazmakoncentrációk ($p < 0,0001$; $n=10$ /csoport) alapján, szemben az egészséges kontrollokkal (9. ábra; A és B). Ezen kívül megnövekedett átlagos thrombocyta-térfogat

(MPV) értékeket ($p < 0,0001$) is mértünk a szeptikus csoportban a normál kontrollokhoz képest (9. ábra; C).

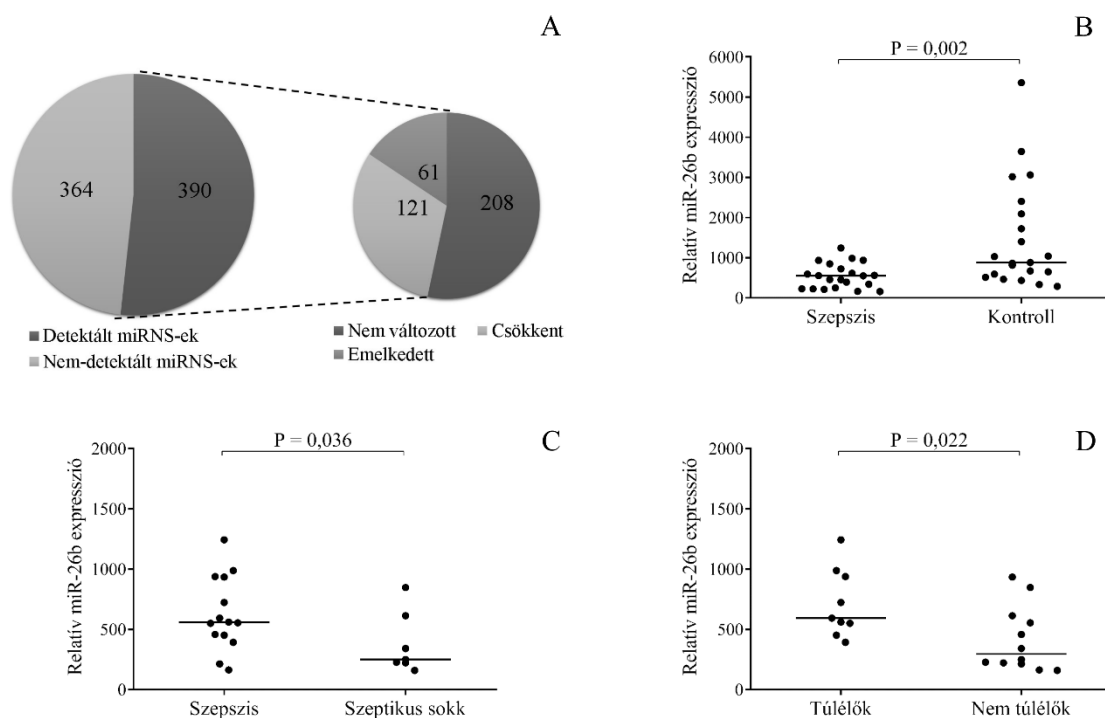


9. ábra A vérlemezke aktivációs állapot analízise különböző paramarkerek segítségével szeptikus és kontroll személyekben. A trombocyták aktivációs állapotát felszíni P-szelektin ($n = 21$) pozitivitáson (A) és szolubilis P-szelektin koncentráción (B) keresztül vizsgáltuk ($n = 10$). A vérlemezkek átlagos térfogatát is elemeztük (C). Mindezek a paraméterek szignifikánsan magasabbak voltak a szeptikus betegek esetén, mint a kontrollokban, ami a vérlemezkek fokozott aktiválódására utal. A pontok 1-1 minta eredményét, a vízszintes vonalak a medián értéket jelölik. Az összehasonlításokhoz Mann-Whitney U tesztet végeztünk.

5.2 Eltérő trombocyt miRNS expressziók szepszisben

A miRNS expressziót először szeptikus betegek trombocyt mintáiban analizáltuk. Megvizsgáltuk, hogy az aktiválódott trombocytákban melyek azok a miRNS-ek, amelyek a legnagyobb mértékű expresszió változást mutatják. A miRNS profil átfogó elemzését TaqMan OpenArray segítségével végeztük. Random módon kiválasztottunk 3-3 RNS mintát mindkét vizsgálati csoportból annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, mely vérlemezke miRNS-ek expressziója változott meg szignifikánsan szepszisben a kontroll egyénekhez képest. Azt tekintettük jelentős eltérésnek, ha legalább 1,5-szeres változást tapasztaltunk. Az array használatával a 754 detektálható miRNS-ből 390 miRNS-t tudtunk kimutatni ezekben a mintákban. Ezek közül 121 miRNS szintje jelentősen csökkent, míg 61 expressziója szignifikánsan emelkedett (10. ábra; A). Jelentősen csökkent az expressziója az alábbi miRNS-eknek, pl. miR-221, miR-223, miR-30b, miR-27b stb. Ezek közé tartozott a miR-26b is, melyet tovább vizsgáltunk, mivel a vérlemezkek 10 legintenzívebben expresszált miRNS-ei közé tartozik [63]. Ugyanakkor emelkedett szintet mutatott többek között a miR-155, a miR-133a, miR-96 stb. Predikciós programok (pl. www.targetscan.org) alapján a miR-26b egyik cél génje a *SELP*, és diabeteses környezetben a miR-26b szabályozta a *SELP* mRNS szintjét és ezen keresztül a P-szelektin fehérje expresszióját [60]. A vérlemezke miR-26b szintjét szepszisben eddig még nem vizsgálták, ezért a beválogatott szeptikus betegek LDP mintájában kvantáltuk,

és a betegkohorszban szignifikánsan csökkent expressziót ($p = 0.002$) tapasztaltunk a kontrollokhoz hasonlítva (10. ábra; B).



10. ábra Szepszis által indukált vérlemezke miRNS expresszió analízise. A vérlemezkek miRNS-profilját TaqMan OpenArray módszerrel három szeptikus és három kontroll LDP mintában (A) vizsgáltuk. A 390 detektált miRNS közül 121 jelentősen csökkent és 61 miRNS emelkedett expressziót mutatott a szeptikus vérlemezkekben. Validálás céljából a miR-26b expresszióját (B) mindkét vizsgálati csoportban meghatároztuk ($n=21$ /csoport), ami a szepszises csoportban csökkenő tendenciát mutatott a kontrollokhoz képest. A miRNS expressziójának változását a szepszises csoportban tovább korreláltattuk a betegség súlyosságával (C) és a szepszis miatt bekövetkező halálozással (D). Azoknál a betegeknél, akiknél még alacsonyabb volt a miR-26b szint, nagyobb arányban következett be szeptikus sokk és hunytak el a betegség miatt. Az ábrán a medián értékeket (vízszintes vonal) tüntettük fel. A pontok 1-1 minta eredményét jelölik. Az összehasonlításokhoz Mann-Whitney U tesztet használtunk.

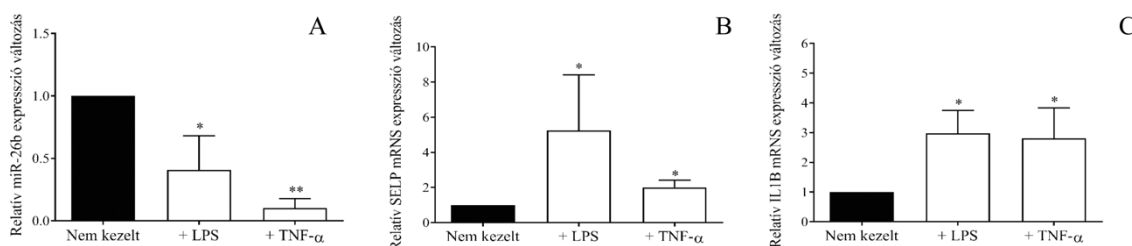
5.3 A vérlemezke miR-26b expressziója korrelál a szepszis súlyosságával és a mortalitással

Célunk ezt követően az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a thrombocyta csökkent miR-26b szint összefügg-e a szepszis súlyosságával és a betegség kimenetelével a magas P-szelektin expresszió jelenlétében. A betegeket elemeztük a betegségük súlyossága alapján (szepszis, $n = 14$) és szeptikus sokk, $n = 7$). Szignifikánsan még alacsonyabb miR-26b expressziókat kvantáltunk azoknál a betegeknél, akiknél szeptikus sokk alakult ki szemben a szepszises betegekkal ($p = 0.036$) (10. ábra; C). Amikor a teljes

betegkohorszt túlélő ($n = 9$) és nem túlélő ($n = 12$) alcsoportba osztottuk a 28 napos mortalitási adatok alapján, szintén alacsonyabb thrombocyta miR-26b expressziókat ($p = 0.022$) mértünk azoknál a betegeknél, akik belehaltak a betegségbe szemben a túlélőkkel (10. ábra; D). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a súlyosabb stádiumú és kimenetelű szepszisben a vérlemezke jelentős fenotípusváltozása következik be, ami kifejezett miRNS expresszió átrendeződéssel jár együtt, így a miR-26b expresszió jelentős csökkenésével is.

5.4 Thrombocyta aktivációhoz kötődő RNS expresszió változások *in vitro* modellezése

A szeptikus állapot által indukált megváltozott vérlemezke miR-26b expresszió további igazolására egészséges személyek tisztított vérlemezke mintáit LPS-sel *in vitro* aktiváltuk LBP és szolubilis CD14 jelenlétében vagy PBS-sel a negatív kontroll mintában 37 °C-on 4 órán keresztül. Pozitív kontrollként TNF- α -t alkalmaztunk a vérlemezke aktivációjára. A miR-26b expressziója a vérlemezékben jelentősen csökkent mindkét agonista hatására (11. ábra; A). Ezek az eredmények összhangban vannak az *ex vivo* szeptikus vérlemezékből származó miRNS eredményekkel, amiből arra következtetünk, hogy az LPS képes modulálni az aktiválódott vérlemezék RNS tartalmának expresszióját.



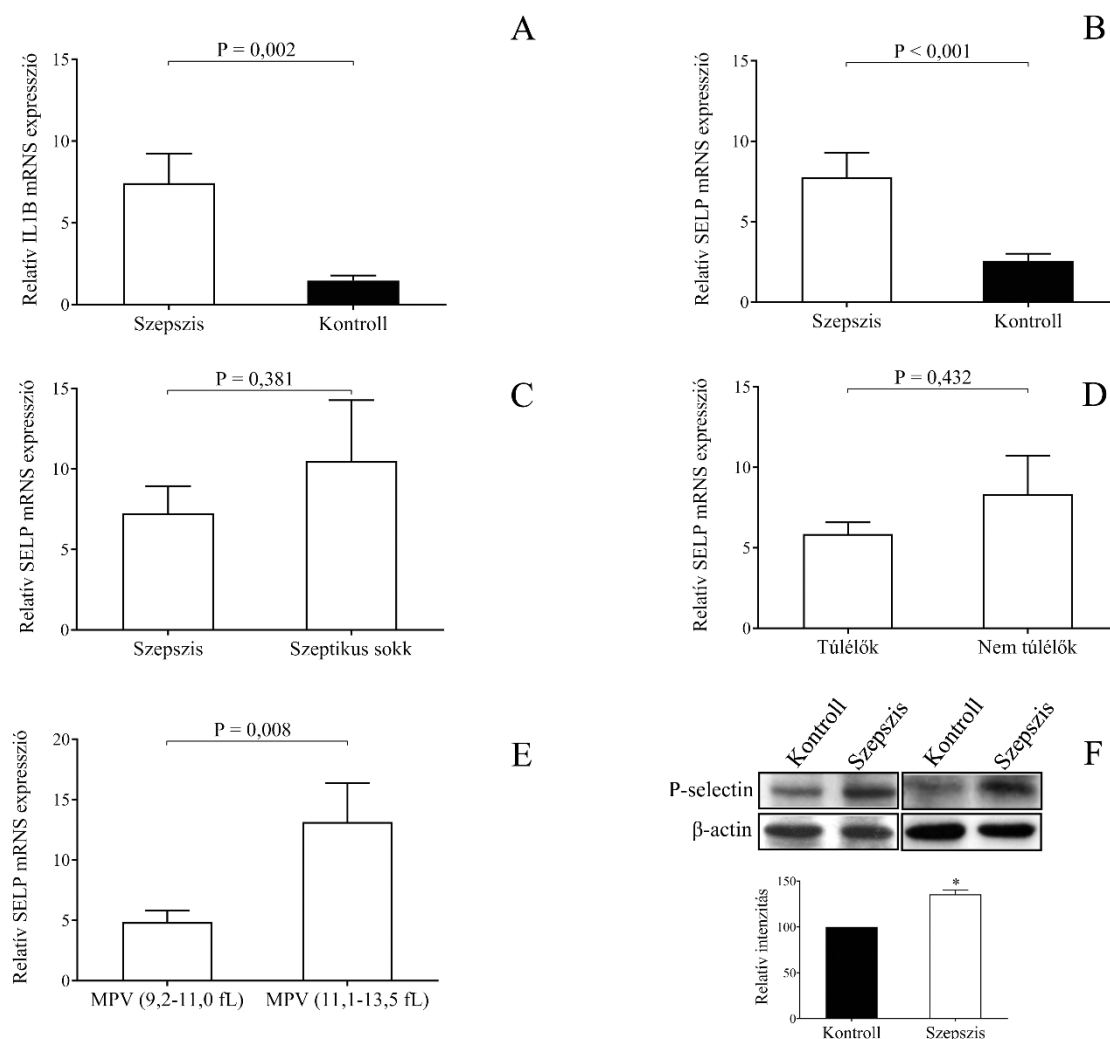
11. ábra LPS-sel és TNF- α -val *in vitro* aktivált thrombocyták RNS expressziójának vizsgálata. A miR-26b (A) csökkent expressziója figyelhető meg mind LPS, mind TNF- α kezelés hatására, míg a SELP (B) és az IL1B (C) mRNA expresszió szignifikánsan emelkedett az agonisták hatására. ($n = 4-6$ /kísérlet). Átlag $\pm$ SEM-et ábrázoltunk, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. nem kezelt kontroll minták Mann-Whitney U teszt, illetve t-teszt alapján.

Ezt követően vizsgáltuk azt is, hogy a miR-26b cél mRNA expressziójának változása is bekövetkezik-e ezekben az *in vitro* „szepszisz” thrombocytákban, így a SELP mRNA expresszióját RT-qPCR módszerrel kvantáltuk. Mivel korábban

beszámoltak arról, hogy az *IL1B* gén expressziója fokozódik szepszises vérlemezékben [68], ezért párhuzamosan mi is vizsgáltuk az *IL1B* mRNS expresszióját mint kontroll gént, amely jelentős emelkedést mutatott ($p < 0,05$) a gyulladásos stimulusok hatására (11. ábra; C). A miR-26b által szabályzott SELP mRNS expresszió - a csökkent miR-26b jelenlétében - szignifikánsan emelkedett mind az LPS, mind a TNF- α által ($p < 0,05$) (11. ábra; B). Ezek az eredmények is arra utalnak, hogy szepszises körülmények között a vérlemezék egy kifejezett fenotípus változáson esnek át, mely RNS szint átrendeződésével is együtt jár.

5.5 Indukált SELP mRNS expresszió a szeptikus thrombocytákban

Az *in vitro* aktivált thrombocyta minták után megvizsgáltuk a SELP és *IL1B* mRNS expressziót az *ex vivo* szepszises mintákban is, és mindkét mRNS szint jelentősen emelkedettebb volt szepszisben, mint a kontrollokból származó thrombocytákban ($p < 0,002$; $p < 0,001$) (12. ábra; A, B). Ugyanakkor nem szignifikánsan, de magasabb volt azoknál a betegeknél, akiknél szeptikus sokk alakult ki (12. ábra; C), vagy akik belehaltak a betegségbe (12. ábra; D). Tovább elemezve a SELP expressziókat a vérlemezék MPV értékei alapján szignifikánsan magasabb SELP mRNS szintet ($p = 0,008$) találtunk azoknál a betegeknél, akiknél nagyobb volt az MPV-érték ($\geq 11,1$ fL), vagyis reaktívabb thrombocytái voltak, mint ahogy azt korábban más kórképben mi is találtuk az MPV paraméter vizsgálatával [94] (12. ábra; E).



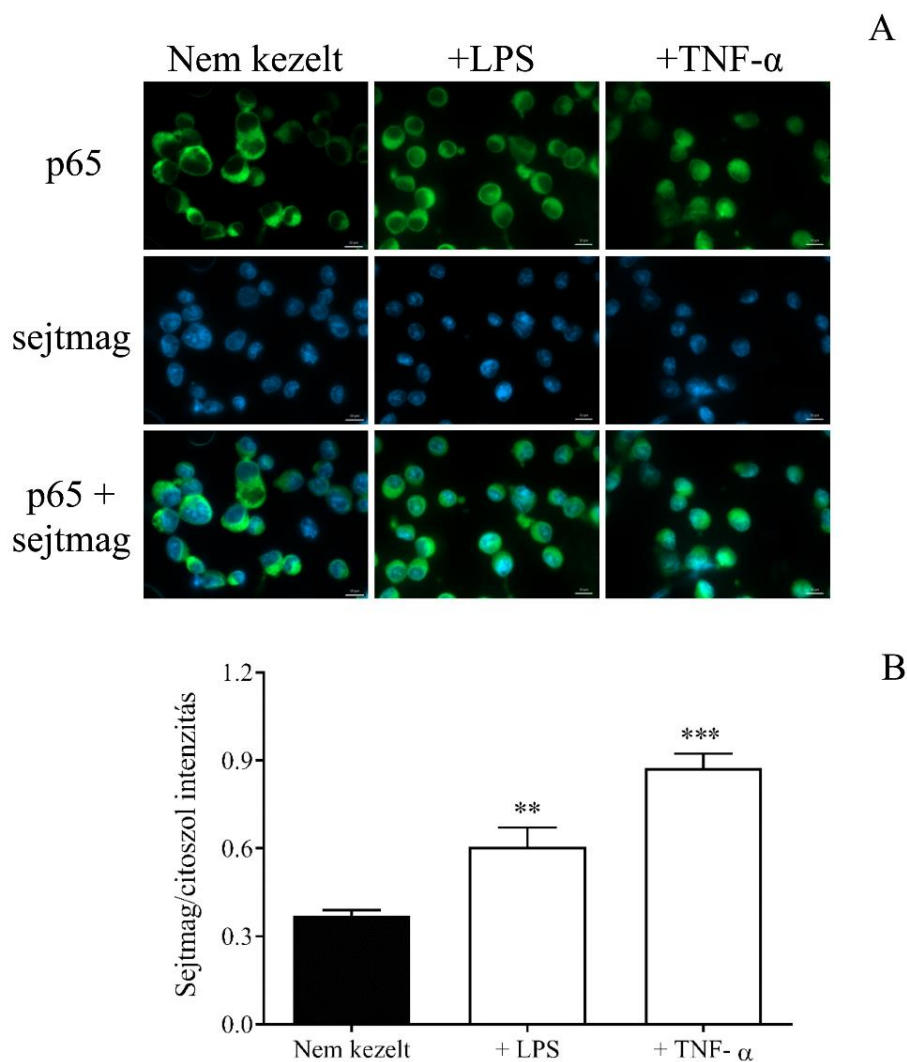
12. ábra Fokozott SELP mRNS szint és P-szelektin fehérje expresszió a szeptikus vérlemezkékben. A szeptikus betegek ($n = 21$) thrombocyta mintáiban az IL1B (A) és a SELP mRNS (B) expressziója emelkedett volt a kontroll vérlemezkékhez képest. A vérlemezke SELP mRNS expressziója emelkedő tendenciát mutatott azoknál a szepszisben szenvedő betegeknél, akiknél szeptikus sokk (C) alakult ki, vagy akik végül belehaltak a betegségbe (D). Szignifikánsan emelkedett SELP mRNS-szintet figyeltünk meg a nagyobb MPV értékeket mutató vérlemezkékben ($n = 8$) (E). Szepszises thrombocyta lizátumból ($n = 5$) Western blot technikával detektált P-szelektin fehérje mennyiségi emelkedést mutatott a normál mintákhoz képest (F). Átlag $\pm$ SEM-et ábrázoltunk, $* p < 0,05$ vs kontroll minták. Az összehasonlításokhoz Mann-Whitney U tesztet vagy párosítatlan t-próbát használtunk.

A szepszises betegek vérlemezkéiben kimutatott megemelkedett SELP mRNS expresszió miatt arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon fehérje szintjén is nagyobb mennyiségben van jelen a P-szelektin receptor, amit Western blot technikával vizsgáltunk. Azt tapasztaltuk, hogy a szepszises betegektől nyert thrombocyta lizátumok szignifikánsan nagyobb mennyiségű P-szelektin fehérjét tartalmaztak ($p < 0,05$) a

kontroll mintákhoz képest, ami szepszisben egy előaktivált, prokoaguláns állapotot biztosít a vérlemezkéknek (12. ábra; F) [95].

5.6 Az NF- κ B-útvonal aktiválódásának vizsgálata LPS hatására MEG-01 sejtekben

Szepszisben a TLR4 receptoron keresztül aktiválódik az intracelluláris NF- κ B szignálút vonal [15], mely MK-ban is egy aktív mechanizmus [20]. MEG-01 sejtekben vizsgáltuk, hogy LPS aktiváció hatására a p65 transzkripciós faktor bejut-e a sejtmagba fokozva ezzel a gyulladásos gének transzkripcióját. Fluoreszcens mikroszkóppal vizualizáltuk a p65 pozivitást és a festődés intenzitásának arányát a sejtmag és a citoplazma között. Pozitív kontrollként TNF- α kezelést végeztünk a sejt kultúrában ugyanolyan kísérleti körülmények között. Azt tapasztaltuk, hogy mind az LPS ($p < 0,01$), mind a TNF- α kezelés ($p < 0,001$) hatására jelentősen nőtt a p65 pozitivitás és ezáltal a sejtmag/citoplazma fluoreszcencia intenzitásának aránya a nem kezelt sejtekhez képest, mely a p65 nukleáris internalizációjára utalt mindkét agonista hatására (13. ábra; A, B).



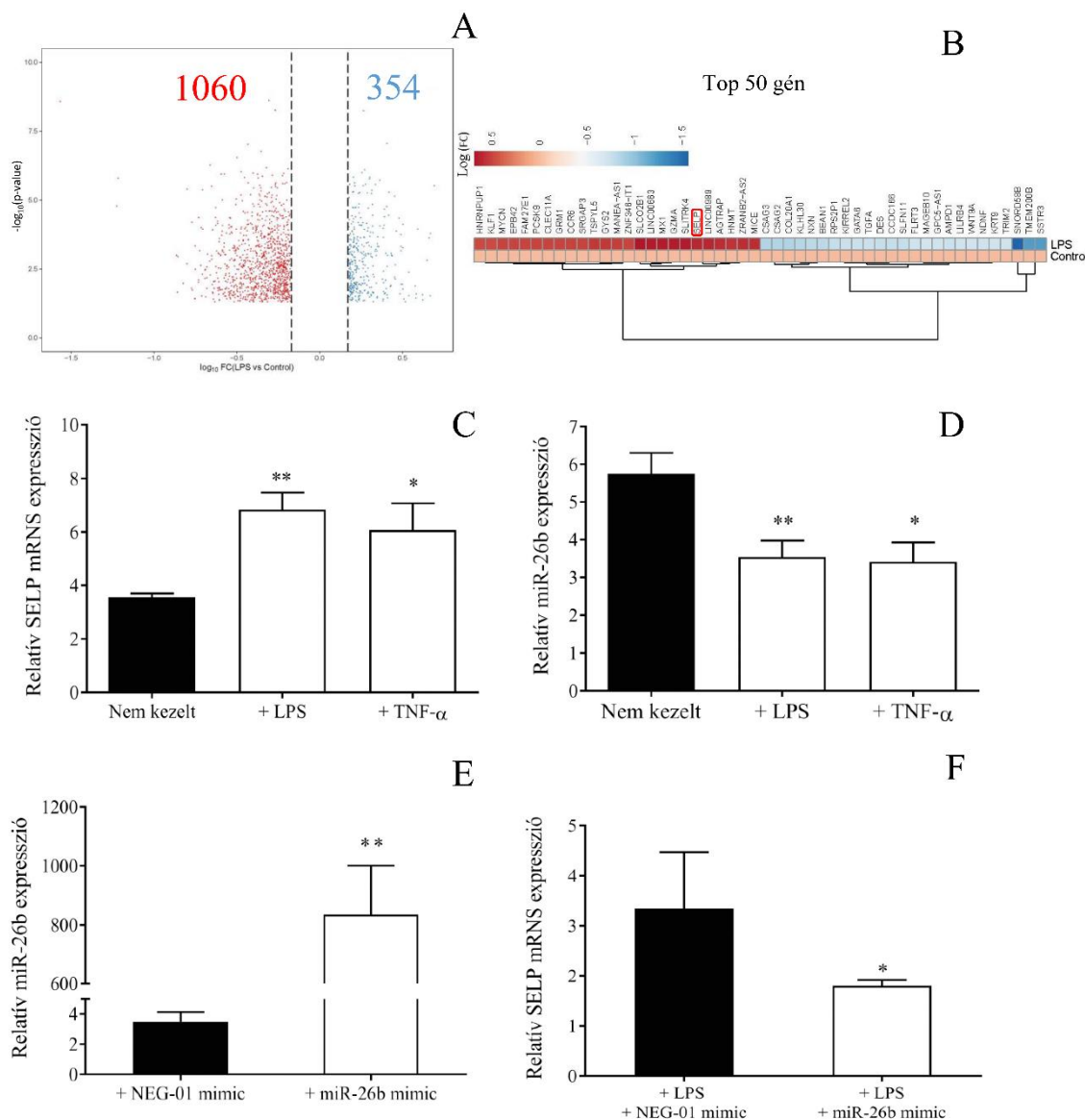
13. ábra Az NF- κ B-útvonala aktivációjának vizsgálata LPS-sel és TNF- α -val kezelt MEG-01 sejtekben. A sejteket PBS-sel (negatív kontroll), 100 ng/mL LPS-sel vagy 100 ng/mL TNF- α -val stimuláltuk 4 órán át. Az NF- κ B p65 alegység magtranszlokációját immunhisztokémiai festéssel figyeltük meg. Zöld: p65 festés; kék: sejtmag. Skála mérete: 20 μ m (A). Elemeztük a sejtmagokban és a citoplazmában a p65 fluoreszcencia intenzitásának arányát (B). Átlag $\pm$ SEM-et ábrázoltuk, $n = 6-10$ /mintatípus. ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ vs nem kezelt kontroll sejtek. Az összehasonlításokhoz párosítatlan t-próbát használtunk.

5.7 Génexpressziós változások analízise LPS-sel kezelt MEG-01 sejtekben

Szepszisben nemcsak a keringő vérlemezék, de a csontvelői sejtek, így az MK-k is ki vannak téve a gyulladásos mediátorok hatásának [20], ami az MK-k abnormalis működéséhez és ennek eredményeként a thrombocyták fokozott granzyme B fehérje expressziójához és következményes lymphotoxicitáshoz vezetett [96]. Ennek a folyamatnak a modellezéséhez a MEG-01 sejteket 4 órán keresztül LPS-sel stimuláltuk *in vitro*, és analizáltuk a génexpresszió változásokat RNS szekvenálással. Az RNS

szekvenálás eredményének elemzésekor 1414 gén jelentősen eltérő expressziót (DE) mutatott (14. ábra; A). Ezen belül 354 gén szignifikánsan emelkedett és 1060 gén szignifikánsan csökkent az LPS-aktivált MEG-01 sejtekben a kezeletlen sejtekhez képest.

A 14. ábra B része az 50 legnagyobb mértékben expresszált gént ábrázolja, melyek közé tartozott a részletesen vizsgált *SELP* gén is (14. ábra; B). Ezek az eredmények összhangban állnak az *ex vivo* szeptikus vérlemezkékben tapasztaltakkal. Ezek az *in vitro* eredmények azt mutatják, hogy szeptikus csontvelői környezetben az MK-k érintettsége révén jelentős RNS expresszió változások játszódnak le.



14. ábra A TLR4 útvonalon keresztül bekövetkező mRNA és miRNA expresszió változások a MEG-01 sejtekben. Az LPS-sel kezelt MEG-01 sejtek RNS szekvenálási eredményét a DESeq analízis alapján készített Volcano plot mutatja be. Az x tengely a fold change értéket, az y tengely pedig a statisztikai szignifikanciát (*p* érték) mutatja 10-es alapú logaritmikuskálán. Az ábra a

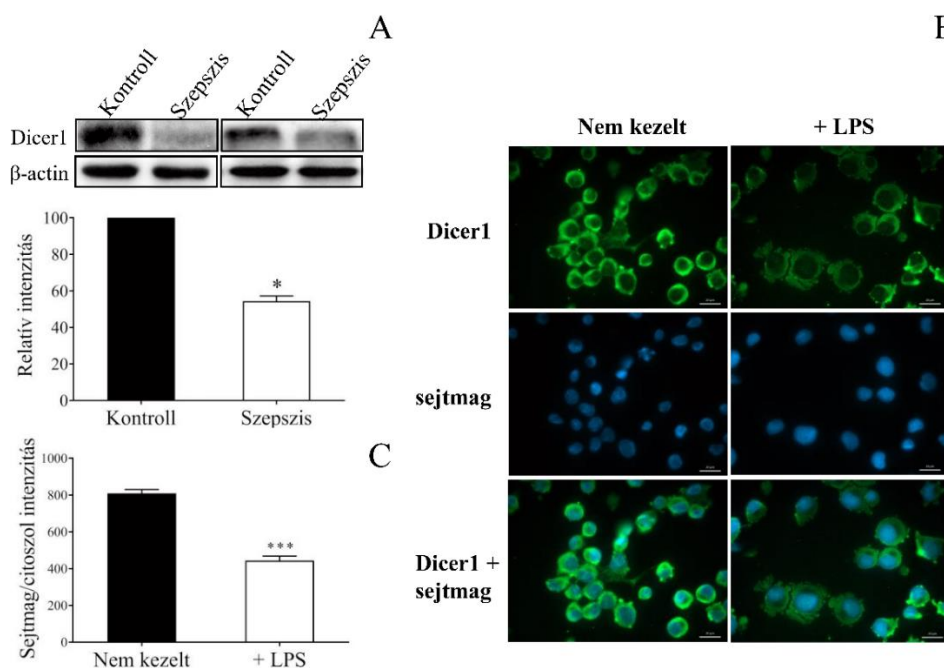
jelentősen megváltozott expressziót mutató géneket ábrázolja a kezeletlen és az LPS-sel kezelt MEG-01 sejtekben ($n = 3/\text{kezelés}$). 354 (kékkel jelölve) szignifikánsan csökkent, míg 1060 (pirossal jelölve) emelkedett transzkriptumot detektáltunk az LPS-aktivált MEG-01 sejtekben a kontroll sejtekhez képest. A szaggatott vonalak jelzik a „fold change” (FC) határértékét (A). Az 50 legnagyobb mértékben expresszált gén hő térképe közöttük a *SELP* génnel (piros négyzetben) (B). A MEG-01 sejtekben kvantáltuk az emelkedett *SELP* mRNS szintet LPS kezelés után ($n = 6-8/\text{kezelés}$). Pozitív kontrollként TNF- α kezelést használtunk (C). Ezzel párhuzamosan a miR-26b szignifikánsan csökkent az LPS, illetve a TNF- α kezelés hatására a kezeletlen sejtekkel szemben (D). A miR-26b és a *SELP* mRNS közötti funkcionális kapcsolat megerősítésére specifikus miRNS mimic transzfekciót végeztünk – az adott miR-26b „overexpresszáltatása” érdekében - LPS-sel kezelt MEG-01 sejtekben. A miR-26b mimic hatására (E) csökkent a *SELP* mRNS expresszió a kontroll NEG-01 mimic-el kezelt mintákhoz képest (F). Átlag $\pm$ SEM értéket ábrázoltunk. Az összehasonlításhoz Mann-Whitney U-tesztet használtunk. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ vs nem kezelt (vagy NEG-01 kontroll mimic-kel kezelt) kontroll minták.

5.8 Az emelkedett *SELP* mRNS szinthez hozzájárul a csökkent miR-26b expresszió a MEG-01 sejtekben szepszises körülmények között

Az *ex vivo* szepszises vérlemezkékben tapasztaltakhoz hasonlóan a MEG-01 sejtekben az LPS, valamint a TNF- α hatására a *SELP* mRNS szint jelentősen magasabb volt, míg a miR-26b expresszió jelentősen csökkent (14. ábra; C, D). Ez arra utal, hogy ezek a szepszis mediátorok az MK-ban is kiváltják az RNS expresszió változásokat. Bár volt korábbi bizonyítékunk arra vonatkozóan, hogy a miR-26b képes szabályozni a *SELP* expressziót hiperglikémiás sejtes környezetben [60], célunk volt megerősíteni a miR-26b és a *SELP* mRNS közötti funkcionális kapcsolatot szeptikus körülmények között is. Mivel az LPS alacsonyabb miR-26b szintet eredményezett a MEG-01 sejtekben, a fentiek igazolására specifikus miRNS mimic-et alkalmaztunk a miRNS „overexpresszáltatására” a *SELP* expresszió változásának vizsgálata érdekében (14. ábra; E). Azt tapasztaltuk, hogy a jelentős mértékben megemelt miR-26b expresszió ($p < 0,01$) jelenlétében szignifikánsan csökkent a *SELP* mRNS szintje ($p < 0,05$) a MEG-01 sejtekben összehasonlítva a NEG-01 mimic-kel kezelt kontroll mintákkal (14. ábra; F). Ezek az eredmények alátámasztják azt a tényt, hogy a miR-26b szorosan összefügg a *SELP* gén expresszióval, és a csökkent miR-26b hozzájárul az MK-k és a vérlemezkék *SELP* mRNS expressziójának emelkedéséhez szepszisben.

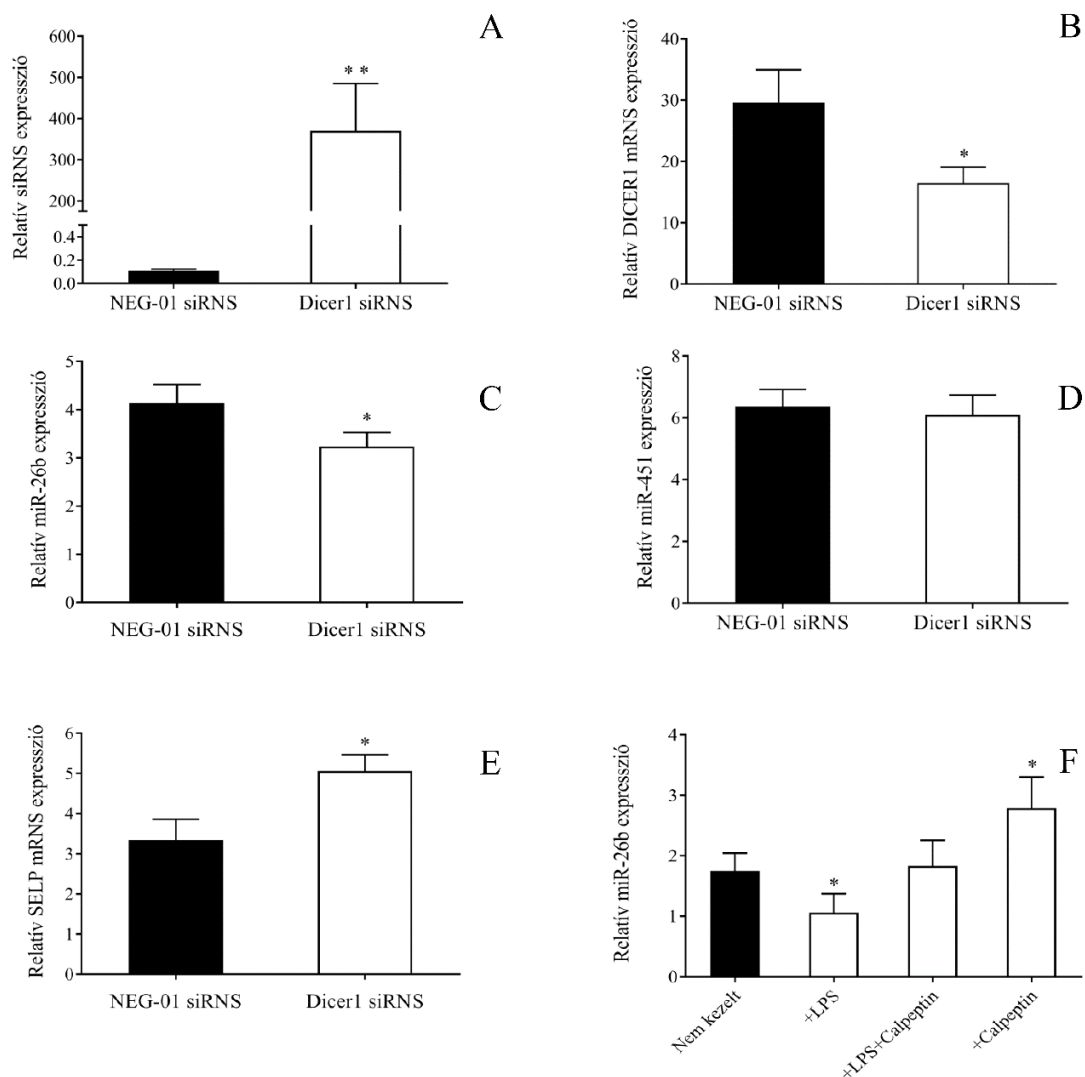
5.9 Szepszisben a csökkent Dicer1 fehérjeszint megváltozott miRNS expressziókat okoz a megakaryocytákban és a vérlemezkékben

A citoplazmában működő Dicer1 enzim regulálja a miRNS érési folyamatának utolsó lépését, ezért csökkent szintje/aktivitása jelentősen befolyásolhatja az érett miRNS-ek expresszióját, ahogy ezt diabetes mellitusban is tapasztaltuk már [60]. Jelen kísérleteinkben a Dicer1 enzim fehérjeszintjét először szeptikus betegekből és egészséges kontrollokból izolált vérlemezke mintákban analizáltuk Western-blot technikával. A szeptikus betegek thrombocyta mintáiban jelentősen alacsonyabb Dicer1 fehérje szintet ($p < 0,05$) detektáltunk a kontrollokhöz képest. (15. ábra; A). Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálattal hasonló eredményt figyeltünk meg a MEG-01 sejtekben, miszerint az LPS-sel kezelt sejtek jelentősen kisebb Dicer1 pozitivitást ($p < 0,001$) mutattak a nem kezelt mintákhoz képest (15. ábra; B és C).



15. ábra A Dicer1 enzim fehérjeszintjének vizsgálata szeptikus vérlemezke lizátumokban és LPS-sel kezelt MEG-01 sejtek mintáiban. Először szeptikus vérlemezkek ($n = 5$) Dicer1 fehérje szintjét vizsgáltuk Western-blot technikával (A). A szeptikus vérlemezke mintákban szignifikánsan alacsonyabb Dicer1 fehérjeszintet detektáltunk. Ezt követően a MEG-01 sejtekben a Dicer1 pozitivitást intracellulárisan vizsgáltuk fluoreszcens mikroszkóppal, melyek az LPS kezelés után csökkent fluoreszcencia intenzitást mutattak a nem kezelt mintákhoz képest (B). A sejtmag/citoszol Dicer1 fluoreszcencia intenzitásának arányát elemeztük ($n = 15/\text{kísérlet}$) (C). Zöld: Dicer1 festés; kék: sejtmagok. Skála mérete: 20 μm . Átlag $\pm$ SEM-et ábrázoltunk. Az összehasonlításához Mann-Whitney U-tesztet használtunk. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs nem kezelt kontroll minták.

Ezt követően tovább vizsgáltuk a kóros Dicer1 fehérjeszintnek az érett miR-26b-re gyakorolt hatását szepszisben. Ahhoz, hogy modellezzük a szepszisben megváltozó Dicer1 szintet, siRNS segítségével csendesítettük a Dicer1 expresszióját MEG-01 sejtekben és a calpain specifikus gátlásával, calpeptinnel gátoltuk a Dicer hasítását. A csendesítés érdekében a MEG-01 sejtekbe 24 órán keresztül Dicer1 specifikus siRNS-t transzfektáltunk. A transzfekció hatékonyságát RT-qPCR módszerrel ellenőriztük. A kezelés eredményeként a Dicer siRNS expressziója jelentősen megemelkedett, ami azt jelenti, hogy az siRNS sikeresen bejutott a sejtekbe (16. ábra; A). Az siRNS transzfekció alacsonyabb DICER1 mRNS expressziót eredményezett a kontroll mintákhoz képest (16. ábra; B). Ennek következtében a miR-26b szignifikánsan csökkent ($p < 0,05$) (16. ábra; C), míg a SELP mRNS expressziója emelkedést mutatott ($p < 0,05$) (16. ábra; E). Ezzel párhuzamosan mértük a Dicer1 független miR-451 expresszióját is és ennek szintje nem változott a kontroll mintákhoz képest (16. ábra; D). Annak érdekében, hogy tovább vizsgáljuk, hogy az alacsonyabb Dicer1 szint csökkent thrombocyta miRNS expressziót okoz, a MEG-01 sejtekhez calpeptint adtunk, ami gátolta a megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció által kiváltott calpain-funkciót az LPS vagy a TNF- α kezelés hatására [97]. Amikor a calpain működését gátoltuk és a Dicer1 enzim hasítását a calpeptin megakadályozta LPS jelenlétében (16. ábra; F), az érett miR-26b szint rendeződött a MEG-01 sejtekben. Ezek az adatok alátámasztották azon hipotézisünket, hogy a kóros Dicer1 enzim aktivitás/szint a szepszisben csökkenti a miRNS-ek, így pl. a miR-26b expressziót mind a vérlemezékben, mind a megakaryocytákban.

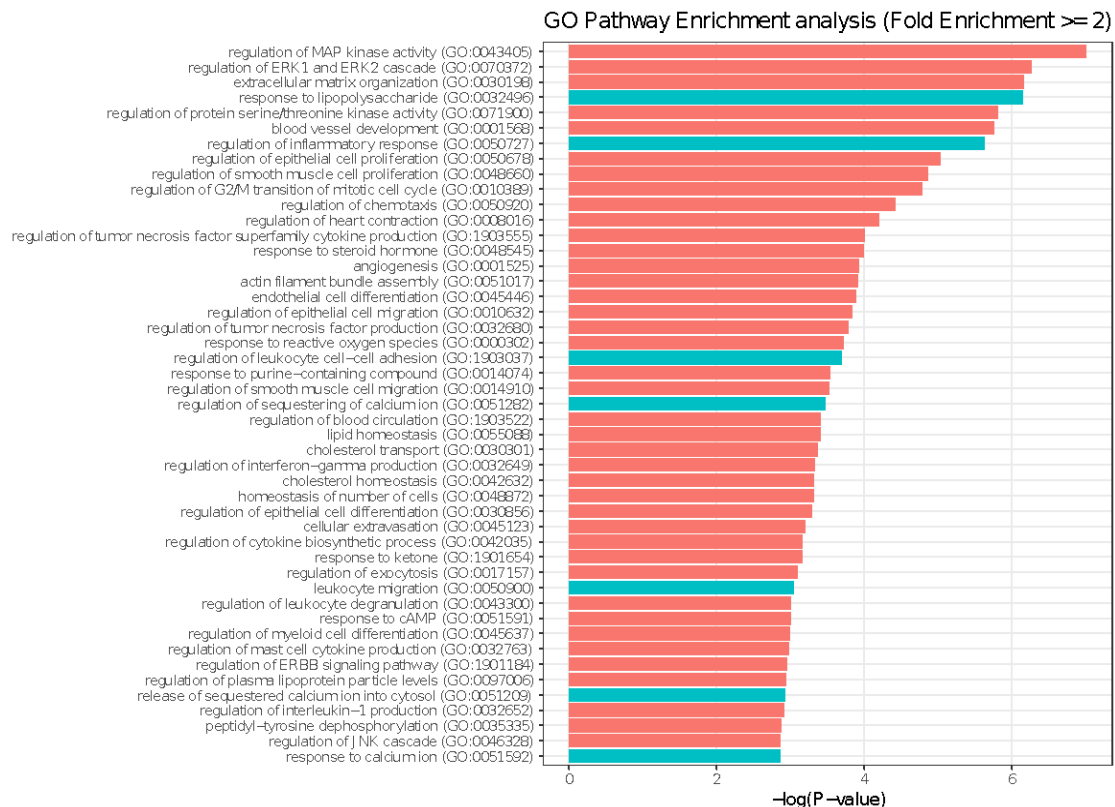


16. ábra A Dicer1 enzim funkcionális szerepének vizsgálata sepsziszes körülmények között a miR-26b expresszió kialakításában. Annak érdekében, hogy modellezzük a sepszis során megváltozott Dicer1 enzim szint hatását a miRNS-ekre, a *DICER1* génexpressziót siRNS transzfekcióval csökkentettük MEG-01 sejtekben. A Dicer1 specifikus siRNS-t sikeresen transzfektáltuk. RT-qPCR (A) módszerrel emelkedett Dicer1 siRNS expressziót mértünk, ami csökkent DICER1 mRNA expressziót eredményezett a NEG-01 siRNS-sel transzfektált kontroll sejtekhez képest (B). Ezekben a sejtekben csökkent a miR-26b (C) és emelkedett a SELP mRNA expressziója (E). A Dicer1-független miR-451 expressziója nem változott (D). Ezután a calpeptin gátoltuk calpeptinnel MEG-01 sejtekben. A calpeptin szignifikánsan kompenzálta a miR-26b (F) szintjét, amikor LPS kezelést alkalmaztunk, ami arra utal, hogy a kóros Dicer1 funkció szerepet játszik a sepszis indukálta miRNS expresszió változásban. Átlag $\pm$ SEM értéket ábrázoltunk. ($n = 4-6$ /kísérlet). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs NEG-01 siRNS-sel kezelt vagy nem kezelt minták. Az összehasonlításhoz Mann-Whitney U-tesztet vagy t-próbát használtunk.

5.10. Az LPS-indukálta gének ontológiai elemzése MEG-01 sejtekben

A MEG-01 sejtekben a sepsztikus körülmények között bekövetkezett génexpresszió változások hatását tovább vizsgáltuk, hogy jobban megértsük milyen

útvonalak aktiválódnak és milyen intracelluláris folyamatok játszódnak le szepszis során. Ennek érdekében a megváltozott expressziójú gének útvonalának elemzésével, gén ontológiai analízist végeztünk. Azt tapasztaltuk, hogy az LPS kezelés szignifikánsan befolyásolta azokat a géneket, amelyek számos gyulladásos útvonal aktiválásával jártak együtt, ideértve a TNF- α -ra, az IL-1 β -ra és az LPS-re adott sejtválaszokat, valamint a fehérvérsejt migrációval és kemotaxisal járó génváltozásokat (17. ábra). A MK-ban a TLR4 agonistára adott fontos válaszreakciók közé tartoztak többek között a lipidek homeosztázisához, az angiogenezishez, a MAPK, ERK1 és ERK2, valamint a JNK mediálta jelátviteli útvonalakhoz köthető génváltozások. Fontos, hogy a SELP mRNS, amelynek expressziója a MEG-01-ben jelentős emelkedést mutatott az LPS kezelés hatására (14. ábra; B, C), több különböző útvonalban is szerepet játszhat, amelyeket a 17. ábrán láthatunk. Ide tartoznak az LPS-re és a gyulladásos triggerekre, a fehérvérsejt-adhézióra és a migrációra adott válaszok is. Összeségében a TLR4-függő szignálútrendszer lényegesen módosíthatja a gének expresszióját az MK-ban [20]. Ezek az eredmények azt is alátámasztották, hogy a P-szelektin fehérjereceptort kódoló *SELP* génnek központi szerepe lehet az MK gyulladásos szignalizációjának szabályozásában a szepszis során.



17. ábra: A TLR4 mediálta szignálútvonak gén ontológiai elemzése az LPS-stimulált MEG-01 sejtekben. Az LPS kezelés szignifikánsan befolyásolta azokat a géneket, amelyek számos gyulladásos útvonat aktiválásával jártak együtt, ideértve a TNF- α -ra, az IL-1 β -ra és az LPS-re adott sejtválaszokat, valamint a fehérvérsejt migrációval és kemotaxisal járó génváltozásokat. A MK-ban a TLR4 agonistára adott fontos válaszreakciók közé tartoztak többek között a lipidek homeosztázisához, az angiogenezishez, a MAPK, ERK1 és ERK2, valamint a JNK mediálta jelátviteli útvonalakhoz köthető génváltozások. A SELP mRNS, amelynek expressziója a MEG-01-ben jelentős emelkedést mutatott az LPS kezelés hatására, több különböző útvonatban is szerepet játszhat (zölden jelölve). Ide tartoznak az LPS-re, a gyulladásos triggerekre, a fehérvérsejt-adhézióra és a sejt migrációra adott válaszreakciók is.

5.11 Szepszisben a vérlemezkek miR-223 expressziója csökkent, míg a plazmában és a thrombocyta mikropartikulákban jelentősen magasabb

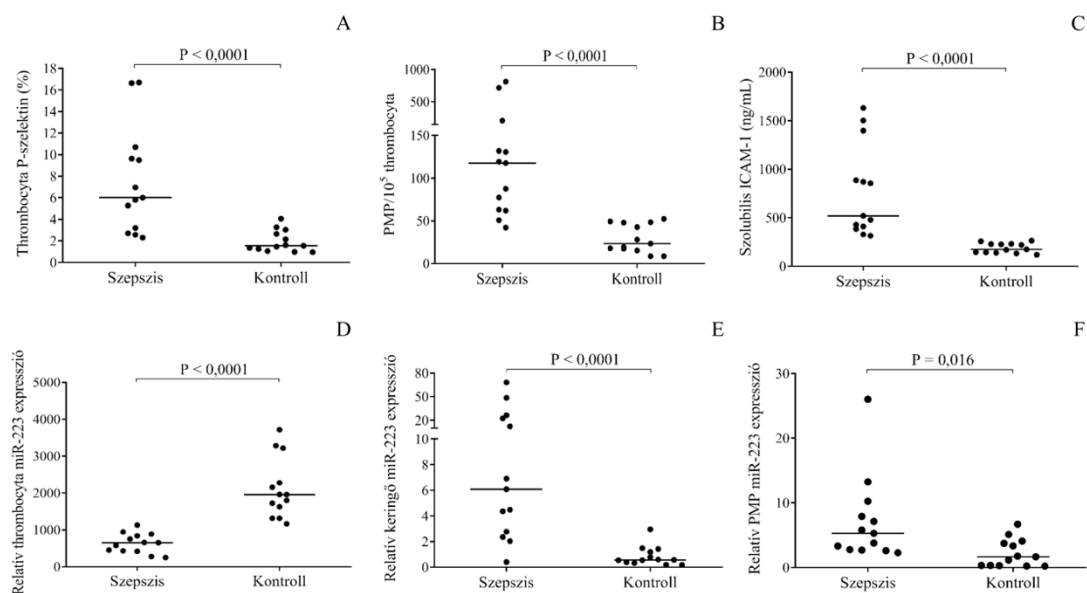
A disszertáció alapját jelentő másik vizsgálatunkba 13 szeptikus beteget és kontrollként 13 korban és nemben illesztett egészséges személyt válogattunk be. A fő demográfiai paramétereket a 4. táblázat foglalja össze. Szeptikus betegeknél a fehérvérsejtszám emelkedett, míg a vérlemezkeszám csökkent a kontrollokhoz képest ($p < 0,01$). Emellett - a vártak megfelelően – rendkívül magasak voltak a szérumban mérhető CRP és PCT szintek a szeptikus betegeknél, melyek súlyos gyulladást jeleztek. A két csoport között nem volt szignifikáns különbség a thrombocyta-gátló terápia használatában: 10 szeptikus beteg kapott aspirint vagy clopidogrelt, míg a szív- és érrendszeri betegségek megelőzésére 9 kontroll egyén szedett ilyen gyógyszert (4. táblázat).

Paraméterek	Szeptikus betegek (n=13)	Kontrollok (n=13)	p-érték
Kor (év)	57 (42-81)	54 (43-60)	n.s.
Nem (férfi/nő)	10/3	8/5	n.s.
Fehérvérsejtszám (G/L)	14,5 $\pm$ 6,8	8,0 $\pm$ 1,9	$p < 0,01$
Thrombocytaszám (G/L)	176 (150-241)	297 (251-353)	$p < 0,01$
Szérum CRP (mg/L)	230,0 $\pm$ 109,7	1,44 $\pm$ 0,9	$p < 0,001$
Szérum PCT (μ g/L)	17,0 $\pm$ 9,4	n/a	-
SOFA-score	12 (11-14)	n/a	-
Gram pozitív baktérium (n)	4	n/a	-
Gram negatív baktérium (n)	7	n/a	-
Ismeretlen infekció (n)	2	n/a	-
Szepszis/szeptikus sokk (n)	5/8	n/a	-
Túlélő/nem túlélő (n)	3/10	n/a	-
Thrombocyta gátló terápia (n)	10	9	n.s.

4. táblázat A szeptikus betegek és kontrollok demográfiai és főbb klinikai jellemzőinek összefoglaló táblázata. A betegség súlyosságának megítélésére SOFA-score került meghatározásra. Az eredményeket átlag $\pm$ SEM-ben vagy medián interkvartilis tartomány (IQR)

formában fejeztük ki. Párosítatlan *t*-próbát vagy Mann-Whitney U-tesztet és összehasonlítás céljából Chi-négyzet tesztet végeztünk. CRP: C-reaktív fehérje; PCT: prokalcitonin; n.s.: nem szignifikáns; n/a.: nem elérhető adat.

Először a vérlemezkek aktivációs állapotát elemeztük felszíni P-szelektin expresszió mérésével áramlási citometriával [11]. A dolgozatom első részében bemutatott eredményekhez [98] hasonlóan, a thrombocyta P-szelektin pozitivitás jelentősen megnőtt a szeptikus thrombocyta felszínén a kontrollokhoz képest (6,1 [3,0–10,2] vs. 1,5 [1,1–2,8] %; $p < 0,0001$) (18. ábra; A). Ezt követően analizáltuk a mikropartikulák mennyiségét a szeptikus és a kontroll plazma mintákban áramlási citométer segítségével. Azt tapasztaltuk, hogy szeptikusban a mikropartikulák száma szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll mintákban [117 (62–171) vs. 23 (16–48)/ 10^5 vérlemezke; $p < 0,0001$] (18. ábra; B), amely szintén a vérlemezkek fokozott aktiváltsági állapotát jelezte szeptikusban. Ezzel párhuzamosan meghatároztuk a szolubilis ICAM-1 szintet szeptikus és kontroll szérum mintákban, hogy megvizsgáljuk az endothelsejtekt aktivációjának mértékét [77]. Szeptikusban az ICAM-1 fehérje koncentrációja jelentősen emelkedett volt [519 (397–1142) vs. 174 (141–229) ng/mL; $p < 0,0001$] (18. ábra; C). Ezen eredmények alapján a vizsgált szeptikus betegekben nemcsak thrombocyta, hanem endothelsejt aktiváció is kimutatható volt.

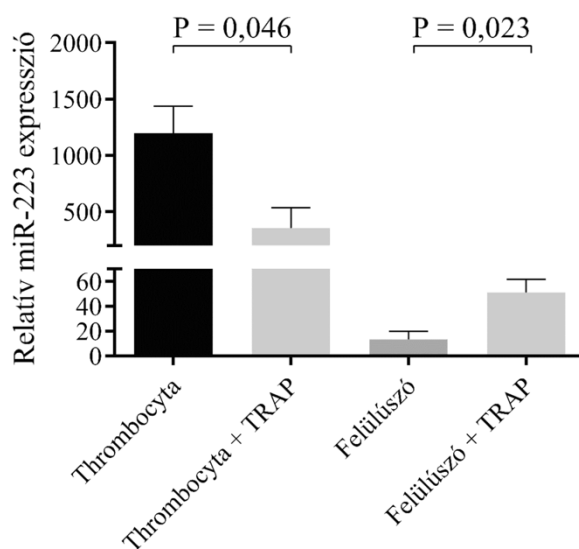


18. ábra Vérlemezke és endothelsejt aktiváció vizsgálata szeptikus és kontroll egyének mintáiban. A felszíni P-szelektin pozitivitás (A), a thrombocyta-eredetű mikropartikulák (PMP) (B) és a szolubilis ICAM-1 koncentrációja (C) jelentősen magasabb volt a szeptikus betegek mintáiban, mint a kontrollokban ($n = 13$ /csoport). A vérlemezke miR-223 expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt szeptikusban (D), azonban a plazma (E) és a mikropartikula

minták (F) magasabb miR-223 szintet mutattak a kontrollokhoz képest. A pontok 1-1 minta eredményét, a vízszintes vonalak a medián értéket jelölik. Az elemzéshez Mann-Whitney U-tesztet használtunk.

A miR-223 expresszióját RT-qPCR módszerrel vizsgáltuk a vérlemezkékben, a plazmamintában és az izolált mikropartikulák mintájában. Megállapítottuk, hogy a miR-223 expresszió a szepszises vérlemezkékben a kontrollokhoz képest alacsonyabb volt ($p < 0,0001$) (18. ábra; D), míg a keringő miR-223 expressziója szignifikánsan magasabb volt a plazma mintákban ($p < 0,0001$) (18. ábra; E) és a mikropartikulákban ($p < 0,016$) (18. ábra; F). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az alacsonyabb vérlemezke miR-223 expresszió egyik oka lehet az aktiváció során megvalósuló fokozott mikropartikula képződés és ez által az adott miRNS-nek a környezetbe történő kiszabadulása súlyos gyulladásos körülmények között.

Annak érdekében, hogy bizonyítsuk a szeptikus vérlemezkékből származó miR-223 kijutását a thrombocytaiból, *in vitro* kísérleteket végeztünk. A kontroll LDP mintákat TRAP-al aktiváltuk 2 órán keresztül, majd a thrombocyta felülúszóból és a pellet-ből mértük le a miR-223 expressziót. A TRAP-aktivált vérlemezkékben a miR-223 expresszió szintje szignifikánsan csökkent a nem kezelt mintával szemben ($p = 0,046$), míg a felülúszóban magasabb miR-223 szintet figyeltünk meg ($p = 0,023$) a kezelés után (19. ábra). Ezen eredmények alapján azt gondoljuk, hogy a vérlemezke aktiváció a thrombocyta miRNS-ek jelentős externalizációját eredményezi szepszisben és a kiszabadult miRNS-ek - mint vektorok - különböző információkat közvetíthetnek a környezetükbe.

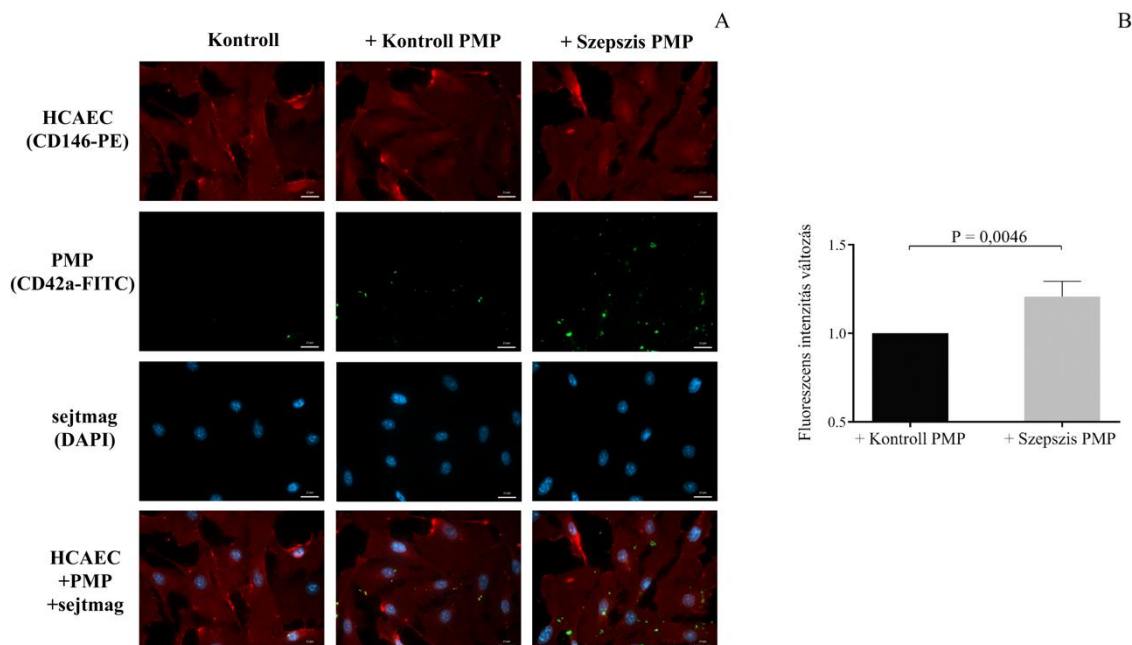


19. ábra A miR-223 expresszió kvantálása vérlemezkékben és a felülúszó mintákban TRAP-pal történt *in vitro* sejtaktiváció előtt és után. Az izolált vérlemezkéket TRAP-pal (40 μ mol/L) stimuláltuk 2 órán keresztül. A vérlemezkéket ezután centrifugáltuk és a vérlemezke pellet-ből és a felülúszóból miR-223 expressziót mértünk. A stimuláció után a vérlemezkék (világosszürke oszlop) csökkent miR-223 szintet mutattak a nem aktivált vérlemezkékhez (fekete oszlop) képest. A felülúszókban ezzel szemben emelkedett miR-223 szinteket detektáltunk a TRAP-pal aktivált mintában (szürke oszlop) ($n = 7-8$ minta/kísérlet). Átlag $\pm$ SEM értéket ábrázoltunk. Az összehasonlításhoz Mann-Whitney U tesztet használtunk.

5.12 A szepszis eredetű mikropartikulák internalizációja az endothelsejtekbe

A vaszkuláris endothelium a véráram útján keringő mikrovezikulák egyik legfontosabb célpontja a szív- és érrendszeri, valamint a gyulladásos megbetegedésekben [75], ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy szepszisben a miRNS transzfer a vérlemezkéből a mikropartikulákon keresztül az endothelsejtekbe vajon nagyobb mértékben valósul-e meg. Erre a célra a HCAEC sejteket szeptikus betegekből, illetve kontroll egyénekből izolált mikropartikulákkal 24 órán keresztül 37°C-on kezeltük. A HCAEC sejteket anti-CD146-PE antitesttel, a vérlemezke-eredetű mikropartikulákat pedig anti-CD42a-FITC (GPIX-receptor specifikus) antitesttel jelöltük.

A mikropartikulákat intracellulárisan detektáltuk a HCAEC sejtekben. Azt tapasztaltuk, hogy a szepszises mikropartikulákkal együtt tenyésztett endothelsejtekben magasabb volt a zöld fluoreszcencia intenzitás a normál mikropartikulákkal kezelt sejtekhez képest (20. ábra; A). A negatív kontroll minták esetén a HCAEC sejtekhez nem adtunk mikropartikulát, így ott anti-CD42a-FITC pozitivitás nem volt megfigyelhető. Ezen kívül statisztikailag elemeztük az összes analizált mintában a fluoreszcencia intenzitás különbségét a szepszises és a kontroll mikropartikulákkal kezelt sejtekben, és szignifikáns különbséget ($p = 0,0046$) találtunk a két csoport között (20. ábra; B). Ezen eredményeink azt mutatják, hogy a szepszisben termelődő vérlemezke mikropartikulák fokozottabban jutnak be az endothelsejtekbe, mint az egészséges mintákból származóak.



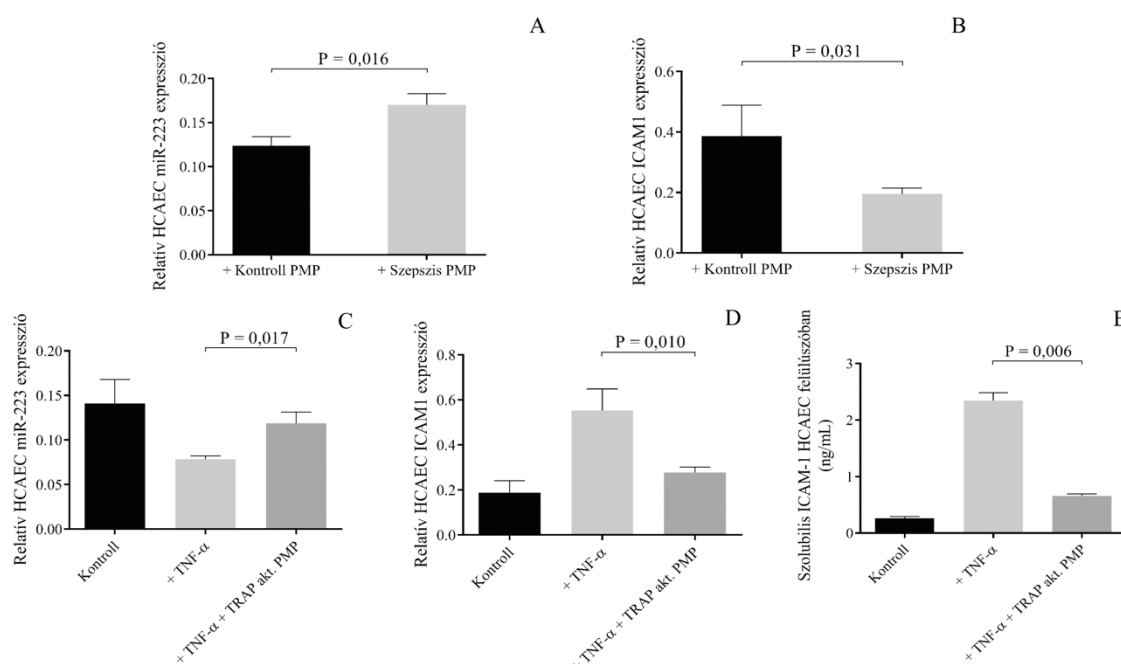
20. ábra Vérlemezke-eredetű mikropartikulák endothelsejtekbe történő internalizációjának vizsgálata. Az endothelsejteket (HCAEC) szepszises és kontroll vérlemezkéből származó mikropartikulákkal (PMP) inkubáltuk 24 óráig 37°C-on, majd a HCAEC-sejteket anti-CD146-PE antitesttel (piros), a mikropartikulákat anti-CD42a-FITC antitesttel (zöld) festettük. A mikropartikulák internalizációját fluoreszcens mikroszkóppal (A) vizsgáltuk. Kék színnel megfestve a sejtmagok láthatók. Azokban a mintákban, amelyekhez szepszis eredetű mikropartikulákat adtunk, szignifikánsan magasabb fluoreszcencia intenzitásváltozást detektáltunk, mint a kontroll mikropartikulákkal kezelt mintákban (B). Skála mérete: 20 μ m. ($n = 5-6$ sejt/kísérlet). Átlag $\pm$ SEM értéket ábrázoltunk. Az összehasonlításhoz Mann-Whitney U tesztet használtunk.

5.13 A magas miR-223 tartalmú mikropartikulák képesek csökkenteni az indukált ICAM-1 receptor expressziót a HCAEC sejteken gyulladásos körülmények között

Szerettük volna tovább vizsgálni a mikropartikulák funkcionális hatását szepszisben, hogy vajon az általuk szállított nagyobb mennyiségű miR-223 képes-e befolyásolni az endothelsejtek működését. Ezért a HCAEC sejteket először izolált szepszises mikropartikulákkal inkubáltuk 24 óráig és az endothelsejtekben emelkedett miR-223 expressziót találtunk ($p = 0,016$) a kontroll PMP mintákkal kezelthez képest (21. ábra; A), ezzel szemben ezekben a mintákban az ICAM1 mRNS expressziója jelentősen csökkent ($p = 0,031$) (21. ábra; B). Ezen eredmények megerősítésére a HCAEC sejteket *in vitro* TRAP-aktivált vérlemezkéből izolált mikropartikulákkal kezeltük. Mivel szignifikánsan magasabb volt a plazma TNF- α szint a szepszisben szenvedő betegekben

a kontrollokhoz képest ($28,6 \pm 3,7$ vs. $12,4 \pm 1,1$ pg/mL, $p < 0,0001$), ezért a szeptikus körülményeket az endothelsejtek TNF- α stimulációjával modelleztük.

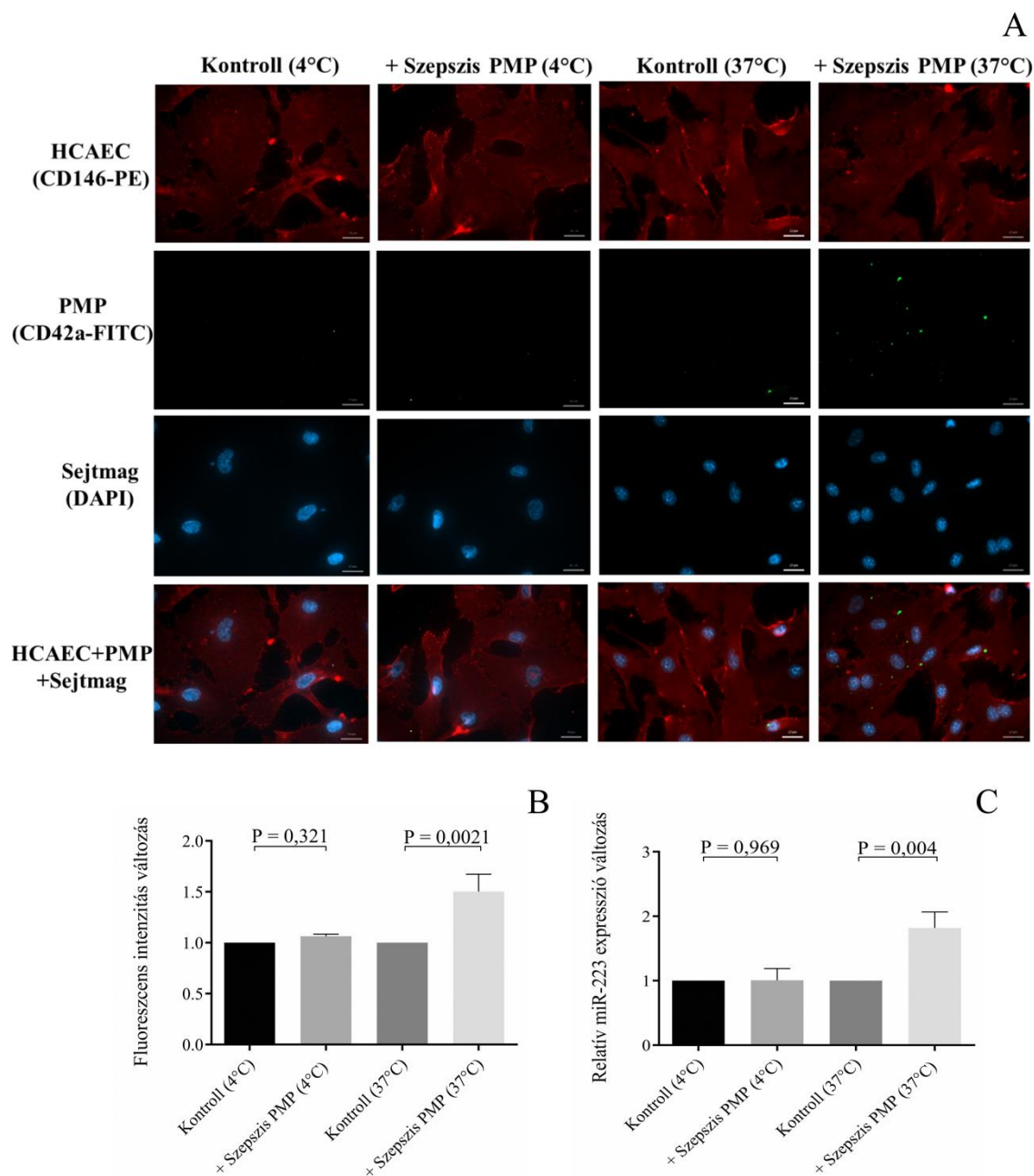
A TNF- α előkezelés csökkentette a miR-223 expresszióját és nöött az ICAM1 mRNS szint a kontroll HCAEC mintákhoz képest, míg az emelkedett miR-223-t ($p = 0,017$) csökkent ICAM1 mRNS expresszióval ($p = 0,010$) detektáltuk a TRAP-aktivált PMP-k jelenlétében (21. ábra; C és D). A szolubilis ICAM-1 koncentrációkat a HCAEC sejtek felülúszójában ELISA-val lemértük. A TNF- α hatására emelkedett az ICAM-1 fehérje mennyisége, míg a TNF- α és a mikropartikulák együttesen szignifikánsan csökkentették ($p = 0,006$) az ICAM-1 fehérje koncentrációját (21. ábra; E). Ezek az adatok azt hangsúlyozzák, hogy a miR-223-t szállító PMP-k képesek befolyásolni a túlzott fehérje/receptor expressziót az endothelsejtekben gyulladásos körülmények között.



21. ábra A nagyobb mennyiségű miR-223-t hordozó mikropartikulák szeptikus körülmények között jelentősen csökkentik az emelkedett ICAM-1 szintet HCAEC sejtekben. Megemelkedett miR-223 (A) és csökkent ICAM1 mRNS expressziót (B) találtunk szepszises vérlemezkékből származó mikropartikulák (szürke oszlopok) és a kontroll mikropartikulák (fekete oszlopok) által stimulált endothelsejtekben. A TNF- α önmagában (világosszürke oszlopok) alacsonyabb miR-223 és magasabb ICAM1 mRNS és fehérje szintet eredményezett. A TRAP által indukált mikropartikulák (sötétszürke oszlopok) jelenlétében emelkedett miR-223 (C) és csökkent ICAM1 mRNS (D) és fehérje szintet (E) találtunk. Átlag $\pm$ SEM-et tüntettük fel. ($n = 7-8$ minta/csoport). Az összehasonlításhoz Mann-Whitney U-tesztet vagy t-próbát használtunk.

5.14 A mikropartikulák internalizációjának gátlása megakadályozza az endothelsejtek miRNS expressziójának változását

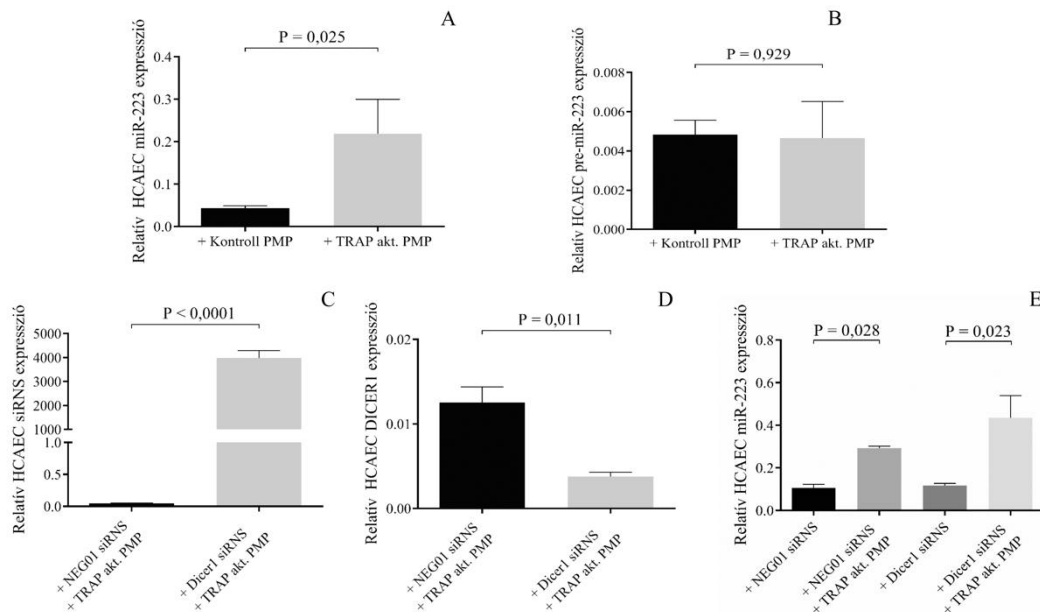
Annak megállapítására, hogy a megváltozott miR-223 expresszió ténylegesen összefügg a mikropartikulák endothelsejtekbe történő internalizációjával és miRNS „transzfekciójával”, a HCAEC sejteket 4°C-on inkubáltuk a szepszises plazma mintákból kinyert mikropartikulákkal, vagy anélkül (kontroll) azért, hogy megakadályozzuk a PMP-k endocitózisát hasonlóan, mint korábban mások ezt alkalmazták [93]. Kontrollként az endothelsejteket egyidejűleg 37°C-on mikropartikulával vagy anélkül tenyésztettünk. A HCAEC sejteket és a mikropartikulákat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk a korábban leírtak szerint. A fluoreszcens jelölés azt mutatta, hogy a szepszises mikropartikulák HCAEC-be történő felvétele jégen (4°C-on) szinte teljesen gátolt volt a 37°C-on inkubált sejtekhez képest (22. ábra; A és B). Ezzel szemben 37°C-on jelentősen emelkedett a HCAEC sejtekbe jutott mikropartikulák mennyisége. A 4°C-on történő blokkolós vizsgálathoz 6 órás mikropartikula kezelést alkalmaztunk, mivel az endothelsejtek 6 óránál hosszabb ideig, jégen történő kezelése szembetűnő morfológiai változásokon mentek keresztül, amelyek befolyásolták volna a mikropartikulák internalizációját. Ezen kívül a HCAEC sejtekből össz- RNS-t izoláltunk a miR-223 kvantálásához. Megállapítottuk, hogy a jégen tartott HCAEC mintákban nem következett be jelentős miRNS expresszió változás ($p = 0,969$), míg a szepszises mikropartikulával inkubált sejtek normál sejttenyésztési körülmények között megemelkedett miR-223 értéket mutattak a kontroll mintákhoz képest ($p = 0,004$) (22. ábra; C). Ezek az eredmények megerősítik, hogy a megnövekedett miR-223 expressziót a HCAEC-ekben közvetlenül a miRNS-t hordozó mikropartikulák endocitózisa okozta.



22. ábra: A mikropartikulák internalizációjának gátlása megakadályozza az endothelsejt miR-223 expressziójának változását. A HCAEC sejteket thrombocyta eredetű mikropartikulákkal inkubáltuk jégen (4°C-on) 6 órán keresztül, hogy megakadályozzuk a mikropartikulák endocitózisát. Ezzel párhuzamosan az endothelsejteket 37°C-on mikropartikulával együtt vagy anélkül (kontroll) tenyésztettük. Az endothelsejteket anti-CD146-PE antitesttel (piros) festettük, a mikropartikulákat pedig anti-CD42a-FITC antitesttel (zöld). A mintákat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk és azt tapasztaltuk, hogy a mikropartikulák felvételét gátolta az alacsony hőmérséklet (A, B). Kék: sejtmagok. A sejteket összegyűjtöttük és RT-qPCR módszerrel mértük a miR-223 expressziót. A 4°C-on tartott mintákban a miRNS expresszió nem változott, míg a 37°C-on tartott sejtek megemelkedett miR-223 expressziót mutattak a mikropartikulák nélküli kontroll mintákhoz képest (C). Skála mérete: 20 µm. Az eredményeket átlag ± SEM-ben fejeztük ki. ($n = 4-5$ minta/körülmény). Az összehasonlításhoz Mann-Whitney U-tesztet, illetve t-tesztet használtunk.

5.15 A mikropartikulák által megváltoztatott endothelsejt miR-223 expresszió nem az emelkedett Dicer1 enzim szint következménye a HCAEC sejtekben

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a miRNS-ek működésével összefüggésbe hozható más sejtes folyamatok hozzájárultak-e bármilyen mértékben a szepszises mikropartikulával kezelt HCAEC sejtekben a miR-223 expressziójának fokozásához. Ebből a célból két *in vitro* kísérleti megközelítést alkalmaztunk. Célunk volt a pre-miR-223 expressziójának elemzése az *in vitro* TRAP-stimulált PMP-k jelenlétében vagy hiányában. A Dicer1 enzim expressziójának és ezáltal funkciójának csökkentése a HCAEC sejtekben Dicer1 specifikus siRNS transzfektálással a PMP-vel történő inkubáció előtt történt. Először az érett és a pre-miR-223 expressziókat párhuzamosan kvantáltuk RT-qPCR módszerrel TRAP-aktivált PMP-vel kezelt és nem kezelt HCAEC sejtekben. A miR-223 érett formájának expressziója szignifikánsan ($p = 0,025$) emelkedett a TRAP-aktivált PMP-vel kezelt mintákban, míg a pre-miR-223 expressziójában nem volt különbség, tehát nem történt transzkripció ($p = 0,929$) (23. ábra; A és B). Ezt követően az endothelsejteket Dicer1 siRNS-sel vagy NEG01 siRNS-sel transzfektáltuk és izolált PMP-ket adtunk a sejtekhez 24 óráig. Az RNS izolálás után ellenőriztük a transzekció hatékonyságát (23. ábra; C). A transzekció alacsonyabb DICER1 mRNS-t eredményezett a NEG01 siRNS-sel kezelt mintákhoz képest (23. ábra; D). Azokban a sejtekben, amelyekben a Dicer1 expresszióját moduláltuk, az érett miR-223 szint még mindig jelentősen megemelkedett ($p = 0,023$) a PMP-k jelenlétében a HCAEC sejtekben (24. ábra; E). A megnövekedett miR-223 szint a miRNS PMP-k általi bejuttatásának volt köszönhető és semmilyen miRNS transzkripció vagy indukált Dicer1 enzim aktivitás nem járult hozzá a szeptikus endothelsejtek megváltozott miR-223 expressziójához.



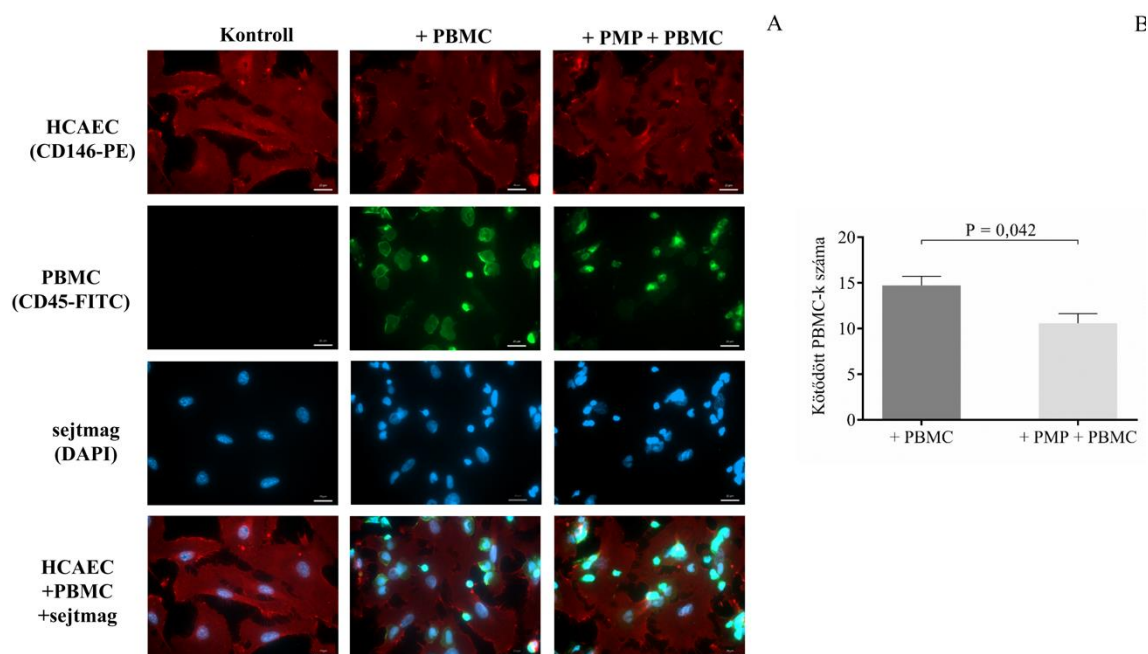
23. ábra A PMP-k által modulált miR-223 expresszióban a miRNS érés vagy a fokozott Dicer1 enzim funkció esetleges szerepének vizsgálata a HCAEC sejtekben. A TRAP aktivált thrombocytákból származó PMP-k (szürke oszlopok) jelenlétében magasabb lett a miR-223 expresszió az endothelsejtekben (HCAEC) a kontroll PMP-vel kezelt mintákhoz képest (fekete oszlop) (A). Nem találtunk különbséget a pre-miR-223 expressziójában a két csoport között (B). A Dicer1 specifikus siRNS-t sikeresen transzfektáltuk az endothelsejtekbe (C), ami csökkent Dicer1 mRNA (D) expressziót eredményezett. A csökkent Dicer1 expresszió ellenére a miR-223 szint továbbra is szignifikánsan emelkedett a TRAP-aktivált PMP-k jelenlétében az endothelsejtekben összehasonlítva a PMP nélküli (E) mintákkal. Átlag $\pm$ SEM értéket ábrázoltunk. ($n = 4-5$ minta/kísérlet). Az összehasonlításhoz Mann-Whitney U-tesztet, illetve t-próbát alkalmaztunk.

5.16 A szepszis eredetű PMP-vel történő kezelés után csökken a leukocyták adhézioja az endothelsejtek felszínéhez

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a miR-223 tartalmú PMP-k bejutása az endothelsejtekbe csökkentheti-e a leukocyták adhézioját septicus körülményekben az alacsonyabb ICAM-1 expresszió mellett. Ebben a kísérletben a HCAEC sejteket $\text{TNF-}\alpha$ aktivált és nem aktivált PBMC-vel inkubáltuk 1 órán át. A PBMC-k hozzáadása előtt szepszises PMP-vel kezeltük, illetve PMP nélkül tenyésztettük a sejteket 24 órán keresztül.

A negatív kontroll sejteket PBMC hozzáadása nélkül tartottuk fenn. A HCAEC sejteket anti-CD146-PE antitesttel jelöltük, míg a PBMC-ket anti-CD45-FITC antitesttel jelöltük. Fluoreszcens mikroszkóppal értékeltük a festett leukocytákat. Megállapítottuk, hogy a PBMC-k az endothelsejtek felszínéhez kapcsolódtak és ez 30%-kal csökkent

abban az esetben, ha PMP-ket adtunk a HCAEC sejtekhez (24. ábra; A). A szepsziszből származó PMP-k nélküli előkezeléskor kötődött PBMC-k száma látóterenként 14 ± 2 sejt volt, szemben a PMP-vel előkezelt mintákkal, ahol 10 ± 2 sejt/látómező volt (24. ábra; B). Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a PMP-k szállította miR-223 által csökkentett ICAM-1 receptor szint a leukocyták alacsonyabb mértékű kötődését vonta magával az endothelsejtek felszínén.



24. ábra A PBMC-k csökkent adhéziójának vizsgálata az endothelsejtekhez a szepszisz eredetű PMP-vel történő kezelés után. A HCAEC sejteket előkezeltük szepsziszis thrombocytákból származó PMP-vel. A sejteket ezt követően 1 órán át TNF- α aktivált PBMC-vel inkubáltuk. Az endothelsejteket anti-CD146-PE antitesttel (piros) és a PBMC-ket anti-CD45-FITC antitesttel (zöld) festettük. A PBMC-k adhézióját az endothelsejtek felületéhez fluoreszcens mikroszkóppal (A) vizsgáltuk. Kék: sejtmagok. Kevesebb adhezív PBMC detektálható a PMP-vel előkezelt sejtekben a nem kezelt sejtekhez képest (B). Skála méret: 20 μ m. Az eredményeket átlag $\pm$ SEM-ben fejeztük ki. Az összehasonlításhoz Mann-Whitney U-tesztet használtunk. ($n = 5$ -6 sejt/ állapot).

6. Megbeszélés

A szervezet különféle ingerekre túlzott mértékben fejthet ki szisztémás válaszüreakciót. Amennyiben ez fertőzés miatt alakul ki, szepszisnek nevezzük, aminek számos vaszkuláris, metabolikus és celluláris rendellenesség, sőt esetenként extrém mennyiségű citokin termelődés és felszabadulás (ún. citokin-vihar) lehet a következménye [1, 99]. A szepszises folyamatok által indukált kiterjedt endothelsejt aktiváció és károsodás vaszkuláris gyulladással és fokozott permeabilitással, míg a thrombocyták túlzott aktiválódása hemosztázis zavarral és thrombotikus komplikációkkal járhat együtt [100]. Az aktivált vérlemezkék nemcsak a thrombusképződés elősegítésében játszanak fontos szerepet, hanem mikrovezikulák és számos bioaktív anyag (pl. ADP, citokinek, kemokinek stb.) szekretálásával közvetlenül befolyásolják a szív- és érrendszer sejtjeinek funkcióit [4]. Habár a thrombocyták sejtmaggal nem rendelkeznek, az MK-eredetű RNS-ek nagy készletét hordozzák magukban és juttatják el más sejtekhez bizonyos stimulusok hatására [43, 49].

A gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokban kulcsszerepet játszó TLR-ek közül a TLR4 receptor is megtalálható mind a thrombocytákban, mind az MK-k felszínén [17, 20]. Szepszisben a thrombocyták az LPS képes direkt módon stimulálni a TLR4-en keresztül a keringésben, ami más vérlemezke agonisták által kiváltott sejtaktiváció potenciózását jelenti [95, 101]. Ezért a TLR4 receptornak fontos szerepe van a thrombocyták szepszisben bekövetkező fenotípusának és abnormális működésének kialakításában [21]. Ezen felül a TLR2 receptoron keresztül indukálódó intracelluláris folyamatok szabályozzák az MK-k működését is, ami kihat az MK-thrombocyta vonal működésére, így pl. fokozott GPIb és COX-2 fehérje expressziót okozva [19]. Ugyanakkor a TLR4-mediálta MK funkció eltérésekről és annak thrombocytákban észlelhető következményeiről még kevés információ áll rendelkezésre. Két korábbi vizsgálat során, amikor egereket 1 hétig alacsony szubletális dózisu LPS-nek tettek ki, az *ex vivo* thrombocyták az idő előrehaladtával fokozatosan növekvő aktivációt mutattak, ami emelkedő felszíni P-szelektin pozitivitást és nagyobb aggregációs hajlamot jelentett. Mindezt a szerzők az LPS MK-ra kifejtett direkt hatásának és az ezáltal megváltozott funkciójú új keringő vérlemezkéknek tulajdonították [102, 103]. Összességében minden olyan trigger, amely az MK-t érinti a csontvelőben, a thrombocyták „előaktivált”,

prothrombotikus fenotípusát eredményezheti szepszisben, ami a vér nagyobb prokoaguláns aktivitásához is vezethet [4, 20, 95, 98].

Az elmúlt években a miRNS-ek potenciális szerepe a tudományos érdeklődés középpontjába került mind a thrombocyta, mind az MK-k működésének vonatkozásában [60, 62, 63, 104]. A közelmúltban került publikálásra, hogy a thrombocyta miR-27b képes szabályozni a trombospondin-1 szintézisét [59], a miR-96 regulálja a vérlemezke szekréció szabályozásában közreműködő VAMP-8 protein expressziót [105], vagy a miR-15a modulálja a GPVI által közvetített α IIb β 3 integrin aktivációt és az α -granulum szekréciót az MK-ban [61]. Ugyanakkor számos vérlemezke fehérje/receptor expressziója esetében még nem ismert a miRNS-ek finomszabályozó szerepe.

A disszertáció alapját képező első vizsgálsorozatunkban ezért szeptikus betegektől izoláltunk nagy tisztaságú, fehérvérsejt-depletált thrombocyta mintákat, és első lépésként a miRNS-profilunkat analizáltuk. Először három szeptikus beteg és 3 kontroll személy random módon kiválasztott vérlemezke mintájában határoztuk meg a miRNS expressziókat TaqMan OpenArray módszer segítségével. Az egészséges személyekhez viszonyítva 121 miRNS csökkent, míg 61 fokozott mértékben expresszáldott a szeptikus vérlemezkekben. A szeptikus csoportban a fokozott thrombocyta aktiváció hátterében detektáltuk a fokozott *SELP* (P-szelektin) génexpresszióját szabályozó miR-26b csökkent expresszióját, mint ahogyan korábban diabeteses vérlemezke és hyperglikémiás MK sejt kultúrában tettük [60]. A miR-26b expressziója ráadásul jelentősen alacsonyabb volt azoknál a betegeknél, akiknél szeptikus sokk alakult ki, illetve szepszisben elhalálozott. Ezért ez a thrombocyta miRNS egy érzékeny új biomarkernek tűnik a szepszishoz társuló thrombocyta reaktivitás előrejelzésében úgy, mint a thrombocyta miR-223 és miR-146a koronáriabetegségben vagy diabetesben [106, 107]. Ezen túlmenően a perifériás vérsejtek miR-199b szintje jól korrelált a szepszis súlyosságával, míg az exoszomális miR-125b, valamint a plazma miR-150 előre jelezte a szepszis progresszióját [64, 108].

A szeptikus vérlemezkek a magas felszíni P-szelektin pozitivitás mellett szignifikánsan megnövekedett *SELP* mRNS expressziót is mutattak a kontrollokhoz képest megemelkedett *IL1B* expresszió mellett, amely utóbbit korábban szeptikus vérlemezkekben leírtak [68]. Fontos kiemelni, hogy amikor a thrombocyta méretét és reaktivitását kifejező MPV értékek [109] alapján tovább elemeztük a *SELP* expressziót a betegek vérlemezke mintáiban, magasabb *SELP* mRNS szintet találtunk azoknál, akiknél

a vérlemezkék nagy MPV értéket mutattak ($\geq 11,1$ fL). A nagyobb vérlemezkék általában több szekréciós granulumot és több RNS-t is tartalmaznak, ezáltal valóban reaktívabbá válhatnak, mint a kisebb thrombocyták [110]. Bár ezeknél a betegeknél a *SELP* expresszió nem korrelált szignifikánsan a szepszis kimenetelével, a megnövekedett MPV értékek előre jelezték a betegség prognózisát [111]. A fehérje expresszió változását jelző, megnövekedett *SELP* mRNS szint mellett magasabb P-szelektin fehérjetartalmat detektáltunk a szepszises thrombocyta lizátumokban, ami a MK-k és a vérlemezkék megváltozott miRNS és mRNS expressziójának a következménye. Egy állatkísérletes tanulmányban az egér vérlemezkék peritonealis szepszisben 48 órán át fokozott P-szelektin pozitivitást mutattak [112]. Két korábbi vizsgálat során, amikor az egereket 1 hétig alacsony szubletális LPS dózissal tették ki, az *ex vivo* thrombocyták az idő előrehaladtával fokozatosan aktiválódtak, ami nemcsak emelkedő felszíni P-szelektin pozitivitással, de nagyobb aggregációs hajlamot jelentett, és mindezt az LPS MK-ra kifejtett direkt hatásának és ezáltal megváltozott funkciójú új keringő vérlemezkéknek tulajdonították [102, 103]. Az aktivált thrombocyták felszínén a fokozott P-szelektin expresszió nagymértékben részt vesz a heterotípusos aggregátumok kialakulásában, ami mikrovaszkuláris trombozishoz vezethet [12]. A thrombocyta P-szelektin blokkolása a CD11b receptor egyidejű gátlásával a neutrophileken hatékonyan gátolta a thrombocyta-neutrophil kölcsönhatásokat szeptikus sokkban [113]. Összeségében a vérlemezkékben indukálódó *SELP* génexpresszió hozzájárulhat a sejt-sejt interakciók nagyobb mértékű kialakulásához, és ezáltal a P-szelektin receptor új terápiás célpontot jelenthet szepszisben [11].

A szepszisnek a vérlemezke funkciót érintő hatását számos vizsgálatban karakterizálták már [11, 21], ugyanakkor csak kevés tanulmány foglalkozott eddig a MK-t közvetlenül érintő szepszises folyamatokkal, amely megváltozott RNS expressziót eredményez a keringő vérlemezkékben [70, 96]. Ezért részleteiben megvizsgáltuk az LPS által kiváltott transzkripciós változásokat egy MK modellrendszerben, a MEG-01 sejtekben, mivel a szepszis során a vérlemezkékben emelkedett ITGA2B mRNS expressziót figyeltek meg mind a humán, mind az egér vérlemezkékben, ami az α IIB thrombocyta fehérje *de novo* szintézisét eredményezte az α IIB β 3 integrin aktivációjával [70]. Ennek érdekében a MEG-01 sejt kultúrákat 4 órán keresztül LPS-sel stimuláltuk az MK transzkriptóma elemzésére. Az LPS indukálja az NF- κ B útvonalat a MEG-01 sejtekben [19], amelyet a p65 fokozott nukleáris transzlokációjával fluoreszcens

mikroszkóppal vizualizáltunk. RNS szekvenálással 1060 szignifikánsan csökkent és 354 nagyobb mértékben expresszáldó transzkriptet detektáltunk. Ezen eredmények alapján a *SELP*-et az 50 legnagyobb mértékben expresszáldó gén között azonosítottuk. Ezt követően validáltuk a *SELP* expresszió változását LPS-stimulált MEG-01 sejtekben RT-qPCR-al, ami szignifikáns emelkedést mutatott. A fenti adatokból arra következtethetünk, hogy a szepszis kialakulása során a csontvelő érintettsége okán jelentős intracelluláris folyamatok és génexpressziós változások következnek be az MK-ban [20]. A megváltozott génexpresszió transzkripció és transzláció eseményeket eredményezhet az MK-thrombocytá tengelyben, ami változatos fenotípusú vérlemezkék termelődéséhez vezethet. Ezt a mechanizmust a fokozott vérlemezke aktivációra vonatkozóan akut koronária szindrómában is felvetették korábban [109].

Jelen kísérleteinkben az LPS-sel aktivált MEG-01 sejtekben a miR-26b szint a normálhoz képest jelentősen alacsonyabb volt, hasonlóan az *ex vivo* szeptikus vérlemezkékhez. A 2-es típusú cukorbetegség ugyanúgy a trombocytá miR-26b expresszió csökkenésével járt együtt megemelkedett *SELP* mRNA expresszióval, ami itt is magasabb vérlemezke reaktivitást eredményezett [60]. Ezzel szemben cardiopulmonalis bypass műtét után a trombocytá miR-10b és miR-96 fokozott expressziója csökkentette a GPIB és a VAMP8 mRNA expresszióját, valamint az azok által kódolt fehérjék szintjét, ami trombocytá diszfunkciót okozott [114]. A miR-26b-nek a *SELP* mRNA expresszióra gyakorolt hatását ezen gyulladásos körülmények között MEG-01 sejtekben megerősítettük specifikus miRNA mimic segítségével.

Szepszisben nem voltak korábbi adatok arról, hogy a kóros Dicer1 enzim aktivitás/szint miként változtatja meg az intracelluláris miRNA expressziót. Vizsgálataink során a Dicer1 fehérjeszint csökkenését figyeltük meg a szeptikus betegek trombocytá lizátumában. Hasonlóképpen az LPS-stimulált MEG-01 sejtek csökkent Dicer1 expressziót mutattak. A Dicer1 enzim működésének közvetlen vizsgálata siRNA-sel végzett géncsendesítéssel történt, valamint a calpain 1 és calpain 2 specifikus inhibitorral, a calpeptinnel. Eredményeink alapján szepszisben csökkent Dicer1 szint alakul ki, ami csökkentheti a miR-26b szintet, és ezáltal emelkedik a *SELP* mRNA expresszió mind a vérlemezkékben, mind az MK-ban. Ennek megfelelően az LPS-re vagy TNF- α -ra adott válaszként megemelkedett intracelluláris Ca²⁺-koncentráció olyan calpain funkcióhoz vezet, amely hasítja a Dicer1 enzimet, és így kevesebb érett miRNA termelődik [97].

Amikor a calpain aktivitását blokkoltuk, és a Dicer1 hasítását a calpeptin megakadályozta a fenti gyulladásos mediátorok bármelyikének jelenlétében, az érett miR-26b szintek visszarendeződtek a MEG-01 sejtekben. Ennek megfelelően a szepszises vérlemezékben és a MK-ban jelentősen csökkenhet a Dicer1 aktivitás, jelentősen átírva a miRNS-ek profilját. Csökkent Dicer1 enzim szintet diabetes mellitusban is kimutattunk, amikor hyperglükémiás környezetben a MEG-01 sejteket vizsgáltuk [60]. Jelen eredményeink alapján intenzív gyulladásos környezetben, szepszisben az MK-ban és a vérlemezékben a lecsökkent Dicer1 szint alacsony miR-26b expressziót eredményez emelkedett *SELP* expresszióval, ami hozzájárulhat a vérlemezék még fokozottabb aktivációs állapotának kialakulásához. Gén ontológiai elemzést is végeztünk, mely alapján a *SELP* gén részt vesz a gyulladásos válaszreakciók kialakításában. A perifériás vesejtekben kimutatott magas *SELP* expressziót kockázati tényezőként írták le rheumás ízületi gyulladásban [115], valamint a *SELP* gén S290N és N562D polimorfizmusát összefüggésbe hozták a myocardialis infarktus magasabb kockázatával [116], illetve nemrégiben a *SELP* gén Asp603Asn polimorfizmusát hozták összefüggésbe súlyos thrombotikus szövődmények kialakulásával COVID-19 betegekben [117]. Ugyanakkor az indukált *SELP* expresszió jelentőségét bakteriális szepszisben korábban még nem vizsgálták sem a vérlemezék, sem az MK-k működése szempontjából.

A stimulálódott thrombocyta aktiválódását egyrészt a mikropartikulák lefűződése, másrészt – részben ennek részjelenségeként – a vérlemezke miRNS-ek szekréciója kíséri a keringésben. A kiszabadult miRNS-ek bejuthatnak a macrophagokba [118] és az endothelsejtekbe [52], ahol szabályozzák a különböző gyulladásos folyamatokat és a sejtadhéziós molekulák expresszióját [119]. Korábbi eredmények alapján kiderült, hogy a miR-223 HDL-hez kötött formában képes *in vitro* regulálni az ICAM-1 expressziót HCAEC sejtekben [54], míg a thrombocyta miR-320b jelentős parakrin hatást kifejtve az endothelsejteken szintén az ICAM-1 receptor felszínén való megjelenését modulálja myocardialis infarktusban [82]. Ezek a korábbi adatok is azt bizonyítják, hogy a keringő miRNS-ek - bejutván más sejtekbe - képesek kiváltani az apoptózist, a sejtproliferációt, a migrációt és az inflammatórikus folyamatok lejátékozását az endothelsejtekben [75]. Azonban nem állnak rendelkezésre olyan eredmények, hogy a thrombocyta miR-223 kifejezetten septicus körülmények között miként tudja befolyásolni az endothelium ICAM-1 expresszióját. Ezért *in vitro* kísérleteket végeztünk 13 septicus beteg és 13 egészséges kontroll személy mintájának a bevonásával. A

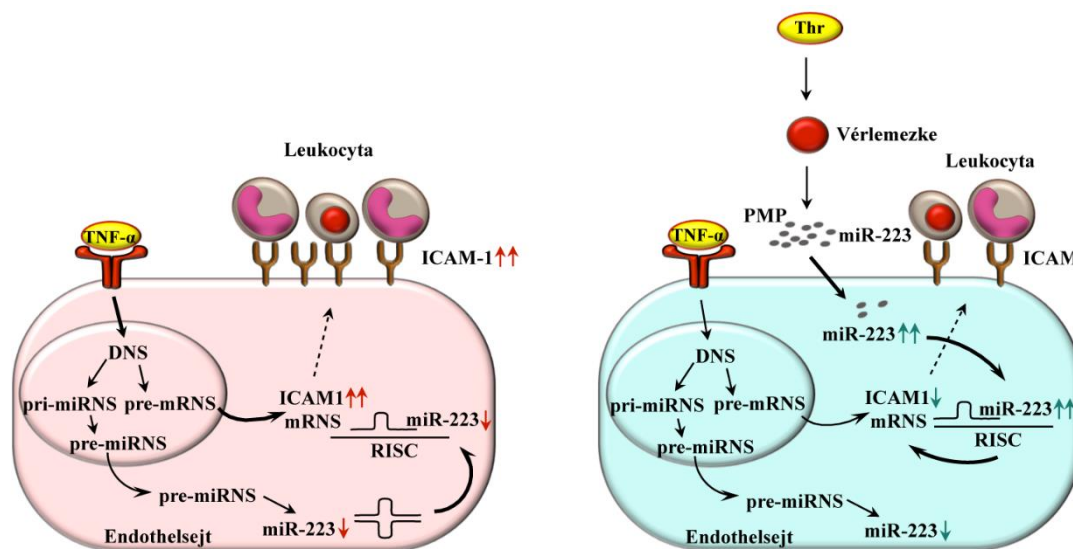
vérlemezkék fokozott aktiválódását ezúttal is a magas felszíni P-szelektin expresszióval igazoltuk, hasonlóan a másik szepszises vizsgálatunkhoz [98] és megnövekedett PMP mennyiséget detektáltunk szepszisen a kontrollokhöz képest. A szolubilis ICAM-1 szintet vizsgálva a szeptikus szérumokban szignifikáns emelkedést találtunk a kontroll csoporthoz képest, ami az endothelsejtek fokozott aktivációját jelzi [77]. Ezt követően a miR-223 expresszióját RT-qPCR segítségével vizsgáltuk a bevont betegek vérlemezkéiben, plazmájában és izolált mikropartikula mintáiban. A miR-223 expresszió csökkent szintet mutatott a szeptikus thrombocytaiban, míg a keringő miR-223 expresszió mind a szeptikus plazma mintákban, mind az izolált PMP mintákban emelkedett volt a kontroll mintákhoz képest. Feltételeztük, hogy az alacsonyabb thrombocyta miR-223 szint másik oka - az előzőekben bemutatott mechanizmusok mellett - a miRNS felszabadulása lehet a plazmába részben a PMP-ken keresztül ilyen súlyos gyulladásos körülmények között. Ezért LDP mintákat magas TRAP koncentrációval *in vitro* stimuláltuk, amely modellezte a szepszisen fokozott trombinképződés által indukált vérlemezke aktivációt [120], és a thrombocyta pelletben és felülúszóban is megvizsgáltuk miR-223 expressziót. A TRAP-pal aktivált thrombocytaiban a miR-223 expresszió szignifikánsan csökkent a nem kezelt mintához képest, míg a felülúszóban megemelkedett miR-223 szintet figyeltünk meg a kezelés után. Ennek megfelelően azt gondoljuk, hogy a thrombocyta aktiválódásakor a mikropartikulákban lévő miRNS átvitele valóban megtörténik a keringésbe. Egy hasonló tanulmányban beszámoltak arról, hogy a thrombin által kiváltott vérlemezke aktivációkor keletkezett exoszómák is miR-223-ban gazdagok [91]. Mások vizsgálata szerint a thrombin aktiváció a cel-miR-39 expressziójának jelentős emelkedését okozta a vérlemezkék felülúszójában, ami az intracelluláris cel-miR-39 tartalom kikerülését jelentette [82]. Mivel az endothelium a keringő mikrovezikula tartalom fontos célpontja a szív- és érrendszeri megbetegedésekben, valamint a gyulladásos kórképekben [75], ezért mi is megvizsgáltuk és detektáltuk a miRNS-ek thrombocyta eredetű mikropartikulákon keresztüli bejutását az endothelsejtekbe. A HCAEC sejteket együtt tenyésztettük szepszises, illetve kontroll egyének mintáiból izolált mikropartikulákkal. Azt tapasztaluk, hogy 24 óra elteltével nagyobb mértékű volt a szepszises PMP-k felvétele az endothelsejtekbe, mint a kontroll PMP-k esetében. Korábbi tanulmányok dokumentálták a normál PMP-k és exoszómák internalizációját a HUVEC sejtekbe [52, 91]. Jelen tanulmányunkban a szepszis eredetű PMP-k fokozott internalizációjáról

számoltunk be az endotheliumba, amely 4°C-on gátolható volt. Ezt az inhibíciót korábban más kutatók is alkalmazták, ahol a cél az endocitózis megakadályozása volt [92, 93]. Ezután megfigyeltük a szépszis PMP-k hatását az endothelsejtek működésére „szekretált” miRNS-ek révén. A HCAEC sejteket előkezeltük szépszis PMP-vel, amelyek megnövekedett miR-223 expressziót mutattak, míg az ICAM1 mRNA expresszió csökkent. Ezzel párhuzamosan a TNF- α -val előkezelt HCAEC sejteket inkubáltuk *in vitro* TRAP stimulációval „előállított” PMP-vel. Maga a TNF- α előkezelés csökkentette a miR-223 expresszióját és emelte az ICAM1 mRNA szintet a kontroll mintához képest, míg a TRAP-aktivált PMP-k jelenlétében a magasabb miR-223-at csökkent ICAM1 expresszióval detektáltuk. Az endothelsejtek felülűsójában a szolubilis ICAM-1 protein mennyiségét a TNF- α növelte, míg a TNF- α és PMP-k együttes kezelése 24 óra elteltével szignifikánsan csökkent fehérje koncentrációt eredményezett. Ezen kívül a jégen (4°C-on) tartott HCAEC sejtekben a miRNS-expresszió nem változott, míg 37°C-on a miR-223 szint emelkedett volt a PMP-k nélküli kontroll endothelsejt mintákhoz képest. Ezek az eredmények együttesen megerősítik, hogy a miR-223-at hordozó PMP-k endocitózisa egyértelműen növeli a miRNS expresszióját az endothelsejtekben. Ezen kívül a PMP-k által átjutott miR-223 képes a gyulladásos körülmények miatt indukált ICAM-1 receptor expresszióját csökkenteni az endothelsejtekben.

Mivel a mikrovezikulák legnagyobb része a trombocytákól származik, a keringő miRNS-ek egy jelentős hányada az aktivált vérlemezkékből más sejttípusokba kerül és befolyásolja azok génexpresszióját [121]. Korábbi eredmények alapján a trombocyta eredetű miR-223 szabályozza az *EFNA1* és *FBXW7* gén expresszióját is mRNA szinten HUVEC sejtekben [52]. Szintén kiemelendő, hogy az ICAM-1 expressziót nemcsak a miR-223 szabályozza, hanem más miRNS-ek, például a miR-141 is. A miR-141 csökkentette az ICAM-1 expresszióját a szívizom ischaemia-reperfúziós sérülésének kivédése érdekében [83]. Másrészt a miR-223 más receptorok, így pl. az inzulinszerű növekedési faktor 1 receptorának expresszióját is szabályozza a vaszkuláris simaizomsejteken [122].

A miRNS expressziójának molekuláris mechanizmusának további tisztázása érdekében ezekben a kísérletekben is vizsgáltuk, hogy történik-e fokozott miRNS transzkripció, illetve a Dicer1 enzim esetleges fokozott aktivitása/szintje hozzájárul-e a szépszis PMP-vel kezelt HCAEC sejtek fokozott miR-223 expressziójához. Ennek

érdekében az előbbi célból megmértük az érett miR-223 mellett a pre-miR-223 expresszióját is a TRAP-stimulált PMP-k jelenlétében és hiányában. Az utóbbi okból pedig a HCAEC sejtekbe Dicer1 siRNS-t transzfektáltunk a PMP-k hozzáadása előtt. Azt tapasztaltuk, hogy az érett miR-223 jelentősen emelkedett, míg a pre-miR-223 szint nem változott a PMP-k jelenlétében, és a *DICER1* gén csendesítése után is az érett miR-223 szint még mindig jelentősen emelkedett volt a PMP-k jelenlétében a HCAEC sejtekben. Összességében tehát a megnövekedett miR-223 szint a PMP-k által szállított miRNS következménye volt, ami arra is utal, hogy sem a transzkripció, sem az indukált Dicer1 enzim szint nem járult hozzá ezen gyulladásos körülmények között tartott endothelsejtek megváltozott miR-223 expressziójához.

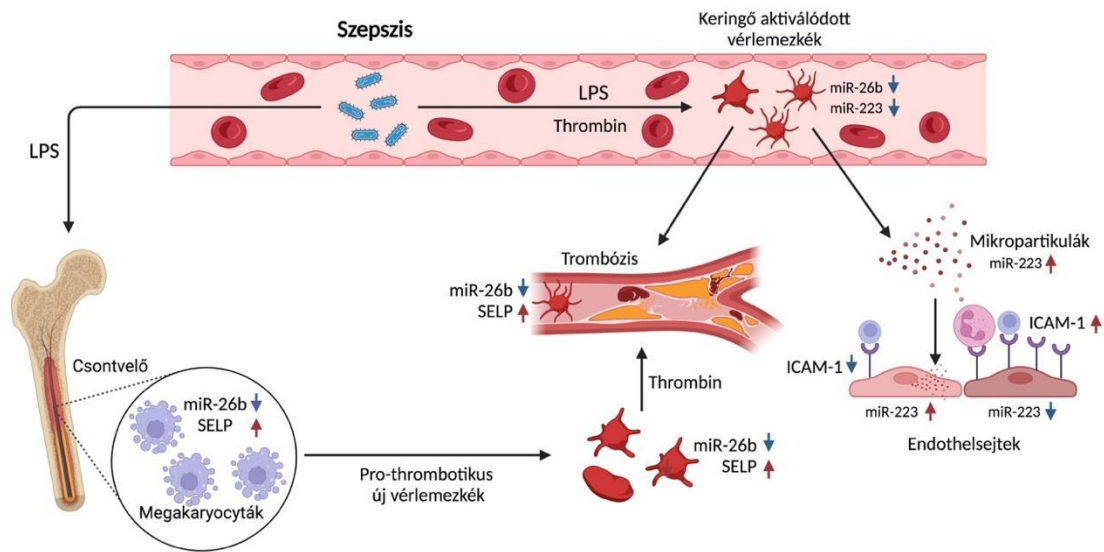


25. ábra A felállított sejtmmodell legfontosabb eredményeinek összefoglalása arról, hogy miként csökkentheti a PMP-k által szállított miR-223 az endothelsejt ICAM-1 expresszióját súlyos gyulladásos körülmények között. A septicus milieu indukálja az ICAM-1 receptor expresszióját már a sepszis korai fázisában (bal oldal). A betegség előrehaladtával a fokozottan képződő thrombin vérlemezke aktivációhoz és nagymennyiségű PMP termelődéshez vezet, mely a miRNS tartalom transzferét okozza. A miRNS-t tartalmazó PMP-ket az endothelium felveszi, ami az ICAM-1 expresszió csökkentése révén kevesebb leukocytá adhézióját okozza, ami egyfajta védekező/kompenzatórikus folyamat lehet a túlzott vaszkuláris gyulladás megakadályozása érdekében (jobb oldal). A vastag nyilak jelölik a főbb útvonalakat, melyek befolyásolják az ICAM-1 expressziót. Rövidítések: ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1, Thr: thrombin, TNF-α: tumor necrosis factor alpha, PMP: platelet microparticle, RISC: RNA-induced silencing complex.

Végül a miR-223 leukocytá-endothelsejt interakcióra gyakorolt funkcionális hatásának megértése érdekében végeztünk kísérletet, amely során arra voltunk

kíváncsiak, hogy a szepszises PMP-k a miR-223 bejuttatásával csökkentik-e valamilyen mértékben a leukocyták adhézióját az endothelsejtekhez. Az endothelsejtek felszínéhez kötött izolált PBMC-k mennyisége 30%-kal csökkent, amikor előkezelésként szepszisből származó PMP-ket adtunk a HCAEC sejtekhez. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a PMP-k által a miR-223-on keresztül mérsékelt ICAM-1 receptor expresszió a leukocytáknak az endotheliumhoz való kisebb mértékű kötődését eredményezik (25. ábra). Mivel több más receptor is részt vesz a leukocyta-endothelsejt interakcióban [78], ennél nagyobb mértékű csökkenésre nem számítottunk. A 25. ábra bemutatja a fenti eredményeink alapján kialakított modellünket arról, hogy miként csökkentheti a PMP-k által szállított miR-223 az endotheliális ICAM-1 expressziót súlyos gyulladásos körülmények között.

A disszertáció alapját képező két szepszises vizsgálat sorozat eredményeinek összesítéséből azt gondoljuk, hogy a szepszis során felszabaduló bakteriális mediátorok (pl. LPS) nemcsak a vérlemezkéket stimulálják a keringésben, ami fokozott thrombocyta aktivációhoz és akár thrombusképződéshez vezethet, hanem az LPS a keringés útján bejuthat a csontvelőbe, ahol az MK sejteket direkt módon tudja aktiválni, és ez prothrombotikus új vérlemezkék termelődéséhez vezet. Ezek a nagyobb méretű thrombocyták már eleve „előaktivált” állapotban vannak. Megváltozott RNS expresszióval (pl. csökkent miR-223-, miR-26b-szint stb.) bírnak, melynek révén a prokoaguláns fehérjék, pl. P-szelektin termelődése is fokozódhat és könnyebben tudnak okozni thrombotikus komplikációkat. Ezzel párhuzamosan az aktiválódott vérlemezkék többek között mikropartikulákat szekretálnak, melyekbe a miRNS tartalmuk is bepakolódik, ami eljut a keringésen keresztül más sejtekhez, pl. az endothelsejtekhez megváltoztatva azok működését, fehérje expresszióját. Tehát szepszisben a megváltozott thrombocyta miRNS expressziók kialakításában mindkét mechanizmus egyszerre résztvehet. Ugyanakkor érdekes adat az is, hogy az aktiválódott vérlemezke funkció következménye nemcsak a kóros alvadási zavarok bekövetkezése, hanem a túlzott mértékű, akár elhúzódó endothelsejt aktiváció/károsodás kompenzációja is (26. ábra). Ezeken komplex folyamatok részleteinek a vizsgálatára további kutatások szükségesek.



26. ábra A thrombocyták aktivációjának és funkcionális miRNS-einek „kettős élete” súlyos gyulladásos körülmények között. Szepszis során az LPS nemcsak a vérlemezkéket stimulálja a keringésben, hanem a keringés útján bejuthat a csontvelőbe, ahol a MK sejteket direkt módon tudja aktiválni, és ez prothrombotikus új vérlemezkék termelődéséhez vezet. Ezek a nagyobb méretű thrombocyták megváltozott RNS expresszióval (pl. csökkent miR-223-, miR-26b-szint stb.) bírnak, melynek révén pl. a P-szelektin (SELP) termelődése is fokozódhat. Ezzel párhuzamosan az aktiválódott vérlemezkék mikropartikulákat szekretálnak, melyekbe a miRNS tartalmuk is bepakolódik, amely eljut az endothelsejtekhez megváltoztatva azok működését, ICAM-1 expresszióját. Kiemelendő, hogy az aktiválódott vérlemezke funkció következménye nemcsak a kóros alvadási zavarok, hanem az endothelsejt aktiváció/károsodás kompenzációja is. A nyilak jelölik a főbb útvonalakat. Rövidítések: ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1, SELP: P-szelektin gén, LPS: lipopoliszacharid.

7. Összefoglalás

A szepszis egy fertőzés következtében kialakuló súlyos szisztémás válaszreakció, melynek során gyulladásos citokinek szabadulnak fel. Ennek hatására károsodhatnak az endothelsejtek, ami fokozott fehérvérsejt és thrombocyta aktivációt idézhet elő, és ez akár thrombotikus komplikációkhoz is vezethet. Az aktiválódott vérlemezkék nemcsak prothrombotikus folyamatokban vesznek részt, hanem a mikropartikulák és számos biológiailag aktív mediátor kibocsátásával közvetlenül befolyásolják más sejtek funkcióját. A miRNS-eknek fontos szerepük van a sejtek működéséhez szükséges gének expressziójának szabályozásában, így számos patofiziológiai folyamat kialakításában is részt vesznek. Szepszis során a megakaryocyták is érintettek lehetnek, mely következtében már eleve megváltozott funkciójú és RNS tartalmú vérlemezkék keletkezhetnek. Munkánk célja a megakaryocyta-thrombocyta eredetű miRNS-ek és mRNS-ek vizsgálata volt septicus körülmények között.

A szepszis eredetű thrombocyták jelentős mértékben megváltozott miRNS profilt mutattak. A csökkent thrombocyta miR-26b korrelált a szepszis súlyosságával és mortalitással, így hasznos biomarker lehet a fokozott vérlemezke aktiválódási állapot jelzésére szepszisben. A csökkent miR-26b expresszió hátterében a Dicer1 enzim csökkent működése áll. A septicus vérlemezkék a magas felszíni P-szelektin pozitívassal mellett jelentősen emelkedett *SELP* és *IL1B* mRNS expressziót is mutattak a kontrollokhoz képest. Az LPS-sel stimulált MEG-01 sejtekben markáns génexpresszió változást tapasztaltunk, és a szepszises vérlemezkékhez hasonlóan alacsonyabb miR-26b és magasabb *SELP* expressziót detektáltunk a nem kezelt sejtekhez képest. A miR-26b és a *SELP* kapcsolatát ezen gyulladásos körülmények között MEG-01 sejtekben igazoltuk specifikus miRNS mimic segítségével. Az aktiválódott thrombocytákból megnövekedett mennyiségben termelődött mikropartikulát detektáltunk szepszisben a kontrollokhoz képest. A septicus thrombocytákban a csökkent miR-223 expresszió mellett emelkedett keringő miR-223 szint volt a septicus plazma mintákban és a mikropartikulákban.

Detektáltuk a thrombocyta miRNS-ek mikropartikulákon keresztüli bejutását az endothelsejtekbe. Nagyobb mértékű volt a szepszises mikropartikulák felvétele az endothelsejtekbe a kontrollokhoz képest, és az endothelsejtekben a mikropartikulák által megnövekedett miR-223 szint csökkentette a gyulladás indukálta ICAM-1 expressziót.

8. Summary

Sepsis is a severe systemic response to an infection, when a large amount of inflammatory cytokines is released. This can cause the damage of endothelial cells leading to increased leukocyte and platelet activation and even thrombotic complications. Activated platelets are not only involved in prothrombotic processes, but also directly influence the function of other cells via releasing microparticles and a number of biologically active mediators. MicroRNAs (miRNA) play an important role in the regulation of gene expression in connection with cellular functions and the development of many pathophysiological processes. In sepsis, megakaryocytes may also be affected resulting in new platelets with already altered function and RNA content. The aim of our study was to investigate miRNAs of megakaryocyte/platelet origin under septic conditions.

Sepsis-derived platelets demonstrated a markedly altered miRNA profile. We detected decreased platelet miR-26b in platelets and megakaryocytes. The level of miR-26b correlated with sepsis severity and mortality, thus this miRNA can be used as a biomarker of increased platelet activation in sepsis. Decreased miR-26b expression is due to reduced level of Dicer1 enzyme. In addition to high surface P-selectin positivity, septic platelets also showed significantly elevated SELP and IL1B mRNA expression compared to control samples. LPS-stimulated MEG-01 megakaryocytes showed substantially changed gene expression and similar to sepsis platelets, lower miR-26b and higher *SELP* expression were detected in compared to untreated cells. The relationship between miR-26b and *SELP* gene under these inflammatory conditions was verified in MEG-01 cells using specific microRNA mimic. We detected increased level of microparticles released from activated platelets in sepsis compared to controls. In sepsis, in addition to decreased platelet miR-223 expression, there were elevated circulating miR-223 levels in plasma samples and within platelet microparticles.

Finally, internalization of platelet miRNAs was detected into endothelial cells via platelet microparticles. There was a higher uptake of sepsis microparticles into endothelial cells compared to controls, and increased miR-223 levels by microparticles decreased the inflammation induced ICAM-1 expression in endothelial cells.

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

1. A szepszisz eredetű thrombocytákban jelentősen megváltozott miRNS profil detektálható, melyek közül a miR-26b jelentősen alacsonyabb expressziót mutatott.
2. Az LPS-sel kezelt MEG-01 megakaryocytákban a csökkent miR-26b expresszió mellett markáns génexpresszió változás is kimutatható *in vitro* szeptikus körülmények között.
3. A csökkent miR-26b expresszió megnövekedett SELP mRNS és P-szelektin expresszióval jár együtt mind a thrombocytákban, mind a megakaryocytákban, melyet a MEG-01 sejtekben specifikus miRNS mimic használatával erősítettük meg.
4. A gén ontológiai vizsgálat igazolta, hogy a *SELP* gén fontos szerepet játszik a gyulladásos válaszreakciók kialakításában.
5. Az alacsonyabb vérlemezke miR-223 mellett a keringő miR-223 szintje jelentősen emelkedik a szepszises plazmában és a thrombocyta eredetű mikropartikulákban.
6. A vérlemezke mikropartikulák által szállított miR-223 képes jelentősen csökkenteni a gyulladás indukálta ICAM-1 expressziót az endothelsejtek felszínén, amely kisebb fehérvérsejt adhéziót eredményez.

10. Irodalomjegyzék és publikációs lista

10.1 Irodalomjegyzék

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315(8): 801-10.
- [2] de Stoppelaar SF, van 't Veer C, van der Poll T. The role of platelets in sepsis. *Thromb Haemost*. 2014; 112(4): 666-77.
- [3] Vardon-Bouines F, Ruiz S, Gratacap MP, Garcia C, Payrastre B, Minville V. Platelets are critical key players in sepsis. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(14): 3494.
- [4] Dewitte A, Lepreux S, Villeneuve J, Rigotherier C, Combe C, Ouattara A, Ripoche J. Blood platelets and sepsis pathophysiology: A new therapeutic prospect in critically ill patients? *Ann Intensive Care*. 2017; 7(1): 115.
- [5] Russwurm S, Vickers J, Meier-Hellmann A, Spangenberg P, Bredle D, Reinhart K, Lösche W. Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock*. 2002; 17(4): 263-8.
- [6] Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S, Neumann FJ. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med*. 1997; 23(4): 379-85.
- [7] Akinosoglou K, Theodoraki S, Xanthopoulou I, Perperis A, Gkavogianni T, Pistiki A, Giamarellos-Bourboulis E, Gogos CA. Platelet reactivity in sepsis syndrome: results from the PRESS study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017; 36(12): 2503-12.
- [8] Yaguchi A, Lobo FL, Vincent JL, Pradier O. Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost*. 2004; 2(12): 2096-102.
- [9] Adamzik M, Görlinger K, Peters J, Hartmann M. Whole blood impedance aggregometry as a biomarker for the diagnosis and prognosis of severe sepsis. *Crit Care*. 2012; 16(5): R204.
- [10] Assinger A, Schrottmaier WC, Salzmann M, Rayes J. Platelets in sepsis: An update on experimental models and clinical data. *Front Immunol*. 2019; 10: 1687.
- [11] Kappelmayer J, Nagy B Jr, Miszti-Blasius K, Hevessy Z, Setiadi H. The emerging value of P-selectin as a disease marker. *Clin Chem Lab Med*. 2004; 42(5): 475-86.

- [12] Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K. Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Invest*. 1995; 25(11):843-51.
- [13] Rondina MT, Carlisle M, Fraughton T, Brown SM, Miller RR 3rd, Harris ES, Weyrich AS, Zimmerman GA, Supiano MA, Grissom CK. Platelet-monocyte aggregate formation and mortality risk in older patients with severe sepsis and septic shock. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015; 70(2): 225-31.
- [14] Mosad E, Elsayh KI, Eltayeb AA. Tissue factor pathway inhibitor and P-selectin as markers of sepsis-induced non-overt disseminated intravascular coagulopathy. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2011; 17(1): 80-7.
- [15] O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(6): 453-60.
- [16] D' Atri LP, Schattner M. Platelet toll-like receptors in thromboinflammation. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2017; 22: 1867-83.
- [17] Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KV, Patel KD, Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*. 2005; 106(7): 2417-23.
- [18] Blair P, Rex S, Vitseva O, et al. Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide 3-kinase. *Circ Res*. 2009; 104(3): 346-54.
- [19] Beaulieu LM, Lin E, Morin KM, Tanriverdi K, Freedman JE. Regulatory effects of TLR2 on megakaryocytic cell function. *Blood*. 2011; 117(22): 5963-74.
- [20] Beaulieu LM, Freedman JE. The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes. *Thromb Res*. 2010; 125(3): 205-9.
- [21] Schattner MJ. Platelet TLR4 at the crossroads of thrombosis and the innate immune response. *Leukoc Biol*. 2019; 105(5): 873-80.
- [22] Tsujimoto H, Ono S, Efron PA, Scumpia PO, Moldawer LL, Mochizuki H. Role of Toll-like receptors in the development of sepsis. *Shock*. 2008; 29(3): 315-21.
- [23] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010; 140(6): 805-20.
- [24] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008; 42(2): 145-51.

- [25] Szilágyi B, Fejes Z, Pócsi M, Kappelmayer J, Nagy B Jr. Role of sepsis modulated circulating microRNAs. *EJIFCC*. 2019; 30(2): 128-45.
- [26] Friedman RC, Fahr KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009; 19(1): 92-105.
- [27] Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010; 466(7308): 835-40.
- [28] Croce CM, Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell*. 2005; 122(1): 6–7.
- [29] Rottiers V, Näär AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012; 13(4): 239-50.
- [30] Wiemer EAC. The role of microRNAs in cancer: No small matter. *Eur J Cancer*. 2007; 43(10): 1529-44.
- [31] Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004; 23(20): 4051-60.
- [32] Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003; 425(6956): 415-9.
- [33] Knight SW, Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001; 293(5538): 2269-71.
- [34] Lau PW, Guiley KZ, De N, Potter CS, Carragher B, MacRae IJ. The molecular architecture of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol*. 2012; 19: 436-40.
- [35] Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2002; 297: 2056-60.
- [36] Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 9779-84.
- [37] Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*. 2002; 110: 513-20.
- [38] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009; 136: 642-55.
- [39] Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, How HK, Jen LM, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010; 56: 1733-41.

- [40] Benz F, Roy S, Trautwein C, Roderburg C, Luedde T. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(1): 78.
- [41] Turchinovich A, Tonevitsky AG, Burwinkel B. Extracellular miRNA: A collision of two paradigms. *Trends Biochem Sci.* 2016; 41(10): 883-92.
- [42] Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9(8): 581-93.
- [43] Provost P. The clinical significance of platelet microparticle-associated microRNAs. *Clin Chem Lab Med.* 2017; 55: 657–66.
- [44] Landry P, Plante I, Ouellet DL, Perron MP, Rousseau G, Provost P. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol.* 2009; 16(9): 961-6.
- [45] Rondina MT, Weyrich AS. Regulation of the genetic code in megakaryocytes and platelets. *J Thromb Haemost.* 2015; 13 Suppl 1: S26-32.
- [46] Nagalla S, Shaw C, Kong X, Kondkar AA, Edelstein LC, Ma L, Chen J, McKnight GS, López JA, Yang L, Jin Y, Bray MS, Leal SM, Dong JF, Bray PF. Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity. *Blood.* 2011; 117(19): 5189-97.
- [47] Osman A, Fälker K. Characterization of human platelet microRNA by quantitative PCR coupled with an annotation network for predicted target genes. *Platelets.* 2011; 22(6): 433-41.
- [48] Ambrose AR, Alsahli MA, Kurmani SA, Goodall AH. Comparison of the release of microRNAs and extracellular vesicles from platelets in response to different agonists. *Platelets.* 2018; 29(5): 446-54.
- [49] Plé H, Landry P, Benham A, Coarfa C, Gunaratne PH, Provost P. The repertoire and features of human platelet microRNAs. *PLoS One.* 2012; 7(12): e50746.
- [50] Teruel-Montoya R, Kong X, Abraham S, Ma L, Kunapuli SP, Holinstat M, Shaw CA, McKenzie SE, Edelstein LC, Bray PF. MicroRNA expression differences in human hematopoietic cell lineages enable regulated transgene expression. *PLoS One.* 2014; 9(7): e102259.
- [51] Bray PF, McKenzie SE, Edelstein LC, Nagalla S, Delgrosso K, Ertel A, Kupper J, Jing Y, Londin E, Loher P, Chen HW, Fortina P, Rigoutsos I. The complex transcriptional landscape of the anucleate human platelet. *BMC Genomics.* 2013; 14: 1.

- [52] Laffont B, Corduan A, Plé H, Duchez AC, Cloutier N, Boilard E, Provost P. Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood*. 2013; 122(2): 253-61.
- [53] Pan Y, Liang H, Liu H, Li D, Chen X, Li L, Zhang CY, Zen K. Platelet-secreted microRNA-223 promotes endothelial cell apoptosis induced by advanced glycation end products via targeting the insulin-like growth factor 1 receptor. *J Immunol*. 2014; 192(1): 437-46.
- [54] Tabet F, Vickers KC, Cuesta Torres LF, Wiese CB, Shoucri BM, Lambert G, Catherinet C, Prado-Lourenco L, Levin MG, Thacker S, Sethupathy P, Barter PJ, Remaley AT, Rye KA. HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nat Commun*. 2014; 5: 3292.
- [55] Li J, Tan M, Xiang Q, Zhou Z, Yan H. Thrombin-activated platelet-derived exosomes regulate endothelial cell expression of ICAM-1 via microRNA-223 during the thrombosis-inflammation response. *Thromb Res*. 2017; 154: 96-105.
- [56] Boilard E, Belleannée C. (Dicer)phering roles of microRNA in platelets. *Blood*. 2016; 127(14): 1733-4.
- [57] Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent protein synthesis by activated platelets: new pathways to altered phenotype and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28: 17–24.
- [58] Rowley JW, Chappaz S, Corduan A, Chong MM, Campbell R, Khoury A, Manne BK, Wurtzel JG, Michael JV, Goldfinger LE, Mumaw MM, Nieman MT, Kile BT, Provost P, Weyrich AS. Dicer1-mediated miRNA processing shapes the mRNA profile and function of murine platelets. *Blood*. 2016; 127(14): 1743-51.
- [59] Miao X, Rahman MF, Jiang L, Min Y, Tan S, Xie H, Lee L, Wang M, Malmström RE, Lui WO, Li N. Thrombin-reduced miR-27b attenuates platelet angiogenic activities in vitro via enhancing platelet synthesis of anti-angiogenic thrombospondin-1. *J Thromb Haemost*. 2018; 16(4): 791-801.
- [60] Fejes Z, Póliska S, Czimmerer Z, Káplár M, Penyige A, Gál Szabó G, Beke Debreceni I, Kunapuli SP, Kappelmayer J, Nagy B Jr. Hyperglycaemia suppresses microRNA expression in platelets to increase P2RY12 and SELP levels in type 2 diabetes mellitus. *Thromb Haemost*. 2017; 117(3): 529-42.
- [61] Basak I, Bhatlekar S, Manne BK, Stoller M, Hugo S, Kong X, Ma L, Rondina MT, Weyrich AS, Edelstein LC, Bray PF. miR-15a-5p regulates expression of multiple

- proteins in the megakaryocyte GPVI signaling pathway. *J Thromb Haemost.* 2019; 17(3): 511-24.
- [62] Garcia A, Dunoyer-Geindre S, Zapilko V, Nolli S, Reny JL, Fontana P. Functional Validation of microRNA-126-3p as a Platelet Reactivity Regulator Using Human Haematopoietic Stem Cells. *Thromb Haemost.* 2019; 119(2): 254-63.
- [63] Edelstein LC, McKenzie SE, Shaw C, Holinstat MA, Kunapuli SP, Bray PF. MicroRNAs in platelet production and activation. *J Thromb Haemost.* 2013; 11 Suppl 1: 340-50.
- [64] Reithmair M, Buschmann D, Märte M, Kirchner B, Hagl D, Kaufmann I, Pfob M, Chouker A, Steinlein OK, Pfaffl MW, Schelling G. Cellular and extracellular miRNAs are blood-compartment-specific diagnostic targets in sepsis. *J Cell Mol Med.* 2017; 21(10): 2403-11.
- [65] Brogren H, Karlsson L, Andersson M, Wang L, Erlinge D, Jern S. Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1. *Blood.* 2004; 104(13): 3943-8.
- [66] Corduan A, Plé H, Laffont B, Wallon T, Plante I, Landry P, Provost P. Dissociation of SERPINE1 mRNA from the translational repressor proteins Ago2 and TIA-1 upon platelet activation. *Thromb Haemost.* 2015; 113(5): 1046-59.
- [67] Hu L, Chang L, Zhang Y, Zhai L, Zhang S, Qi Z, Yan H, Yan Y, Luo X, Zhang S, Wang Y, Kunapuli SP, Ye H, Ding Z. Platelets Express Activated P2Y₁₂ Receptor in Patients With Diabetes Mellitus. *Circulation.* 2017; 136(9): 817-33.
- [68] Shashkin PN, Brown GT, Ghosh A, Marathe GK, McIntyre TM. Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *J Immunol.* 2008; 181(5): 3495-502.
- [69] Rondina MT, Schwertz H, Harris ES, Kraemer BF, Campbell RA, Mackman N, Grissom CK, Weyrich AS, Zimmerman GA. The septic milieu triggers expression of spliced tissue factor mRNA in human platelets. *J Thromb Haemost.* 2011; 9(4): 748-58.
- [70] Middleton EA, Rowley JW, Campbell RA, Grissom CK, Brown SM, Beesley SJ, Schwertz H, Kosaka Y, Manne BK, Krauel K, Tolley ND, Eustes AS, Guo L, Paine R 3rd, Harris ES, Zimmerman GA, Weyrich AS, Rondina MT. Sepsis alters the transcriptional and translational landscape of human and murine platelets. *Blood.* 2019; 134(12): 911-23.
- [71] Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes

derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*. 1999; 94(11): 3791-9.

[72] Brisson AR, Tan S, Linares R, Gounou C, Arraud N. Extracellular vesicles from activated platelets: a semiquantitative cryo-electron microscopy and immuno-gold labeling study. *Platelets*. 2017; 28(3): 263-71.

[73] Aatonen MT, Ohman T, Nyman TA, Laitinen S, Grönholm M, Siljander PR. Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014; 3.

[74] Clancy L, Freedman JE. The role of circulating platelet transcripts. *J Thromb Haemost*. 2015; 13 Suppl 1: S33-9.

[75] Shu Z, Tan J, Miao Y, and Zhang Q. The role of microvesicles containing microRNAs in vascular endothelial dysfunction. *J Cell Mol Med*. 2019; 23: 7933–45.

[76] Zaldivia MTK, McFadyen JD, Lim B, Wang X, Peter K. Platelet-derived microvesicles in cardiovascular diseases. *Front Cardiovasc Med*. 2017; 4: 74.

[77] Skibsted S, Jones AE, Puskarich MA, Arnold R, Sherwin R, Trzeciak S, Schuetz P, Aird WC, Shapiro NI. Biomarkers of endothelial cell activation in early sepsis. *Shock*. 2013; 39: 427–32.

[78] Vestweber D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15: 692–704.

[79] Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schömig A, Neumann F. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2000; 148: 75–85.

[80] de Pablo R, Monserrat J, Reyes E, Díaz D, Rodríguez-Zapata M, de la Hera A, Prieto A, Álvarez-Mon M. Circulating sICAM-1 and sE-Selectin as biomarker of infection and prognosis in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Eur J Intern Med*. 2013; 24: 132-8.

[81] Fang Y, Li C, Shao R, Yu H, Zhang Q. The role of biomarkers of endothelial activation in predicting morbidity and mortality in patients with severe sepsis and septic shock in intensive care: a prospective observational study. *Thromb Res*. 2018; 171: 149–54.

[82] Gidlöf O, van der Brug M, Ohman J, Gilje P, Olde B, Wahlestedt C, Erlinge D. Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be

taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression. *Blood*. 2013; 121(19): 3908-17.

[83] Liu RR, Li J, Gong JY, Kuang F, Liu JY, Zhang YS, Ma QL, Song CJ, Truax AD, Gao F, Yang K, Jin BQ, Chen LH. MicroRNA-141 regulates the expression level of ICAM-1 on endothelium to decrease myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015; 309(8): H1303-13.

[84] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992; 101(6): 1644-55.

[85] Csongrádi É, Nagy B Jr, Fulop T, Varga Z, Karányi Z, Magyar MT, Oláh L, Papp M, Facskó A, Kappelmayer J, Paragh G, Káplár M. Increased levels of platelet activation markers are positively associated with carotid wall thickness and other atherosclerotic risk factors in obese patients. *Thromb Haemost*. 2011; 106(4): 683-92.

[86] Czimmerer Z, Hulvely J, Simandi Z, Varallyay E, Havelda Z, Szabo E, Varga A, Dezso B, Balogh M, Horvath A, Domokos B, Torok Z, Nagy L, Balint BL. A versatile method to design stem-loop primer-based quantitative PCR assays for detecting small regulatory RNA molecules. *PLoS One*. 2013; 8(1): e55168.

[87] Micallef M, Matsuo Y, Takayama K, Ariyasu T, Otani T, Minowada J. Differential platelet-associated factor gene expression by a panel of human cell lines with megakaryoblastic properties after treatment with phorbol myristate acetate. *Hematol Oncol*. 1994; 12(4): 163-74.

[88] Schweinfurth N, Hohmann S, Deuschle M, Lederbogen F, Schloss P. Valproic acid and all trans retinoic acid differentially induce megakaryopoiesis and platelet-like particle formation from the megakaryoblastic cell line MEG-01. *Platelets*. 2010; 21(8): 648-57.

[89] López E, Berna-Erro A, López JJ, Granados MP, Bermejo N, Brull JM, Salido GM, Rosado JA, Redondo PC. Role of mTOR1 and mTOR2 complexes in MEG-01 cell physiology. *Thromb Haemost*. 2015; 114(5): 969-81.

[90] Fejes Z, Czimmerer Z, Szük T, Póliska S, Horváth A, Balogh E, Jeney V, Váradi J, Fenyvesi F, Balla G, Édes I, Balla J, Kappelmayer J, Nagy B Jr. Endothelial cell activation is attenuated by everolimus via transcriptional and post-transcriptional regulatory mechanisms after drug-eluting coronary stenting. *PLoS One*. 2018; 13(6): e0197890.

- [91] Li JB, Wang HY, Yao Y, Sun QF, Liu ZH, Liu SQ, Zhuang JL, Wang YP, Liu HY. Overexpression of microRNA-138 alleviates human coronary artery endothelial cell injury and inflammatory response by inhibiting the PI3K/Akt/eNOS pathway. *J Cell Mol Med*. 2017; 21(8): 1482-91.
- [92] Jiao CY, Delaroche D, Burlina F, Alves ID, Chassaing G, Sagan S. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *J Biol Chem*. 2009; 284: 33957-65.
- [93] Mizusako H, Tagami T, Hattori K, Ozeki T. Active Drug Targeting of a Folate-Based Cyclodextrin-Doxorubicin Conjugate and the Cytotoxic Effect on Drug-Resistant Mammary Tumor Cells In Vitro. *J Pharm Sci*. 2015; 104: 2934-40.
- [94] Shemirani AH, Nagy B Jr, Takáts AT, Zsóri KS, András C, Kappelmayer J, Csiki Z. Increased mean platelet volume in primary Raynaud's phenomenon. *Platelets*. 2012; 23(4): 312-6.
- [95] Kappelmayer J, Beke Debreceni I, Vida A, Antal-Szalmás P, Clemetson KJ, Nagy B Jr. Distinct effects of Re- and S-forms of LPS on modulating platelet activation. *J Thromb Haemost*. 2013; 11(4): 775-8.
- [96] Freishtat RJ, Natale J, Benton AS, Cohen J, Sharron M, Wiles AA, Ngor WM, Mojgani B, Bradbury M, Degnan A, Sachdeva R, Debiase LM, Ghimbovski S, Chow M, Bunag C, Kristosturyan E, Hoffman EP. Sepsis alters the megakaryocyte-platelet transcriptional axis resulting in granzyme B-mediated lymphotoxicity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 179(6): 467-73.
- [97] Randriamboavonjy V, Fleming I. All cut up! The consequences of calpain activation on platelet function. *Vascul Pharmacol*. 2012; 56(5-6): 210-5.
- [98] Szilágyi B, Fejes Z, Pólska S, Pócsi M, Czimmerer Z, Patsalos A, Fenyvesi F, Rusznyák Á, Nagy G, Kerekes G, Berhész M, Szűcs I, Kunapuli SP, Kappelmayer J, Nagy B Jr. Reduced miR-26b expression in megakaryocytes and platelets contributes to elevated level of platelet activation status in sepsis. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(3): 866.
- [99] Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol*. 2017; 39: 517-28.
- [100] Hack CE, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med*. 2001; 29: S21–S27.
- [101] Montrucchio G, Bosco O, Del Sorbo L, Fascio Pecetto P, Lupia E, Goffi A, Omedè P, Emanuelli G, Camussi G. Mechanisms of the priming effect of low doses of lipopoly-

saccharides on leukocyte-dependent platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost.* 2003; 90(5): 872-81.

[102] Jayachandran M, Brunn GJ, Karnicki K, Miller RS, Owen WG, Miller VM. In vivo effects of lipopolysaccharide and TLR4 on platelet production and activity: implications for thrombotic risk. *J Appl Physiol (1985)*. 2007; 102(1): 429-33.

[103] Jayachandran M, Miller VM, Brunn GJ, Owen WG. Platelet response as a sentinel marker of toll-like receptor 4 activation in mice. *Thromb Res.* 2010; 126(5): 414-7.

[104] Sunderland N, Skroblin P, Barwari T, Huntley RP, Lu R, Joshi A, Lovering RC, Mayr M. MicroRNA biomarkers and platelet reactivity: The clot thickens. *Circ Res.* 2017; 120(2): 418-35.

[105] Kondkar AA, Bray MS, Leal SM, Nagalla S, Liu DJ, Jin Y, Dong JF, Ren Q, Whiteheart SW, Shaw C, Bray PF. VAMP8/endobrevin is overexpressed in hyperreactive human platelets: suggested role for platelet microRNA. *J Thromb Haemost.* 2010; 8: 369–78.

[106] Shi R, Ge L, Zhou X, Ji WJ, Lu RY, Zhang YY, Zeng S, Liu X, Zhao JH, Zhang WC, Jiang TM, Li YM. Decreased platelet miR-223 expression is associated with high on-clopidogrel platelet reactivity. *Thromb Res.* 2013; 131(6): 508-13.

[107] Duan X, Zhan Q, Song B, Zeng S, Zhou J, Long Y, Lu J, Li Z, Yuan M, Chen X, Yang Q, Xia J. Detection of platelet microRNA expression in patients with diabetes mellitus with or without ischemic stroke. *J Diabetes Complications.* 2014; 28: 705–10.

[108] Roderburg C, Luedde M, Vargas Cardenas D, Vucur M, Scholten D, Frey N, Koch A, Trautwein C, Tacke F, Luedde T. Circulating microRNA-150 serum levels predict survival in patients with critical illness and sepsis. *PLoS One.* 2013; 8(1): e54612.

[109] Martin JF, Kristensen SD, Mathur A, Grove EL, Choudry FA. The causal role of megakaryocyte–platelet hyperactivity in acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol.* 2012; 9(11): 658-70.

[110] Harrison P, Goodall AH. "Message in the platelet"--more than just vestigial mRNA! *Platelets.* 2008; 19(6): 395-404.

[111] Lee JH, Park M, Han S, Hwang JJ, Park SH, Park SY. An increase in mean platelet volume during admission can predict the prognoses of patients with pneumonia in the intensive care unit: A retrospective study. *PLoS One.* 2018; 13(12): e0208715.

[112] Vardon Bounes F, Mémier V, Marcaud M, Jacquemin A, Hamzeh-Cognasse H, Garcia C, Series J, Sié P, Minville V, Gratacap MP, Payrastre B. Platelet activation and

- prothrombotic properties in a mouse model of peritoneal sepsis. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 13536.
- [113] Kirschenbaum LA, Adler D, Astiz ME, Barua RS, Saha D, Rackow EC. Mechanisms of platelet-neutrophil interactions and effects on cell filtration in septic shock. *Shock.* 2002; 17(6): 508-12.
- [114] Mukai N, Nakayama Y, Ishi S, Ogawa S, Maeda S, Anada N, Murakami S, Mizobe T, Sawa T, Nakajima Y. Changes in MicroRNA Expression Level of Circulating Platelets Contribute to Platelet Defect After Cardiopulmonary Bypass. *Crit Care Med.* 2018; 46(8): e761-e767.
- [115] Burkhardt J, Blume M, Petit-Teixeira E, Hugo Teixeira V, Steiner A, Quente E, Wolfram G, Scholz M, Pierlot C, Migliorini P, Bombardieri S, Balsa A, Westhovens R, Barrera P, Radstake TR, Alves H, Bardin T, Prum B, Emmrich F, Cornelis F, Ahnert P, Kirsten H. Cellular adhesion gene SELP is associated with rheumatoid arthritis and displays differential allelic expression. *PLoS One.* 2014; 9(8): e103872.
- [116] Tregouet DA, Barbaux S, Escolano S, Tahri N, Golmard JL, Tiret L, Cambien F. Specific haplotypes of the P-selectin gene are associated with myocardial infarction. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(17): 2015-23.
- [117] Fallerini C, Daga S, Benetti E, Picchiotti N, Zguro K, Catapano F, Baroni V, Lanini S, Bucalossi A, Marotta G, Colombo F, Baldassarri M, Fava F, Beligni G, Di Sarno L, Alaverdian D, Palmieri M, Croci S, Isidori AM, Furini S, Frullanti E; GEN-COVID Multicenter Study, Renieri A, Mari F. SELP Asp603Asn and severe thrombosis in COVID-19 males. *J Hematol Oncol.* 2021; 14(1): 123.
- [118] Laffont B, Corduan A, Rousseau M, Duchez AC, Lee CH, Boilard E, Provost P. Platelet microparticles reprogram macrophage gene expression and function. *Thromb Haemost.* 2016; 115(2): 311-23.
- [119] Zhong L, Simard MJ, Huot J. Endothelial microRNAs regulating the NF-kappaB pathway and cell adhesion molecules during inflammation. *FASEB J.* 2018; 32(8): 4070-84.
- [120] Tóth J, Debreceni IB, Deák Á, Pető K, Berhész M, Hajdú E, Szabó J, Németh N, Fülesdi B, Kappelmayer J. Characteristics of thrombin generation in a fulminant porcine sepsis model. *Thromb Res.* 2017; 158: 25-34.

- [121] Águila S, Cuenca-Zamora E, Martínez C, Teruel-Montoya R. MicroRNAs in Platelets: Should I Stay or Should I Go? Platelets, Ed. Steve W. Kerrigan, *IntechOpen*. 2020; doi: 10.5772/intechopen.93181.
- [122] Su M, Fan S, Ling Z, Fan X, Xia L, Liu Y, Li S, Zhang Y, Zeng Z, Tang WH. (2020). Restoring the Platelet miR-223 by Calpain Inhibition Alleviates the Neointimal Hyperplasia in Diabetes. *Front Physiol*. 2020; 11: 742.

10.2 Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/73/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szilágyi Bernadett
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szilágyi, B.**, Fejes, Z., Rusznyák, Á., Fenyvesi, F., Pócsi, M., Halmi, S., Griger, Z., Kunapuli, S. P., Kappelmayer, J., Nagy, B. Jr.: Platelet Microparticles Enriched in miR-223 Reduce ICAM-1-Dependent Vascular Inflammation in Septic Conditions.
Front. Physiol. 12, 1-14, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2021.658524>
IF: 4.566 (2020)
2. **Szilágyi, B.**, Fejes, Z., Pólska, S., Pócsi, M., Czimmerer, Z., Patsalos, A., Fenyvesi, F., Rusznyák, Á., Nagy, G., Kerekes, G., Berhész, M., Szűcs, I., Kunapuli, S. P., Kappelmayer, J., Nagy, B. Jr.: Reduced miR-26b Expression in Megakaryocytes and Platelets Contributes to Elevated Level of Platelet Activation Status in Sepsis.
Int. J. Mol. Sci. 21 (3), 1-22, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21030866>
IF: 5.923
3. **Szilágyi, B.**, Fejes, Z., Pócsi, M., Kappelmayer, J., Nagy, B. Jr.: Role of sepsis modulated circulating microRNAs.
EJIFCC. 30 (2), 128-145, 2019.





További közlemények

4. Pál, I., **Szilágyi, B.**, Nagy, B. Jr., Pál, T., Hódosi, K., Illés, Á., Váróczy, L.: The Impact of Beta-Catenin and glutathione-S-transferase Gene Polymorphisms on the Treatment Results and Survival of Multiple Myeloma Patients.
Pathol. Oncol. Res. 26 (3), 1633-1638, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-019-00747-5>
IF: 3.201
5. Fejes, Z., **Szilágyi, B.**, Kappelmayer, J., Nagy, B. Jr.: Vérlemezke-mikro-RNS-ek expressziójának változása thrombocytaaktivációval járó betegségekben.
Orv. hetil. 159 (47), 1962-1970, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2018.31217>
IF: 0.564
6. Pál, I., Illés, Á., Nagy, B. Jr., **Szilágyi, B.**, Váróczy, L.: β -katenin és glutathion-S-transzferáz génpolimorfizmusok vizsgálata myeloma multiplexben.
Hematol. Transzfuziol. 51 (2), 77-85, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/2068.2018.51.2.5>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,254

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
10,489**

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

Debrecen, 2022.02.07.



11. Tárgyszavak – keywords

Dicer enzim – Dicer enzyme

Endothelsejt aktiváció – endothelial cell activation

Gyulladás - inflammation

Megakaryocita – megakaryocyte

Mikropartikula - microparticle

MikroRNS- microRNA

P-szelektin receptor – P-selectin receptor

Sepszis - sepsis

Vaszkuláris gyulladás - vascular inflammation

Vérlemezke aktiváció – platelet activation

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Nagy Béla** Tanár úrnak, hogy az elmúlt évek alatt a kísérletek tervezésétől, a prezentációk elkészítésén át, a közlemények és az értekezés megírásáig mindenben készségesen segített és mindvégig ösztönözte tudományos tevékenységemet.

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

Köszönetemet fejezem ki a Társszerzőknek, akik a módszerek kivitelezésével és az eredmények interpretálásával nagyban hozzájárultak a közlemények elkészítéséhez.

Köszönöm **Dr. Fejes Zsoltnak**, **Bekéné Dr. Debreceni Ildikónak** és **Pócsi Mariannának**, valamint a Laboratóriumi Medicina Intézet valamennyi munkatársának a segítségét, biztatását, amit a laboratóriumi és adminisztratív munkák során nyújtottak.

Köszönöm **Dr. Pólska Szilárd**, **Dr. Czimmerer Zsolt**, **Dr. Fegyvesi Ferenc**, **Dr. Váradi Judit** és **Dr. Rusznyák Ágnes** metodikai beállításokban nyújtott segítségét.

Külön köszönöm **Dr. Nagy György**, **Dr. Kerekes György**, **Dr. Halmi Sándor**, **Dr. Griger Zoltán**, **Dr. Berhész Mariann** és **Dr. Szűcs Ildikó** klinikus kollégáknak, hogy a betegminták gyűjtésében és a tanulmányok megtervezésében a segítségünkre voltak.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm Férjemnek és Családomnak, hogy mellettem álltak és biztatásukkal folyamatosan támogatták munkahelyi feladataimat.

A kutatómunka a GINOP-2.3.2-15-2016-00043 kódszámú „Szív- és érutatási kiválóságközpont (IRONHEART)” című, az OTKA „Bridging fund”, az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 kódszámú pályázat, az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 Debrecen Venture Catapult Program és a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar támogatásával készült.

13. Függelék

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények gyűjteménye:

1. **Szilágyi B**, Fejes Z, Pólska S, Pócsi M, Czimmerer Z, Patsalos A, Fenyvesi F, Rusznyák Á, Nagy G, Kerekes G, Berhész M, Szűcs I, Kunapuli SP, Kappelmayer J, Nagy B Jr. Reduced miR-26b Expression in Megakaryocytes and Platelets Contributes to Elevated Level of Platelet Activation Status in Sepsis. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(3): 866. doi: 10.3390/ijms21030866.
2. **Szilágyi B**, Fejes Z, Rusznyák Á, Fenyvesi F, Pócsi M, Halmi S, Griger Z, Kunapuli SP, Kappelmayer J, Nagy B Jr. Platelet Microparticles Enriched in miR-223 Reduce ICAM-1-Dependent Vascular Inflammation in Septic Conditions. *Front Physiol.* 2021; 12: 658524. doi: 10.3389/fphys.2021.658524.
3. **Szilágyi B**, Fejes Z, Pócsi M, Kappelmayer J, Nagy B Jr. Role of sepsis modulated circulating microRNAs. *EJIFCC.* 2019; 30(2): 128-145.