

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**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**

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

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

Írta: Debreczeni-Szilágyi Bernadett okleveles klinikai laboratóriumi kutató

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

Témavezető: Dr. Nagy Béla

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, MTA doktora
Prof. Dr. Nagy Bálint, MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Dr. Papp Gábor, PhD
Dr. Nagy Tamás, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

A védés online zajlik. 2022. június 30-án 13:00 órakor

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a szilagyi.bernadett@med.unideb.hu e-mail címre küldött üzenettel a vitát megelőző munkanap (2022. június 29.) 12:00 óráig.

Bevezetés és irodalmi áttekintés

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 vérlemezék prothrombotikus állapotának kialakításához nemcsak a kórokozó és a gyulladásos mediátorok által közvetlenül indukált thrombocytá aktiváció járul hozzá, hanem a csontvelőben a megakaryocyták is ki vannak téve ezen stimulusoknak, ami megváltozott fenotípusú és funkciójú vérlemezék termelődéséhez vezet. Mindebben a megakaryocytá-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 vérlemezék nagy mennyiségben szekretálnak mikropartikulákat a keringésbe, ami a thrombocytá 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 megakaryocytá-thrombocytá 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.

A vérlemezék aktiválódása és annak szerepe szepszisben

A szepszis egy életet veszélyeztető klinikai állapot, amely a szervezet fertőzés által kiváltott kontrollálatlan szisztémás válaszureakciója eredményeként alakul ki. A szepszistől megkülönböztetjük a szeptikus sokkot, amely még súlyosabb metabolikus és celluláris rendellenességekkel jár együtt. 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 kaszkád indukálásához és az ezt kivédő ellenregulációs mechanizmusok, valamint a fibrinolízis gátlásához vezethet, ami súlyos komorbiditásba, ún. disszeminált intravaszkuláris koagulopáthiába (DIC) torkollhat. 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.

A thrombocyták aktiválódása központi szerepet játszik a különböző szepszis indukálta celluláris folyamatok párhuzamos lejátszódásában. A reaktív vérlemezék ugyanis összehangolja a hemosztatikus, a proinflammatorikus, a pathogén elleni immunológiai és a szöveti helyreállító („repair”) folyamatokat. Maguk az aktivált vérlemezék 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 vérlemezékből emellett különböző méretű vezikulák, így pl. mikropartikulák fűződnek le, amelyek többféle thrombocyta funkciót képesek közvetíteni.

Mindezek ellenére a szepszises thrombocyta funkcióra vonatkozóan némileg ellentmondásos adatokat publikáltak. Egyrészt a vérlemezék fokozott felszíni P-szelektin receptor (CD62P) expressziót mutattak, ami a szolubilis P-szelektin magas

plazmaszintjéhez vezetett. Ezen eredmények a thrombocyta emelkedett aktiváltsági állapotát jelezték, amit magas trombospondin szinttel, illetve egy thrombocyta funkciók tesztel (VerifyNow assay) emelkedettnek talált thrombocyta reaktivitási index értékkel is alátámasztottak már a betegség korai szakaszában. Ezzel szemben mások hiporeaktív thrombocytaokról számoltak be szepszisben csökkent *ex vivo* aggregációs képességgel, ami a vérlemezke aktiváció időbeni „kimerülését” jelezheti. A szepszis első fázisában tehát a vérlemezkek 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. A fentiekben említett megváltozott thrombocyta funkciók eredmények háttérében - 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 szepsztikus állapot vizsgálata, vagy más mintatípus feldolgozása.

A P-szelektin receptor vagy CD62P a vérlemezke-aktiváció egyik legérzékenyebb specifikus markere, amely a nem aktiválódott keringő vérlemezkeken 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. A különböző fehérvérsejt alakokkal kialakított sejt-sejt interakciók tovább segítik szepszisben a proinflammatorikus és protrombotikus folyamatok lezajlását. A vérlemezkek fokozott P-szelektin expressziója magasabb halálozási kockázattal járt különösen idősebb szepsztikus betegek esetén, ráadásul a szolubilis P-szelektin emelkedett koncentrációja szoros összefüggést mutatott a szepszishoz társult véralvadási rendellenességek gyakoriságával és a kórkép súlyosságával. A fentiek alapján a vérlemezke P-szelektin expressziójának változása jelentős hatással bír a szepsztikus kórfolyamatok lezajlásában.

Szepszisben a kórokozók inváziójára első vonalban a veleszületett immunrendszer sejtjei, így a monocyták/macrophagok, a granulocyta és a természetes ölksejtek (NK-sejtek) reagálnak, de a veleszületett immunrendszer részét képezik a vaszkuláris endothelsejtek is. Ezeknek a sejteknek a felületén ún. mintázatfelismerő receptorok (Toll-szerű receptorok, TLR) expresszálódnak. Ezekhez kötődnek a kórokozók különböző komponensei (pathogen-associated molecular pattern, PAMP),

valamint az elhalt sejtekből felszabaduló molekulák (damage-associated molecular pattern, DAMP), és ezen interakciók a TLR-eken keresztül intracelluláris szignálútvonalak aktiválódásához vezetnek. Számos TLR receptor, pl. a TLR4 a vérlemezkéken, sőt azok anyasejtjein, a megakaryocytákon (MK) is expresszálódik és funkcionál is. A vérlemezkek TLR4-dependens aktiválódása, az érfalhoz való kitapadása és így a keringésből való kikerülése akár súlyos thrombocytopeniához vezethet, amihez az aktivált vérlemezkek neutrophilek általi szekvesztrálódása is hozzájárul. Egy Gram-pozitív bakteriális fertőzés a TLR2-n keresztül is képes modulálni nemcsak a vérlemezke aktivációt, hanem a trombopoézist és a MK-éretést. Ezen adatok is azt igazolják, hogy a vérlemezkek és az MK-k is aktívan részt vesznek a szepszishez társuló gyulladásos folyamatok kialakításában és annak következményeiben.

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. 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 és részt vesznek olyan alapvető celluláris folyamatokban, mint sejtprolifерáció, differenciálódás, illetve apoptózis, de befolyásolják az összejtképződést és az izomsejt-differenciáció folyamatát is.

A miRNS-ek biogenezeise során első lépésben az elsődleges (primer) miRNS-ek (pri-miRNS) kerülnek átírásra az RNS-polimeráz II aktivitása révén a sejtmagban. Ezt követően a pri-miRNS-ekből az RNáz III-as típusú Drosha endonukleáz aktivitásának köszönhetően 70 bp-os hajtú szerkezetű miRNS-prekurzor (pre-miRNS-ek) alakul ki. 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. 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.

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. 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. 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. Ezzel szemben a nem tökéletes komplementaritás, ahogy általában az állatvilágban és az emberben is jelen van, a transzláció gátlásához vagy a cél mRNS Ago2-függő degradációjához vezet.

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. A miRNS-ek többféleképpen is kijuthatnak az anyasejtekből a környezetükbe és stabilak maradnak a keringésben. A különböző sejttypusokból aktív transzport révén exoszómákba és apoptotikus testekbe, a vérlemezkék esetén főként mikropartikulákba csomagolódva szállítódnak. A miRNS-ek egyik sejtől a másikba történő szállítása történhet RNS-kötő fehérjékhez, pl. Ago2-höz vagy HDL-hez (high density lipoprotein) kötötten is. Ezen transzportmechanizmusok révén a miRNS-ek eljuthatnak és bekerülhetnek a környező vagy akár távoli sejtekbe és megváltoztathatják azok működését.

A vérlemezke miRNS-ek jelentősége

A keringő vérlemezék – bár sejtmaggal nem rendelkezik – 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 vérlemezékbe a csontvelőben. 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. Mára több, mint 500 miRNS-t azonosítottak a vérlemezékben, melyek közül a let-7 család adja a teljes miRNS állomány kb. felét. 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 és az endothelsejt apoptózis kialakulásához is. 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*.

Thrombocyta eredetű mikropartikulák szerepe szepszisben

A vérlemezék 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. Érdekesség, hogy a szekretált mikrovezikulák mennyisége és tartalma nagyban függ a thrombocytát ért stimulus milyenségétől. 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, továbbá különböző betegségek, így kardiovaszkuláris és szeptikus kórképek kialakulásában. 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.

Az endothelsejt aktiváció szerepe szeptikus körülmények között

Szepszisben az aktiválódott vérlemezék számos olyan gyulladáshoz vezető mediátort és citokint bocsát ki a környezetébe, melyek elsősorban az endothelsejtekre és a

fehérvérsejtekre vannak hatással. Az endothelsejtek aktiválódásuk során morfológiai változáson mennek keresztül, melynek során különböző sejtadhéziós molekulákat expresszálnak a felszínükön, pl. intercelluláris adhéziós molekula-1-et (ICAM-1). Mindez elősegíti a reaktív thrombocyták kitapadását a gyulladt érfalhoz megzavarva a vaszkuláris integritást. A vérlemezkék mellett aktivált fehérvérsejtek is interakcióba lépnek a károsodott endotheliummal. Az aktiválódott leukocyták neutrophil extracelluláris hálók (NET) kialakulásához, és a reaktív oxigéngyökök (ROS) képződéséhez vezet, amely tovább ronthatja a mikrovaszkulátúra barrier funkcióját.

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. Mivel a miR-223 az egyik legmagasabb expressziót mutató thrombocyta miRNS és a PMP-kben is nagy mennyiségben jelen van, 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 szövetskárosodással járó elváltozásokat próbálja fékezni és megakadályozni a további destrukciót. Hasonlóan figyeltek meg myocardialis ischaemia-reperfúziós (I/R) károsodást követően, amikor a miR-141 jelentősen csökkentette az ICAM-1 expresszióját a sérült endothéliumon.

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.

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 sejtenyészetekben *in vitro* modelleztük LPS és TNF- α kezelés alkalmazásával és RNS szekvenálással analizáltuk a génextpressziók változásait.
- Vizsgáltuk a Dicer1 enzim expressziójának változását a szeptikus vérlemezkékben és az LPS-stimulált MEG-01 sejtekben.

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 kvantitálása 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.

Anyagok és módszerek

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

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), míg a második vizsgálatba 13 szepszises személyt (10 férfi, 3 nő, életkoruk: medián [IQR] 57 [42–81] év) válogattunk be. A szepszis és szeptikus sokk diagnózisa az American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus kritériumai alapján történt, 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.

Ezzel párhuzamosan az első tanulmányba 21 korban és nemben illesztett egészséges kontroll személyt (14 férfi, 7 nő, életkoruk: 58 [42–65] év), míg a második vizsgálatba 13 kontroll személyt (8 férfi, 5 nő, életkoruk: 54 [43–60] év) vontunk be. 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 bekövetkezte 1 hónapon belül.

Mintavétel és mintafeldolgozás

Leukocyt-depletált thrombocyt minták előkészítése

A leukocyt-depletált thrombocyt (LDP) mintákat anti-CD45 antitesttel konjugált mágneses mikrogöngyökkel (Dynabeads, Invitrogen, Oslo, Norvégia) tisztítottuk a mintavételtől számított 30 percen belül. A vérmintákat először centrifugáltuk (170 g, 15 perc, szobahőmérséklet) és thrombocyt-dús plazmát (PRP) kaptunk. Ezt követően 2 mL PRP-t a mágneses göngyökkel 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.

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.

Thrombocyták in vitro aktiválása mikropartikula termelés generálása céljából

Egészséges egyének (n=6) mintájából készített LDP mintákat TRAP-pal (thrombin receptor activating peptide) (40 µM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kezeltük 2 órán keresztül 37°C-on. A vérlemezkéket ezután centrifugáltuk (1500 g, 15 perc, szobahőmérséklet), és a vérlemezke pellet-et 1 mL, míg a 250 µL thrombocyt felülúszót 750 µL 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 vérlemezkék és a belőlük termelődött mikropartikulák miRNS tartalmát.

Vérlemezke-eredetű mikropartikulák izolálása

A PRP felső részét egy másik csőbe pipettáztuk – közben fokozottan ügyelve a leukocita 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.

Thrombocyták aktivációs állapotának vizsgálata és a mikropartikulák kvantitálása áramlási citometriával

Az áramlási citometria vizsgálatokat egy korábbi közleményünkben leírt protokoll alapján végeztük el. A vérlemezkéek 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 vérlemezkéket 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 analízisakor a thrombocyta aktiváció mértékét a dupla pozitív sejtek eredményéből 10,000 esemény kiértékelésével határoztuk meg.

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.

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.

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. 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.

Az mRNS és prekursor miRNS expressziójának meghatározása

A cDNS készítéséhez a High Capacity cDNA RT kitet (Applied Biosystems) használtuk a gyártó ajánlásának megfelelően. A kiindulási RNS mennyiség a vérelemzések 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 μ M, reverse: 10 μ M 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 miRNS expressziók meghatározása specifikus stem loop primerekkel

A miRNS-ek expresszióját Czimmerer Z és munkatársai által kifejlesztett miRNS-specifikus Universal ProbeLibrary (UPL)-próba alapú stem loop RT-qPCR módszerrel mértük. Ez a módszer két lépésből áll. Első lépésben a miRNS-eket specifikusan írjuk át cDNS-sé. Ehhez a lépéshez TaqMan microRNA reverz transzkripció kitet (Applied Biosystems), miRNS 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-eket (2,5 mM, Thermo Scientific) használtunk.

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.

Sejtkultúrák tenyésztése és kezelése

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 μ g/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.

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. 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 lejártá után a sejteket steril PBS-sel mostuk, majd 750 μ L TRI reagensben lizáltuk és az RNS izolálásáig a mintákat -20°C-on tároltuk. A gyulladásos stimulusk hatására az MK-sejtekben bekövetkező NF- κ B-út vonal aktivációját IL1B mRNS szint meghatározással igazoltuk RT-qPCR módszerrel.

Endothelsejtek tenyésztése és inkubálása szeptizis 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, illetve mások is egyéb vizsgálatsorozatban. 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 szeptizis 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.

Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok

A 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 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 vizsgálatokor egy monoklonális egér anti-humán Dicer1 (1:100) (ab14601, Abcam) antitestet, a szeptikus és kontroll thrombocyták P-szelektin tartalmának detektálásakor 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 órán 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.

A Dicer1 enzim expressziójának represszálása siRNS transzfekcióval kétféle sejtvonalban

A Dicer1 expresszió artificiális 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 sejtés 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 kvantitáltuk RT-qPCR módszerrel.

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

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.

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

A MEG-01 sejtekhez calpain inhibítort, calpeptint (40 μ mol/L, Sigma-Aldrich) adtunk 24 óráig 37°C-on. A különböző sejtmintákat 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.

RNS szekvenálás és a szekvenálási adatok elemzése

Az LPS-sel kezelt MEG-01 sejtek globális transzkripciók 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. Pólska 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 expresszálódnak 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.

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.

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.

Eredmények

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. A 21 beteg közül tizenhárca 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.

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. Ezenkívül megnövekedett átlagos thrombocyta-térfogat (MPV) értékeket ($p < 0,0001$) is mértünk a szeptikus csoportban a normál kontrollokhoz képest.

Eltérő thrombocyta miRNS expressziók szepszisben

A miRNS expressziót először szeptikus betegek thrombocyta mintáiban analizáltuk. Megvizsgáltuk, hogy az aktiválódott thrombocytaiban 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. 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. 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. A vérlemezke miR-26b szintjét szepszisben eddig még nem vizsgálták, ezért a beválogatott szeptikus betegek LDP mintájában kvantitáltuk, és a betegkohorszban szignifikánsan csökkent expressziót ($p = 0.002$) tapasztaltunk a kontrollokhhoz hasonlítva.

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 kvantitáltunk azoknál a betegeknél, akiknél szeptikus sokk alakult ki szemben a szepszises betegekkal ($p = 0.036$). Amikor a teljes betegkohorszot 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. 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.

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 vérlemezkében jelentősen csökkent mindkét agonista hatására. Ezek az eredmények összhangban vannak az *ex vivo* szeptikus vérlemezkékből származó miRNS eredményekkel, amiből arra

következtetünk, hogy az LPS képes modulálni az aktiválódott vérlemezkék RNS tartalmának expresszióját.

Ezt követően vizsgáltuk azt is, hogy a miR-26b cél mRNA expressziójának változása is bekövetkezik-e ezekben az *in vitro* „szepszises” thrombocytákban, így a SELP mRNA expresszióját RT-qPCR módszerrel kvantitáltuk. Mivel korábban beszámoltak arról, hogy az *IL1B* gén expressziója fokozódik szepszises vérlemezkékben, ezért párhuzamosan mi is vizsgáltuk az *IL1B* mRNA expresszióját mint kontroll gént, amely jelentős emelkedést mutatott ($p < 0,05$) a gyulladásos stimulusok hatására. A miR-26b által szabályzott SELP mRNA expresszió - a csökkent miR-26b jelenlétében - szignifikánsan emelkedett mind az LPS, mind a TNF- α által ($p < 0,05$). Ezek az eredmények is arra utalnak, hogy szepszises körülmények között a vérlemezkék egy kifejezett fenotípus változáson esnek át, mely RNS szint átrendeződésével is együtt jár.

Indukált SELP mRNA expresszió a szepszises thrombocytákban

Az *in vitro* aktivált thrombocyta minták után megvizsgáltuk a SELP és *IL1B* mRNA expressziót az *ex vivo* szepszises mintákban is, és mindkét mRNA szint jelentősen emelkedettebb volt szepszisben, mint a kontrollokból származó thrombocytákban ($p < 0,002$; $p < 0,001$). Ugyanakkor nem szignifikánsan, de magasabb volt azoknál a betegeknél, akiknél szepszis sokk alakult ki, vagy akik belehaltak a betegségbe. Tovább elemezve a SELP expressziókat a vérlemezkék MPV értékei alapján szignifikánsan magasabb SELP mRNA 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.

A szepszises betegek vérlemezkéiben kimutatott megemelkedett SELP mRNA 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, pro-koaguláns állapotot biztosít a vérlemezkéknek.

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

Fluoreszcens mikroszkóppal vizualizáltuk a p65 pozitivitást 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.

Génexpressziós változások analízise LPS-sel kezelt MEG-01 sejtekben

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. Ezen belül 354 gén szignifikánsan emelkedett és 1060 gén szignifikánsan csökkent az LPS-aktivált MEG-01 sejtekben a kezeltlen sejtekhez képest.

Az 50 legnagyobb mértékben expresszált gén közé tartozott az általunk részletesen vizsgált *SELP* gén is. Ezek az eredmények összhangban állnak az *ex vivo* septicus vérlemezkékben tapasztaltakkal. Ezek az *in vitro* eredmények azt mutatják, hogy septicus csontvelői környezetben az MK-k érintettsége révén jelentős RNS expresszió változások játszódnak le.

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

Az *ex vivo* sepszes 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. Ez arra utal, hogy ezek a sepszis mediátorok az MK-ban is kiváltják az RNS expresszió változásokat. Mivel az LPS alacsonyabb miR-26b szintet eredményezett a MEG-01 sejtekben, a fentiek igazolására specifikus miRNS mimic-et alkalmaztunk a miRNS „overexpresszálatására” a *SELP* expresszió változásának vizsgálata érdekében. 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-kezelésű kontroll mintákkal. 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.

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. 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. 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.

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 transzekció hatékonyságát RT-qPCR módszerrel ellenőriztük. A kezelés eredményeként a Dicer siRNS expressziója jelentősen megemelkedett, ami azt jelenti, hogy az siRNS sikeresen bejutott a sejtekbe. Az siRNS transzekció alacsonyabb DICER1 mRNS expressziót eredményezett a kontroll mintákhoz képest. Ennek következtében a miR-26b szignifikánsan csökkent ($p < 0,05$) míg a *SELP* mRNS expressziója emelkedést mutatott ($p < 0,05$). Ezzel párhuzamosan mértük a Dicer1 független miR-451 expresszióját is és ennek szintje nem változott a kontroll mintákhoz képest. 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. Amikor a calpain működését gátoltuk és a Dicer1 enzim hasítását a calpeptin megakadályozta LPS jelenlétében, 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 vérlemezkékben, mind a megakaryocytákban.

Szepszisben a vérlemezkék 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 nemből illesztett egészséges személyt válogattunk be. 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.

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

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 kontrollokhöz képest alacsonyabb volt ($p < 0,0001$) míg a keringő miR-223 expressziója szignifikánsan magasabb volt a plazma mintákban ($p < 0,0001$) és a mikropartikulákban ($p < 0,016$).

Annak érdekében, hogy bizonyítsuk a szeptikus vérlemezkékből származó miR-223 kijutását a thrombocytákból, *in vitro* kísérleteket végeztünk. A kontroll LDP mintákat TRAP-al aktiváltuk 2 órán keresztül, majd a thrombocytá felülűszóból 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 felülűszóban magasabb miR-223 szintet figyeltünk meg ($p = 0,023$) a kezelés után. Ezen eredmények alapján azt gondoljuk, hogy a vérlemezke aktiváció a thrombocytá miRNS-ek jelentős externalizációját eredményezi szepszisben és a kiszabadult miRNS-ek - mint vektorok - különböző információkat közvetíthetnek a környezetükbe.

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, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy szepszisben a miRNS transzfer a vérlemezkékből 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. A negatív kontroll minták esetén a HCAEC sejtekhez nem adtunk mikropartikulákat, 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. Ezen eredményeink azt mutatják, hogy a szepszisben termelődő vérlemezke mikropartikulák fokozottabban jutnak be az endothelsejtekbe, mint az egészséges mintákból származóak.

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, ezzel szemben ezekben a mintákban az ICAM1 mRNS expressziója jelentősen csökkent ($p = 0,031$). Ezen eredmények megerősítésére a HCAEC sejteket *in vitro* TRAP-aktivált vérlemezkékből 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 nött 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. 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. 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.

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. 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 szépszises mikropartikulák HCAEC-be történő felvétele jégen (4°C-on) szinte teljesen gátolt volt a 37°C-on inkubált sejtekhez képest. 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 kvantitálásához. Megállapítottuk, hogy a jégen tartott HCAEC mintákban nem következett be jelentős miRNS expresszió változás ($p = 0,969$), míg a szépszises mikropartikulával inkubált sejtek normál sejtenyésztési körülmények között megemelkedett miR-223 értéket mutattak a kontroll mintákhoz képest ($p = 0,004$). Ezek az eredmények megerősítik, hogy a megnövekedett miR-223 expressziót a HCAEC-ekben közvetlenül a miRNS-t hordozó mikropartikulák endocitózisa okozta.

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 szépszises 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 kvantitáltuk 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 ($p = 0,929$). 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 transzfekció hatékonyságát. A transzfekció alacsonyabb DICER1 mRNS-t

eredményezett a NEG01 siRNS-sel kezelt mintákhoz képest. 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. 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.

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 szeptikus körülményekben az alacsonyabb ICAM-1 expresszió mellett. Ebben a kísérletben a HCAEC sejteket TNF- α 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-eket 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-eket adtunk a HCAEC sejtekhez. A szepszisből 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. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a PMP-k szállította miR-223 által csökkentett ICAM-1 receptor szint a leukocyták alacsonyabb mértékű kötődését vonja magával az endothelsejtek felszínén.

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. 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. 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. Habár a thrombocyták sejtmaggal nem rendelkeznek, az MK-eredetű RNS-ek nagy készletét hordozzák magukban és juttatják el más sejtekhez bizonyos stimulusok hatására.

A gyulladáshas folyamatokban kulcsszerepet játszó TLR-ek közül a TLR4 receptor is megtalálható mind a thrombocytákon, mind az MK-k felszínén. Szepszisben a thrombocytákat az LPS képes direkt módon stimulálni a TLR4-en keresztül a keringésben, ami más vérlemezke agonisták által kiváltott sejtaktiváció potenciózását jelenti. Ezért a TLR4 receptornak fontos szerepe van a thrombocyták szepszisben bekövetkező fenotípusának és abnormális működésének kialakításában. Ezen felül a TLR2 receptoron keresztül indukálódó intracelluláris folyamatok szabályozzák az MK-k működését is, ami kihat az MK-thrombocytá vonal működésére, így pl. fokozott GPIb és COX-2 fehérje expressziót okozva. 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 dózisú 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. Összeségében minden olyan trigger, amely az MK-t érinti a csontvelőben, a thrombocyták „előaktivált”, pro-trombotikus fenotípusát eredményezheti szepszisben, ami a vér nagyobb prokoaguláns aktivitásához is vezethet.

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

A disszertáció alapját képező első vizsgálatsorozatunkban ezért szeptikus betegektől izoláltunk nagy tisztaságú, fehérvérsejt-depletált thrombocyta mintákat, és első lépésként a miRNS-profilt 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 vérlemezkékben. A szeptikus csoportban a fokozott thrombocyta aktiváció háttérében detektáltuk a fokozott *SELP* (P-szelektin) génexpresszióját szabályozó miR-26b csökkent expresszióját, mint ahogyan korábban diabeteses vérlemezke és hyperglikémiás MK sejt kultúrában tettük. 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 koronárisbetegségben vagy diabetesben.

A szeptikus vérlemezkék 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 vérlemezkékben leírtak. Fontos kiemelni, hogy amikor a thrombocyták méretét és reaktivitását kifejező MPV értékek 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 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.

Az LPS indukálja az NF- κ B útvonalat a MEG-01 sejtekben, amelyet a p65 fokozott nukleáris transzlokációjával fluoreszcens mikroszkóppal vizualizáltunk. RNS szekvenálással 1060 szignifikánsan csökkent és 354 nagyobb mértékben expresszálandó transzkriptet detektáltunk. Ezen eredmények alapján a *SELP*-et az 50 legnagyobb mértékben expresszálandó gén között azonosítottuk. Ezt követően validáltuk a *SELP* expresszió változását LPS-stimulált MEG-01 sejtekben RT-qPCR-rel, 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. A megváltozott génexpresszió transzkripció és transzláció eseményeket eredményezhet az MK-thrombocyta tengelyben, ami változatos fenotípusú vérlemezkék termelődéséhez vezethet.

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 miR-26b-nek a SELP mRNS expresszióra gyakorolt hatását ezen gyulladásos körülmények között MEG-01 sejtekben megerősítettük specifikus miRNS mimic segítségével.

Szepszisben nem voltak korábbi adatok arról, hogy a kóros Dicer1 enzim aktivitás/szint miként változtatja meg az intracelluláris miRNS expressziót. Vizsgálataink során a Dicer1 fehérjeszint csökkenését figyeltük meg a szeptikus betegek thrombocyta lizátumában. Hasonlóképpen az LPS-stimulált MEG-01 sejtek csökkent Dicer1 expressziót mutattak. A Dicer1 enzim működésének közvetlen vizsgálata siRNS-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 mRNS expresszió mind a vérlemezkékben, mind az MK-ban. Ennek megfelelően az LPS-re vagy TNF- α -ra adott válaszként megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció olyan

calpain funkcióhoz vezet, amely hasítja a Dicer1 enzimet, és így kevesebb érett miRNS termelődik. 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 hyperglikémiás környezetben a MEG-01 sejteket vizsgáltuk. 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 vérsejtekben kimutatott magas *SELP* expressziót kockázati tényezőként írták le rheumás ízületi gyulladásban, valamint a *SELP* gén S290N és N562D polimorfizmusát összefüggésbe hozták a myocardialis infarktus magasabb kockázatával, illetve nemrégiben a *SELP* gén Asp603Asn polimorfizmusát hozták összefüggésbe súlyos thrombotikus szövődmények kialakulásával COVID-19 betegekben. Ugyanakkor az indukált *SELP* expresszió jelentőségét bakteriális szepszisben korábban még nem vizsgálták sem a vérlemezék, sem az MK-k működése szempontjából.

A stimulálódott thrombocyták aktiválódását egyrészt a mikropartikulák lefűződése, másrészt – részben ennek részjelenségeként – a vérlemezke miRNS-ek szekréciója kíséri a keringésben. A kiszabadult miRNS-ek bejuthatnak a macrophagokba és az endothelsejtekbe, ahol szabályozzák a különböző gyulladásos folyamatokat és a sejtadhéziós molekulák expresszióját. Nem állnak rendelkezésre olyan eredmények, hogy a thrombocytá miR-223 kifejezetten szeptikus körülmények között miként tudja befolyásolni az endothelium ICAM-1 expresszióját. Ezért *in vitro* kísérleteket végeztünk 13 szeptikus beteg és 13 egészséges kontroll személy mintájának a bevonásával. A vérlemezék fokozott aktiválódását ezúttal is a magas felszíni P-szelektin expresszióval igazoltuk, hasonlóan a másik szepszises vizsgálatunkhoz és megnövekedett PMP mennyiséget detektáltunk szepszisben a kontrollokhoz képest. A szolubilis ICAM-1 szintet vizsgálva a szeptikus szérumokban szignifikáns emelkedést találtunk a kontroll csoporthoz képest, ami az endothelsejtek fokozott aktivációját jelzi.

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 thrombocytákban, 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 mechanizmosok 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 szepszisben fokozott trombinképződés által indukált vérlemezke aktivációt és a thrombocyta pelletben és felülúszóban is megvizsgáltuk miR-223 expressziót. A TRAP-pal aktivált thrombocytákban 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. Mivel az endothelium a keringő mikrovezikula tartalom fontos célpontja a szív- és érrendszeri megbetegedésekben, valamint a gyulladásos kórképekben, 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. 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. Ezután megfigyeltük a szepszises PMP-k hatását az endothelsejtek működésére „szekretált” miRNS-ek révén. A HCAEC sejteket előkezeltük szepszises PMP-vel, amelyek megnövekedett miR-223 expressziót mutattak, míg az ICAM1 mRNS 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 mRNS szintet a kontroll mintához képest, míg a TRAP-aktivált PMP-k jelenlétében a magasabb miR-223-at csökkent ICAM1 expresszióval detektáltuk. Az

endothelsejtek felülűszójában 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. 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 trombocytákból származik, a keringő miRNS-ek egy jelentős hányada az aktivált vérlemezkékből más sejttípusokba kerül és befolyásolja azok génexpresszióját.

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 szepszises 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.

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.

A disszertáció alapját képező két szepszises vizsgálatsorozat eredményeinek összesítéséből azt gondoljuk, hogy a szepszis során felszabaduló bakteriális mediátorok (pl. LPS) nemcsak a vérlemezkéket stimulálják a keringésben, ami fokozott thrombocytá aktivációhoz és akár thrombusképződéshez vezethet, hanem az LPS a keringés útján bejuthat a csontvelőbe, ahol az MK sejteket direkt módon tudja aktiválni, és ez pro-thrombotikus 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 thrombocytá miRNS expressziók kialakításában mindkét mechanizmus egyszerre résztvehet. Ugyanakkor érdekes adat az is, hogy az aktiválódott vérlemezke funkció következménye nemcsak a kóros alvadási zavarok bekövetkezte, hanem a túlzott mértékű, akár elhúzódó endothelsejt aktiváció/károsodás kompenzációja is. Ezeken komplex folyamatok részleteinek a vizsgálatára további kutatások szükségesek.

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 szeptikus 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 szeptikus vérlemezkék a magas felszíni P-szelektin pozitívás 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 szeptikus thrombocytákban a csökkent miR-223 expresszió mellett emelkedett keringő miR-223 szint volt a szeptikus 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 kontrollokhöz képest, és az endothelsejtekben a mikropartikulák által megnöött miR-223 szint csökkentette a gyulladás indukálta ICAM-1 expressziót.

Az értekezés új tudományos eredményei

1. A szepszis 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.



**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.



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.