

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

3146.

SALLAI IMRE

A támasztó és mozgató szervrendszer működésének fiziológiája
című program

Programvezető: Dr. Szőke György, egyetemi tanár
Témavezető: Dr. Skaliczki Gábor, egyetemi docens

Extracelluláris vezikulák vizsgálata szeptikus és aszeptikus periprotetikus ízületi folyadékban

Doktori értekezés

Dr. Sallai Imre

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Skaliczki Gábor PhD. habilitált egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Kiss Sándor, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Klemencsics István, Ph.D., osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. med. habil. Szijártó Attila Ph.D.
egyetemi docens, igazgató
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Papp Károly, Ph.D., adjunktus
Dr. Fekete András, Ph.D., főorvos

Budapest
2024

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
1. BEVEZETÉS	7
1.1 Történelmi áttekintés	7
1.2 Irodalmi áttekintés	8
1.3. A periprotetikus fertőzések típusai, diagnosztikai lépések	8
1.4. A periprotetikus fertőzések diagnosztikai kritériumainak fejlődése.....	11
1.5. A biofilm asszociált fertőzések.....	20
1.6. Tenyésztés negatív esetek, szonikáció.....	22
1.7. A biomarkerek szerepe a periprotetikus fertőzések diagnosztikájában.....	24
1.8. Az extracelluláris vezikulákról általában.....	29
1.9. A neutrofil granulociták szerepe a bakteriális fertőzés elleni védekezésben	32
1.10. A neutrofil granulocitákból származó extracelluláris vezikulák.....	33
1.11. A neutrofil granulocitákból származó extracelluláris vezikulák azonosítása.....	35
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	37
3. MÓDSZEREK.....	39

3.1.	Beteganyag.....	40
3.2.	Vezikula preparálás lépései szinoviális folyadékból.....	41
3.2.1.	A mintavétel menete	41
3.2.2.	A levett minta transzportja	41
3.2.3.	Alacsony fordulatszámon való első ülepítés	42
3.2.4.	Hyaluronidáz enzimmel történő emésztés	42
3.2.5.	A minta szűrése 1,2 és 0,8 µm-es szűrőn keresztül	43
3.2.6.	A minta magas fordulatszámú ülepítése	43
3.3.	Az izolált extracelluláris vezikulákon elvégzett vizsgálatok.....	47
3.3.1.	Az áramlási citometriai vizsgálat	47
3.3.2.	Tömegspektrometriai mérés (LC-MS analízis).....	49
3.3.3.	Nanoparticle tracking analysis (NTA).....	51
3.3.4.	Elektronmikroszkópos vizsgálat (Transmission Electron Microscopy TEM)	52
3.3.5.	Mikrobiológiai vizsgálat.....	53
3.3.6.	Statisztikai elemzések.....	53
4.	EREDMÉNYEK	54
4.1.	Áramlási citometria mérések eredményei	54
4.2.	Tömegspektrometriai elemzés (LC-MS analízis).....	59

4.2.1.	Az akut és a krónikus szeptikus mintákból izolált extracelluláris vezikulák fehérjéi közti azonosságok.....	63
4.2.2.	Az akut és a krónikus szeptikus mintákból izolált extracelluláris vezikulák fehérjéi közti különbségek.....	67
4.3.	Nanoparticle tracking analysis eredményei	70
4.4.	Morfológiai leírás TEM segítségével	71
4.5.	Mikrobiológiai vizsgálat eredményei.....	73
5.	MEGBESZÉLÉS	74
6.	KÖVETKEZTETÉSEK.....	82
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	84
	SUMMARY	85
8.	IRODALOMJEGYZÉK	86
9.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	104
9.1.	A tézis témájához kapcsolódó publikációk	104
9.2.	A tézis témájához közvetlenül nem kapcsolódó publikációk.....	105
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	107

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

21G	21 gauge
A647	Alexa Fluor 647
ABP	annexin binding puffer
ACD-A	ACD-A Anticoagulant Citrate Dextrose Solution
ADA	adenozin
ADP	adenosine diphosphate
ASA	American Society of Anesthesiologists Classification
ATP	adenosine triphosphate
C	complement
CFB	complement factor B
CFH	complement factor H
CIN	count in network
CRP	C-reaktív protein
DAIR	Debridement Antibiotics and Implant Retention
DAMP	damage-associated molecular pattern – károsodáshoz kapcsolt molekuláris minta.
DNS	dezoxiribonukleinsav
EBJIS	European Bone and Joint Infection Society
ELISA	enzimhez kötött immunszorbiens próba
ESCRT	(endosomal sorting complexes required for transport) a szállításhoz szükséges endoszomális szortírozó komplexek
EV	extracelluláris vezikula
FDR	false discovery rate
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
fMLP	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
HPF	High-power field
HLA-DRA	humán leukocyaantigén, DR-alfa
HMWP	high-molecular-weight polyethylene
HPLC-MS	high performance liquid chromatograph-mass spectrometry
HSP90	hősokkprotein-90

ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
ICM	International Consensus Meeting
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin 6
ISEV	International Society for Extracellular Vesicles
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Gének és genomok kiotói enciklopédiája
kDa	kilodalton
LBP	Lipopolysacharid binding protein
LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry
LE	leukocita észteráz
MAC	membrane attack complex - membránkárosító komplex
MHC	major histocompatibility complex - fő hisztokompatibilitási komplex
MIC	minimális inhibitoros koncentráció
MISEV	Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles
mRNS	messenger - hírvivő ribonukleinsav
miRNS	mikro-ribonukleinsav
NETs	neutrophil extracellular traps
NTA	Nanoparticle tracking analysis
OsO4	Osmium tetroxide
PBS	Phosphate-buffered saline
PCT	procalcitonin
PE	Phycoerythrin
PERCP_CY55	Peridinin-chlorophyll-protein complex
PJI	Periprosthetic joint infection
PKM	pyruvate kinase, muscle - piruvátkináz, izom
PMN	polymorphonuclear leukocytes
PPI	periprotetikus infekció
RCF	Relative Centrifugal Force

SE TUKEB	Semmelweis Egyetem, Tudományos és Kutatásetikai Bizottság
SSI	surgical site infection
TEM	Transmission Electron Microscopy
TNF- α	tumor nekrosis faktor-alfa
WBC	White Blood Cells
We	vörösvértest süllyedés
α 2M	alpha-2-macroglobulin

1. BEVEZETÉS

1.1. Történelmi áttekintés

A protézis fertőzések kialakulása egyidős az implantátumok beültetésének megkezdésével. A modern kori csípőízületi artroplasztika úttörője Sir Jonh Charnley az első protézis beültetését 1962. november 22-én végezte a Wrightington kórházban (1). A művi ízfelszínnek alacsony súrlódási elvén alapuló protetizálás lényege, hogy kis átmérőjű protézis fej néz szembe egy műanyag vápa komponenssel. Mindkét komponens csontcementtel rögzült a megfelelő pozícióban. A vápa eleinte teflonból készült, azonban kb. három év után a nagy mennyiségű kopástermék jelentős szöveti reakciót indított el a protézis körül. Ekkor merült fel a nagy molekulatömegű polietilén (HMWP) használata, ami már elfogadható eredményeket ígért.

A kezdeti mechanikai problémák megoldása mellett azonban egy hasonlóan nehezen megoldható szövődménnyel kellett szembe nézniük: a mélyen a protézis körül kialakuló fertőzéssel. Az első 100 csípőprotézis beültetés után a betegek közel 10%-ánál alakult ki ez a szövődmény. Sir John Charnley munkássága során nagy figyelmet fordított a műtéti beavatkozásokkal összefüggésben kialakuló bakteriális fertőzésekre. Véleménye szerint amennyiben ez az arány nem csökken legalább 5% alá, akkor meg kell fontolni, hogy csak idős és nagyon súlyos fogyatékossgal élők esetében kerülhet elvégzésre a protézis beültetés és a fiatal munkaképes embereknél a kisebb fertőzési kockázattal járó műtéti típusra kell visszatérni (pl. oszteotómiák) (2).

A technika fejlődésével (laminar air-flow, aszeptikus eljárások, megfelelő antibiotikum profilaxis, műtéti idő rövidülése, antibiotikumos csontcement) a fertőzések aránya jelentősen csökkent. Az Amerikai Egyesült Államokban 2001-2009. között a primer csípő-, térdprotézisek 2,0-2,4%-a került revízióra a korai, ill. low-grade fertőzés miatt (3). Azonban a folyamatosan növekvő primer, valamint revíziós műtétek számának növekedése miatt a fertőzések komplikációk nem vesztek jelentőségükből. Az Amerikai Egyesült Államokban 2005-ről 2030-ra várhatóan a teljes csípőízületi revíziók száma 137%-kal, a térdízületi revíziók száma 601%-kal fog emelkedni (4). A periprotetikus infekciók (PPI) ellátása nagy terhet ró az adott ország egészségügyi ellátó rendszerére és gazdaságára a megnövekedett költségek és elhúzódó kórházi tartózkodás

miatt. A betegeknek pedig második esetleg harmadik műtéti beavatkozást, lassabb mobilizációt, hosszabb gyógyszereszedést jelent.

1.2. Irodalmi áttekintés

Bár a szeptikus szövődmények kezdetben tapasztalt magas aránya lecsökkent, a komplikáció azonban nem tűnt el teljesen. A nemzetközi irodalom alapján a beültetett primer csípőprotézisek 0,8-1%-ánál, a primer térdprotézisek 2%-ánál alakul ki szeptikus szövődmény (5). Revíziós csípőprotézis műtéteknél 3-4%, térdprotézis esetében 5-6% a szeptikus komplikációk aránya. A probléma súlyosságát jól jelzi, hogy a kialakult periprotetikus fertőzések öt éven belüli mortalitása magasabb, mint az öt leggyakrabban diagnosztizált daganatos megbetegedésé (6). A regisztrált szeptikus esetek száma vélhetően alul becsült a valós esetekhez képest a diagnosztikai nehézségek okán fel nem ismert és aszeptikus lazulásnak véleményezett esetek miatt (7, 8).

Zmistowski és munkatársai által közölt adatok rendkívül magas, 10,6%-os egy éves és 25,9%-os öt éves mortalitást mutatnak (9). Cancienne és munkatársai 7146 beteg vizsgálata után ennél alacsonyabb, 6,5%-os egy éves mortalitást állapítottak meg (10). Ezek természetesen átlagos számok, azonban, ha valaki magasabb ASA besorolásba (American Society of Anesthesiologists Classification) esik, dohányzik, szövődményes cukorbeteg, krónikus tüdőbetegségben szenved ez az esély arányosan romlik és a PPI kockázata fokozódik. Ezen adatok ismeretében kijelenthetjük, hogy a periprotetikus infekció az egyik legrettegettebb szövődménye az ízületi implantátum beültetésnek. Nagy kihívás elé állítja az ortopéd sebészeket és az ellátórendszert diagnosztika és kezelés terén is, valamint igen nagy megterhelést jelent a betegeknek.

1.3. A periprotetikus fertőzések típusai, diagnosztikai lépések

Etiológiai szempontból a protézis infekcióknak négy típusát kell elkülönítenünk. Az első a műtét után elhúzódó sebváladékozás (savózás) infekciós jelek nélkül, ami inkább potenciális infekciós lehetőség, de még nem fennálló fertőzés. A második a korai akut, műtét utáni infekció (SSI – surgical site infection), ami a műtétet követő közvetlen posztoperatív négy héten belül jelentkezik. A harmadik a krónikus infekció, amit low-

grade fertőzésnek is szokás nevezni, ami a műtétet követő 4-6 héten túl kezd panaszokat okozni. A negyedik pedig a késői akut, hematogén szórással kialakult protézis infekció, mely a műtét után évekkel később bármikor kialakulhat (11). Ezen kívül szóba jöhet az is, hogy késői hematogén szórás alkalmával alacsony virulenciájú kórokozó kerül a protézis közelébe, ami akután nem okoz fellángoló gyulladást, de hosszútávon a protézis kilazulását okozhatja, amit később mechanikai lazulásnak gondolhatunk.

A fent felsorolt különböző típusú periprotetikus infekciók tünettanának további részletezése, jellemzése nem célja a dolgozatnak. Azonban a kivizsgálás menetéről, diagnosztikus algoritmusról mindenképpen érdemes szót ejteni.

Mint minden kivizsgálás az akut szeptikus eseteké is mindig fizikális vizsgálattal, állapotfelméréssel kezdődik. Ezt követik a szerológiai vizsgálatok és a képalkotó diagnosztika, valamint ízületi punkció (1. ábra) (11). Az 1. ábrán látható második lépés a szeptikus állapot eldöntésére vonatkozik. Itt főként a szisztémás, sürgősségi ellátást indokló szeptikus állapot felismerése a legfontosabb.

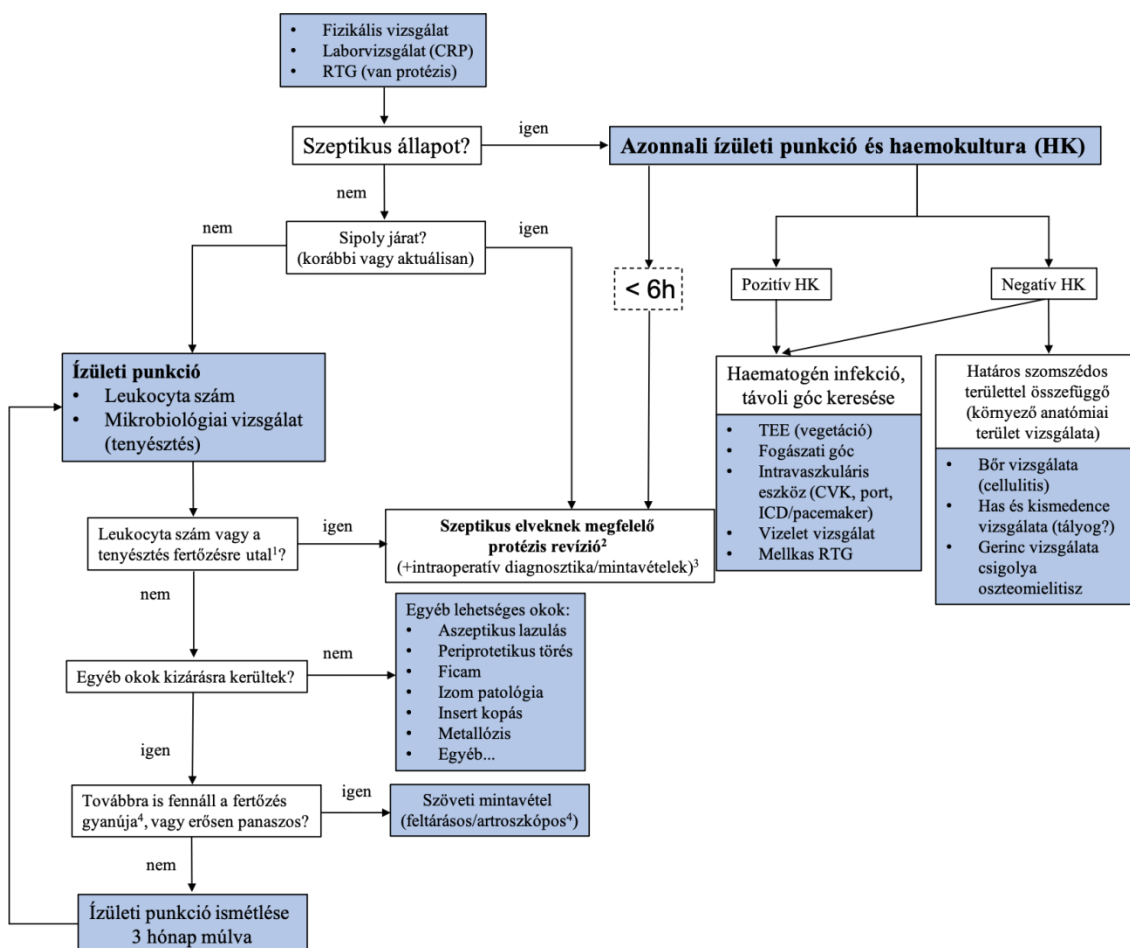
A krónikus vagy más néven low-grade infekció miatt kialakult protézis lazulásra jellemző, hogy „csendben” alakul ki és nem jár kifejezetten markáns gyulladással, vagy nem okoz szisztémás szeptikus állapotot. Ezekben az esetekben a fent említett (akut PPI diagnosztika) lépéseket folytatjuk és ízületi punkciót végzünk (12). Az ízületi szúrás alkalmával nyert szinoviális folyadékban a következő laborvizsgálatokat szükséges elvégezni: ízületi folyadék fehérvérsejt szám meghatározás, PMN%, üledék vizsgálat, laktát-szint mérés, szinoviális CRP (13-15). Mikrobiológiai vizsgálatra hemokulturás palackban javasolt a mintát elküldeni (16), mert az elvégzett tenyésztések találati arányát duplájára növeljük, mintha transzport táptalajba küldenénk a mintát (17, 18).

Ez után következnek az újabb, diagnosztikus lehetőségek, melyek elvégzéséhez szintén szinoviális folyadékra van szükség. Könnyen elérhető, olcsó megoldás a leukocita észteráz (LE) teszt, mely igen elterjedt szemikvantitatív vizsgálati módszer. Vizelet gyorseszteszt segítségével lehet az ízületi folyadékban LE-t detektálni (19, 20). Negatív prediktív értéke 100%-os (21), vagyis negatív eredmény esetén nagy biztonsággal

elfogadhatjuk, hogy nem áll fenn periprotetikus fertőzés, azonban bizonyos körülmények befolyásolják (pl.: vér a mintában) és álpozitív eredményt adhat.

Az alfa defenzin, mint biomarker kimutatása ízületi folyadékból szintén segítheti a diagnosztikát. Szenzitivitása és specificitása a jelenleg ismert biomarkerek közül az egyik legmagasabb (22) és lateral flow gyorseszteszt formájában (Synovasure®) elérhető a mindennapi gyakorlatban. Rutinszerű használatát leginkább a piaci ára korlátozza.

A PPI diagnosztikájában további biomarkerek szerepét is vizsgálják folyamatosan, melyek a hétköznapi rutinba még nem kerültek be. Ezek külön fejezetben kerülnek tárgyalásra.



1. ábra; A Pocket Guide to Diagnosis & Treatment of PJI, PROIMPLANT Foundation (version 9, October 2019); adatainak lefordítása és adaptációja alapján készült kivizsgálási lépés sorozat.

A PPI diagnosztikája az utóbbi években sokat fejlődött. Számos törekvés volt az egyetlen és legjobb diagnosztikus marker megtalálására, ami százszázalékos szenzitivitással és specificitással megmutatja, hogy fennáll-e PPI vagy sem. Ez a kérdés leginkább a low-grade infekciók esetében fontos, ahol a legnehezebb eldönteni, hogy a protézis komponens lazulása szepszikus vagy mechanikai okokra vezethető-e vissza.

1.4. A periprotetikus fertőzések diagnosztikai kritériumainak fejlődése

A mindennapi kezelés során vannak egyértelmű esetek és könnyen meghozható döntések. Ezek általában a fent felsorolt elhúzódó seb váladékozás, akut (SSI), valamint a késői haematogen infekciók magas szepszikus labor gyulladási paraméterekkel, esetleg szepszikus shock állapotával szövődve, illetve a krónikus sipolyozó, esetleg felszínre kerülő protézissel.

A diagnózis általában laboratóriumi vizsgálatokra, például szérum és szinoviális folyadék vizsgálatra, szövetminták vagy szinoviális folyadék mikrobiológiai vizsgálatára, valamint szövettani és röntgenvizsgálati eredményekre támaszkodik. Az utóbbi években erőfeszítéseket tettek a diagnosztikai pontosság javítására. Azonban a hétköznapiakat megnehezítő alacsony virulenciájú kórokozók által okozott lazulások esetében, kifejezetten nehéz a helyes kezelési terv felállítása. A nehézséget az adja, hogy sokszor a diagnosztikus lépéseken végighaladva a vizsgálatok eredményei egymással nem állnak teljesen összhangban. Sokszor látunk radiológiai lazulásra gyanús jeleket a röntgenfelvételen, miközben a gyulladási paraméterek között alig, vagy egyáltalán nem találunk emelkedett értékeket, az ízületből vett minta mikrobiológiai vizsgálata pedig negatív lehet. Másrészt pedig könnyen abba a hibába eshetünk, hogy a nem szepszikus esetet is szepszikusként kezeljük, vagyis „túl diagnosztizáljuk” azt.

Továbbá a diagnosztikai nehézségeket az is okozza, hogy nem áll rendelkezésre egy olyan vizsgálat, ami teljes biztonsággal megerősítené, vagy kizárná a periprotetikus fertőzés lehetőségét. Ez a probléma felismerésre került, ezért különböző országok nemzeti egyesületei eleinte külön-külön, majd később összefogva igyekeztek megtalálni a leghatékonyabb diagnosztikai lépéssorozatot. Az első, elterjedten használt kritérium rendszert (MSIS – Musculoskeletal Infection Society) 2011-ben Parvizi és munkatársai

(23) közölték, amit két évvel később, 2013-ban az amerikai infektológus társaság (IDSA – Infectious Diseases Society of America) ajánlása követett (24). Az MSIS-kritériumokkal ellentétben az IDSA-kritériumok nem hangsúlyozzák az emelkedett gyulladási markereket, hanem más tényezőket vesznek figyelembe, mint például egyetlen tenyészetből izolált virulens kórokozót, vagy akut gyulladás jelenlétét a protézis körüli anyag szövettani vizsgálatából (25).

Ez után került megrendezésre 2013-ban, majd 2018-ban Philadelphiában az International Consensus Meeting (ICM), melyek nagy eredménye, hogy 2013-ban kidolgozásra került a PPI definíció, valamint a leukocita észteráz teszt bevezetésre került (26), majd később további pontosítással megszületett az a diagnosztikus kritérium rendszer, ami megpróbálja egzakt adatok segítségével elkülöníteni a szeptikus és aszeptikus komplikációkat (27). Ez alapján major és minor kritériumok kerültek megfogalmazásra.

Az európai társaság is jelentős energiákat fordít arra, hogy folyamatosan lépést tartson és utat mutasson a nehéz kérdések megválaszolásában. A European Bone and Joint Infection Society (EBJIS) által is kidolgozásra került egy ajánlás a diagnosztikus algoritmus és kritériumok használatára (28). Ebben a kritériumrendszerben a felmerülő PPI lehetőségét „nem valószínű”, „valószínű” és „biztos” csoportokba sorolja. Mindezek a kritériumok különböző klinikai, laboratóriumi, mikrobiológiai és szövettani elemzésekre, valamint intraoperatív leletekre támaszkodnak a diagnózis felállításához. A témában született már összehasonlító közlemény, mely a két diagnosztikai kritérium rendszer specificitását és szenzitivitását hasonlítja össze. A szerzők beszámolója alapján az EBJIS kritériumok szenzitivitása magasabb, mint az ICM 2018 szenzitivitása (29).

Annak ellenére, hogy az elmúlt évtizedekben a különböző PPI-kritériumok bevezetésével a diagnosztikus pontosság javult, a PPI-re rendkívül specifikus és érzékeny új biomarker azonosítása lehetővé tenné ennek a komoly következményekkel járó betegségnek a könnyebb és pontosabb diagnosztikáját, ami javítaná és standardizálni tudná az amúgy is nehéz ellátást. A pontos összehasonlíthatóság kedvéért az 1. táblázatban ábrázolásra kerültek az MSIS, IDSA, ICM2013, ICM2018 és EBJIS által használt kritériumok. Itt látható a kritériumrendszerek fejlődése, majd pedig a ma is

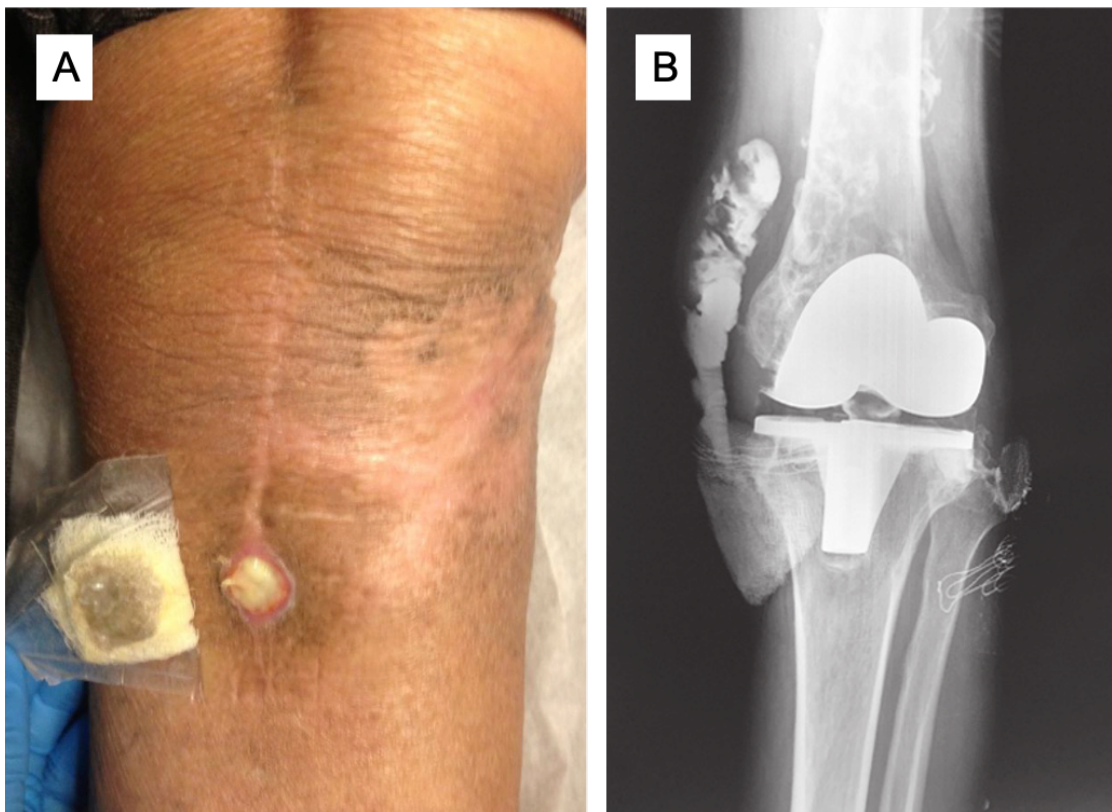
rutinszerűen leginkább használt két kritériumrendszer az ICM2018 és EBJIS kritériumok kerülnek bővebben kifejtésre. (25).

1. táblázat; A leggyakrabban használt diagnosztikus kritérium rendszerek és azok idővel való átalakulása. A táblázatban összehasonlításra kerül, hogy melyik diagnosztikus kritérium rendszer milyen paramétereket vizsgál.

	MSIS	IDSA	ICM2013	ICM2018	EBJIS
Klinikai jelek					
ízülettel kommunikáló sipoly	✓	✓	✓	✓	✓
purulens váladék	✓	✓	X	✓	✓
vérserum vizsgálat					
CRP (mg/L)	↑	X	10	10	> 10
ESR (mm/hr)	↑	X	30	30	X
D-Dimer (ug/L)	X	X	X	30	X
Ízületi folyadék vizsgálat					
Leukocita szám (sejt/uL)	✓	X	3.000	3.000	>1.500
ízületi PMN (%)	↑	X	90	70	>65
Ízületi folyadék biomarkerek					
alfa defensin	X	X	X	1.0	✓
leukocita észteráz	X	X	+ / ++	++	X
Mikrobiológia					
tenyésztés	≥ 1	≥ 1	✓	✓	≥ 1
szonikáció (CFU/ml)	X	X	X	X	≥ 1
Szövettan					
High-power field (400x nagyítás)	>5 neutrofil per hpf 5 phf-ben	✓	>5 neutrofil per hpf 5 phf-ben	✓	>5 neutrofil egy phf-ben
Egyebek					
Nukleáris medicina (WBC scintigráfia)	X	X	X	X	✓

Az ICM 2018-as konszenzus találkozó során kialakított diagnosztikai kritérium rendszer major és minor kritériumokat fogalmaz meg. Amennyiben a major kritériumok közül egy teljesül, a periprotetikus infekció diagnózisa kimondható, minor kritériumot nem szükséges tovább vizsgálni.

- **Major kritériumok** (egy kritérium teljesülése is biztos diagnózis):
 - 2 db pozitív, periprotetikus ízületi folyadékból vett tenyésztés (szövet vagy punkció) fenotípusosan azonos kórokozóval (5-14 nap inkubációs idő a táptalajon)
 - Sipoly, ami az ízülettel kommunikál (2. ábra A, B) (30).



2. ábra; Korábban beültetett térdprotézis per primam gyógyult heg disztális sebzugában kialakult sipoly nyílás, mely folyamatos váladékozást mutat (A). Definíció szerint az a sipoly járat jelent major kritériumot, mely az ízülettel kommunikál. Bár a protézis körül kialakult sipoly feltehetően az ízületből származik, ennek a bizonyítására fisztulográfia is elvégezhető (B), ez a gyakorlatban nem képezi a rutin eljárások részét.

- **+1 Major kritérium – „reflection sign”** – saját gyűjtés, nem hivatalos major kritérium. 2018-ban vettem részt első alkalommal EBJIS konferencián. Ott a „*honorary lecture*„ során hangzott el ez a definíció. „Reflection sign akkor pozitív, ha a sebész meglátja saját magát a beültetett fém implantátum felületén. Ha a teszt pozitív az implantátum biztosan fertőzöttnek tekintendő” (3. ábra).



3. ábra; A beteg térdprotézisét a kép elkészülte előtt egy évvel ültették be. Patellatörés miatt több operáció történt a korai postoperatív időszakban. A kialakult krónikus infekció a protézis megőrzése mellett nem kezelhető, a végtag megtartása is kérdéses (A kép a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinika saját anyagából származik).

Minor kritériumok

Amennyiben a major kritériumok közül egyik sem pozitív, a minor kritériumok megvizsgálása után a döntést pontszámítás alapján tudjuk meghozni (2. táblázat). Ha a minor kritériumokból számolt pontok ≥ 6 a protézis lazulás nagy valószínűséggel szepikus okra vezethető vissza. Amennyiben a számolt pontszám 3-5 között van, az infekció valószínű.

2. táblázat; Periprotetikus fertőzések diagnosztikájának minor kritériumai.

		Akut infekció ¹	Krónikus infekció	Pontszám
Preoperatív	szérum CRP (mg/L) vagy D-dimer (mg/L) ²	>100 nincs adat	>10 >0,86	2
	emelkedett süllyedés mm/h ³	nincs relevancia	>30	1
	Szinoviális folyadék emelkedett leukocytaszám (sejt/ μ l) ⁵ vagy Leukocytaszám érzékszervi ^{5,4} vagy Pozitív alfa defenzin teszt ⁵	>10.000 ++ 1	>3.000 ++ 1	3
Intraoperatív	emelkedett PMN%	>90	>70	2
	pozitív szövettan	(>5neutrofil granulocita/5HPF ld. Kenn, Morawietz)		2
	(1db) pozitív tenyésztés			3
	purulens folyamat észlelése	lágyszövetreakció gyanú esetén nincs relevancia, CAVE: pseudotumor „metal on metal” protézis kopása esetén		3

¹ Ebben a tanulmányban az értékek nincsenek akut fertőzésekre validálva – irodalom és konszezus határértékek.

² Alisina Shahi et al, „Serum D-Dimer Test Is Promising for the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection and Timing of Reimplantation“ JBJS Am. 2017

³ Cave: Rheumatoid arthritis, törés, műtét 6 héten belül, véres aspirátum

⁴ Vizelet gyorsteszt: off-label-technika

⁵ Kvantitatív teszt (ELISA)

Az alkalmazott kezelést mindenképpen a beteghez kell adaptálni, de a legjobb, ha szepikus protokoll szerint kezeljük. Amennyiben a kapott pontszám <3 infekció nem valószínű és aszeptikus lazulásként egy ülésben elvégezhető a protézis cseréje, amennyiben a protézist körülvevő csont-, és lágyrész állapotok ezt lehetővé teszik.

Az EBJIS által publikált közleményben külön kiemelésre kerül, hogy a felmerülő kérdés nem válaszolható meg egy egyszerű „igen”-nel, vagy „nem”-mel, mivel a jelenleg elérhető tesztek nem teszik ezt lehetővé. Ezért három szintű diagnózis lehetőséget fogalmaztak meg. 1. Infekció nem valószínű, 2. Infekció valószínű, 3. Infekció biztos. A szerzők is megállapítják, hogy egy sokkal érzékenyebb kritérium rendszert hoztak létre azáltal, hogy az ICM 2018-as ajánlásban szereplő minor kritériumok közül bizonyos elemeket teljes körű, diagnózist megerősítő szerepbe emeltek.

Ezt a megállapítást a 2022-ben publikált ICM 2018, EBJIS 2021, és IDSA 2013 kritériumokat szenzitivitását és specificitását összehasonlító közleményükben is vizsgálták. A vizsgálatba 2015-2020-ig prospektíven gyűjtöttek adatokat, az értékelést pedig 206 betegnél végezték el. A beválogatott betegek között csípő-, és térdprotézis szepikus és aszeptikus lazulása miatt került sor revíziós műtétre. Az új EBJIS kritériumok alapján minden olyan periprotetikus infekciót azonosítani lehetett, amelyet a másik két kritérium rendszer alapján szintén diagnosztizáltak. Meglátásuk szerint az EBJIS definíció használata jelentősen csökkentette a bizonytalan diagnózisok számát, ami megkönnyítette a klinikai döntéshozatalt ([29](#)).

3. táblázat; A The European Bone and Joint Infection Society (EBJIS) által 2021-ben publikált periprotetikus infekciók diagnosztikai kritériumai. A táblázat soraiban a különböző vizsgálati szempontok találhatóak, az oszlopokban pedig a három diagnózis lehetőség, „infekció nem valószínű”, „infekció valószínű” és „infekció biztos”. Abban az esetben, ha egyik vizsgálati szempont sem ad pozitív eredményt, a zöld kategóriába soroljuk, vagyis az „infekció nem valószínű”. Ha a felsorolt vizsgálati szempontok közül minimum 2 pozitív és a határérték a középső oszlopban megadott szerinti, akkor a narancssárga, vagyis „infekció valószínű” diagnózis állítható fel. Amennyiben a harmadik oszlopban lévő határértékek szerint pozitív bármelyik vizsgálat, akkor a piros oszlopba, vagyis az „infekció biztos” kategóriába sorolódik a beteg.

	Infekció nem valószínű	Infekció valószínű ⁶	Infekció biztos
Klinikai és vérvételi eredmények			
Klinikai vizsgálatok	Egyértelmű alternatív ok, az implantátum diszfunkciója (pl. törés, implantátum törés, rossz pozíció, daganat)	1) Lazulás Radiológiai jele az első éven belül a beültetést követően 2) Korábbi sebgyógyulás problémák 3) A közelmúltban előfordult láz vagy bakterémia 4) Gennyesedés a protézis körül ⁷	Sipoly járat, mely bizonyítottan az ízülettel közlekedik, protézis fém látható
CRP		> 10 mg/l (1 mg/dl) ⁸	
Ízületi folyadék citológiai elemzés⁹			
Leukocytá szám c (sejt/μl)	≤ 1,500	> 1,500	>3,000
PMN (%) ¹⁰	≤ 65%	> 65%	> 80%
Ízületi folyadék biomarker			
alpha-defensin ¹⁰			pozitív immunoassay vagy lateral flow assay ¹²
Mikrobiológia ¹¹			
Aspirációs folyadék		pozitív tenyésztés	

⁶ A fertőzés csak akkor valószínűsíthető, ha pozitív klinikai jellemző vagy emelkedett szérumban C-reaktív fehérje (CRP) van, egy másik pozitív klinikai jellemzővel együtt. Vizsgálat: (ízületi folyadék, mikrobiológia, szövettan vagy nukleáris képalkotás).

⁷ Kivéve a káros helyi szöveti reakció (ALTR) és a kristályos artropátia eseteit.

⁸ Óvatosan kell értelmezni, ha a gyulladásnak más lehetséges okai is vannak: köszvény vagy más kristályos artropátia, metallosis, aktív gyulladásos ízületi betegség (pl. reumatoid arthritis), periprotetikus törés vagy a korai posztoperatív időszak.

⁹ Ezek az értékek a csípő és a térd periprotetikus ízületi fertőzésére (PPI) érvényesek. A paraméterek csak akkor érvényesek, ha tiszta folyadékot nyertek, és nem végeztek mosást. Az elemzéshez szükséges térfogatnak > 250 μl-nek, ideális esetben 1 ml-nek kell lennie, EDTA-t tartalmazó csőbe gyűjtve.

és <1 óra alatt kell elemezni, lehetőleg automatizált technikával. Vizskózus minták esetében a hialuronidázzal történő előkezelés javítja a következő eredményeket

az optikai vagy automatizált technikák pontosságát. Véres minták esetén a korrigált szinoviális WBC = megfigyelt szinoviális WBC – (WBC vér / RBC vér x RBC szinoviális folyadék) kell használni.

¹⁰ Nem érvényes ALTR, vérömleny, akut gyulladásos ízületi gyulladás vagy köszvény esetén.

¹¹ Ha antibiotikummal kezeltre került sor (nem egyszerű profilaxis), a mikrobiológiai elemzés eredményei romolhatnak. Ezekben az esetekben a molekuláris technikáknak lehet helyük. A tenyésztés eredményei a műtét előtti szinoviális aspirációból nyerhetők, preoperatív szinoviális biopsziából vagy (előnyben részesített) intraoperatív szövetmintából.

Intraoperatív (folyadék és szövet)	minden tenyésztés negatív	egy pozitív tenyésztés ¹²	≥ két pozitív minta ugyanazzal a mikroorganizmussal
Szonikáció ¹³ (CFU/ml)	nincs növekedés	> 1 CFU/ml bármelyik organizmus ¹⁴	> 50 CFU/ml bármely organizmus
Szövettan ^{10, 14}			
High-power field (HPF) (400x nagyítás)	negatív	≥ öt neutrofil jelenléte egyetlen HPF-ben	≥ öt neutrofil jelenléte ≥ öt HPF-ben
			Látható mikroorganizmusok
Egyéb			
nukleáris képalkotás	Negatív háromfázisú izotópos csontscan ¹⁰	Pozitív WBC szcintigráfia ¹⁵	

Az EBJS kritériumai itthon még kevésbé ismertek és még kevesebben használják őket. Ez a helyzet azonban Európában más, ugyanis egyre több helyen alkalmazzák már az EBJS kritérium rendszerét, ami szenzitívebben találja meg a periprotetikus fertőzéseket. Egyre több publikáció születik, ami ezen kritérium rendszer alapján foglal állást, illetve olyan is ami már ezt alkalmazza a diagnózisokban való különbségtétel céljából. Érdekes kérdés lehet eldönteni azt, hogy mi alapján használunk egy-egy kritérium rendszert. Ha csak a szenzitivitást vesszük figyelembe, akkor mindenképpen az érzékenyebb kritérium rendszert javasolt alkalmazni.

¹² Az egyszeri pozitív tenyésztés (vagy < 50 UFC/ml a szonikációs folyadékban) értelmezését óvatosan kell értelmezni, és az egyéb, a tenyésztésből származó eredményekkel együtt kell figyelembe venni. Ha egy műtét előtti aspirációban ugyanazt a mikroorganizmust azonosították, akkor ezeket két pozitív megerősítő mintának tekintendők. A nem gyakori szennyeződések vagy virulens organizmusok (pl. Staphylococcus aureus vagy Gram-negatív pálcikák) nagyobb valószínűséggel fertőzést képviselnek, mint a gyakori szennyeződések (pl. koaguláz-negatív staphylococcusok, mikrokokok vagy Cutibacterium acnes).

¹³ Ha centrifugálást alkalmaznak, akkor a javasolt határérték 200 CFU/ml a fertőzés megerősítéséhez. Ha a protokoll egyéb variációit kell alkalmazni, akkor az egyes protokollokhoz közzétett határértékeket kell alkalmazni.

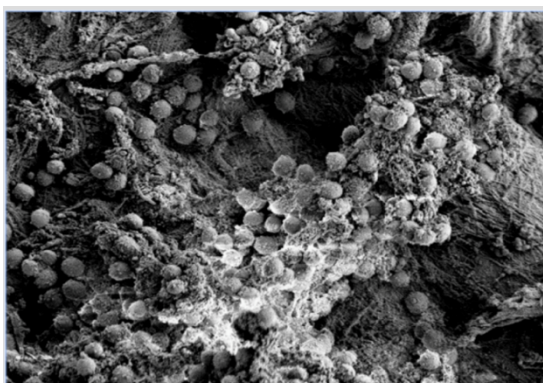
¹⁴ A szövettani elemzés történhet preoperatív biopsziából, intraoperatív szövetszövetmintákból paraffinnal vagy fagyasztott metszettel.

¹⁵ A WBC-szcintigráfia akkor tekinthető pozitívnak, ha a 20 órás vizsgálat során a felvétel megnövekedett, a korábbi vizsgálatokhoz képest (különösen, ha kiegészítő csontvelőszkenneléssel kombinálják).

1.5. A biofilm asszociált fertőzések

Az ortopédiai ellátás során alkalmazott fém és műanyag implantátumok bár szöveti reakciót nem okoznak, azonban idegen testként funkcionálnak. Az idegentest asszociált fertőzések esetében tovább fokozza a diagnosztikus nehézségeket az idegen anyagok felületén a fertőzést okozó baktériumok megtapadása, és az általuk kialakított biofilm. A biofilmben élő kórokozók nem, vagy csak minimális mennyiségben kerülnek ki az ízületi folyadékba (31-33), amiből aspirációval mintát tudunk nyerni. A krónikus infekciókat okozó, biofilmben élő kórokozókra jellemző az alacsony virulencia és a hosszú inkubációs időt igénylő mikrobiológiai vizsgálat (34-36).

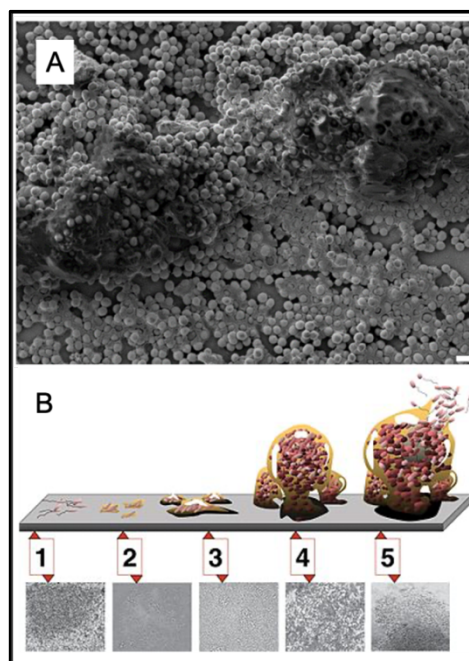
A biofilm a kórokozók által a protézisek felszínén létrehozott élettér és védekező réteg (37), aminek sajátos életrétege van, mely ortopéd sebészi szempontból kifejezetten fontos (4. ábra) (38). Először Bill Costerton használta a biofilm kifejezést 1978-ban, majd a definíció 2002-ben született meg, mely szabad fordításban annyit tesz, hogy a biofilm egy olyan mikrobiális eredetű, helyhez kötött közösség, mely irreverzibilisen kötődik egy felülethez, illetve egymáshoz, és a benne élő baktériumok a maguk által termelt extracelluláris polimer mátrixba vannak integrálódva. A biofilmben élő baktériumok megváltozott fenotípust, növekedési sebességet, illetve gén átírást mutatnak (39). Ezt később Hans Curt Flemming pontosította, mi szerint: a biofilmben kialakuló bakteriális élet formája, teljesen más, mint a szabadon élőké (40).



4. ábra; *Staph. aureus* által képzett biofilm térbeli struktúra scanning elektron mikroszkópos felvétele egy in vitro sebmodellről.

A legfontosabb információ, hogy a biofilmnek saját életciklusa van (41) (5. ábra B), mely a felületen való megtapadással indul (42). A felületen megtapadt baktériumok szaporodnak és egy extracelluláris 3D mátrix környezetet alakítanak ki (5. ábra A) melynek anyaga víz, exopolysacharidok, fehérjék, és extracelluláris DNS (42). Ez a mátrix lehetővé teszi a baktériumok számára, hogy szaporodjanak egy strukturált, rendezett környezetben. Ezen felül pedig megvédi a mátrixba ágyazott baktériumokat a szervezet immunrendszerétől, valamint mechanikai stabilitást is biztosít (43).

Az éretlen biofilm éretté alakulásának ideje kórokozótól függ (44), de megközelítőleg 30 nap alatt alakul ki. A legfontosabb különbség az éretlen és érett biofilm között, hogy az érett biofilm az immunrendszer és a jelenleg alkalmazott antibiotikumok számára korlátozottan, vagy mondhatjuk, hogy szinte egyáltalán nem megközelíthető, így védelmet biztosít a benne élő baktériumoknak (43).



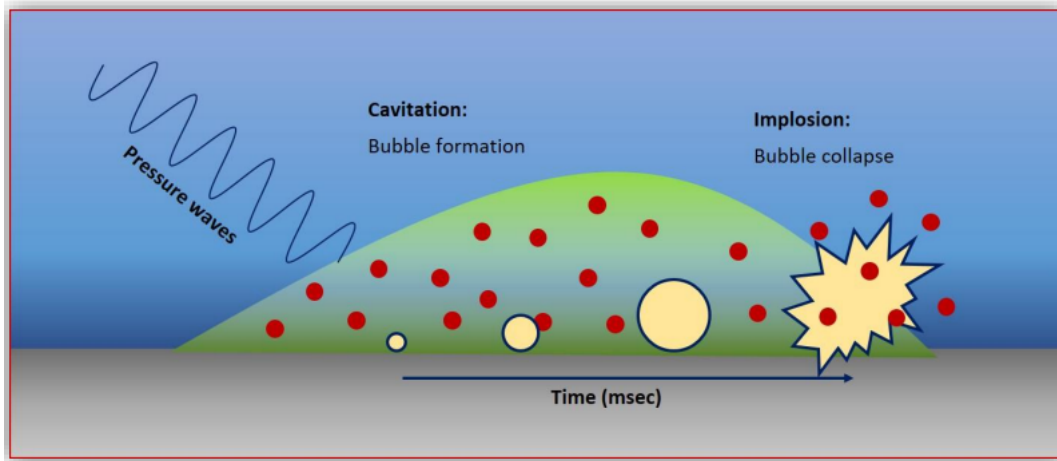
5. ábra; Scanning elektronmikroszkópos kép a *Staph. aureus* által képzett biofilm 3D struktúrájáról (A), a biofilm életciklusa a felületen való megtapadástól a kolonizáción keresztül az éretlen majd érett biofilmmé alakuláson keresztül, lezárva az érett biofilmből időnként felszabaduló baktériumok képével (B).

A biofilmben élő baktériumok kis számban jelennek meg az ízületi folyadékban, így a diagnosztikus céllal végzett ízületi punkcióval nyert minta mikrobiológiai vizsgálata sokszor tévesen negatív eredményt adhat. Ez magyarázza, hogy steril lazulásként kezelünk tenyésztés negatív krónikus infekciós eseteket. Ezeknél az eseteknél gyakran megfigyelhető, hogy a műtét után sebgyógyulási zavar jelentkezik, továbbá rövid időn belül ismét a protézis kilazulása alakulhat ki. A periprotetikus fertőzések diagnosztikai kritériumai között szereplő vizsgálatok eredményeit is befolyásolhatja az érett biofilm.

1.6. Tenyésztés negatív esetek, szonikáció

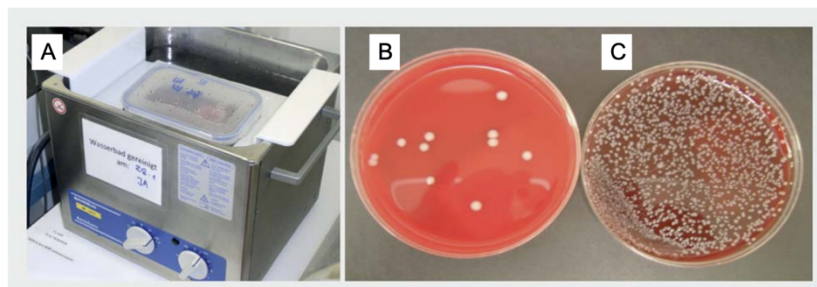
A tenyésztés negatív krónikus infekciók előfordulási arányát az irodalom széles skálán jegyzi, 7-42,1% közötti prevalenciát ismerünk ([36](#), [45-48](#)). Számos tényező járul hozzá, hogy a tenyésztés negatív eredményt ad PPI esetén, többek között (1) a mintavételt megelőző empirikus, rossz időben indított antibiotikum kezelés, (2) az atipikus vagy biofilmbe burkolt organizmusok esetében nem megfelelő táptalaj, valamint (3) a tenyésztés nem megfelelő kezelése és a minta átadása, (4) a ritka és indolens organizmusok esetében nem megfelelő inkubációs idő, (5) a szövetminták nem optimális száma vagy feldolgozási módja, és (6) a késedelmes laboratóriumba való szállítás ([49](#)). A biofilmből információt csak a revíziós műtét közben, illetve az után tudunk nyerni. A szervezetből eltávolított komponensek felületének ultrahangos tisztítása során a felületen megtapadt biofilm feltöredezik és a mosó folyadékba kijutnak a benne rejtőző kórokozók.

A folyamat mechanizmusa azon az elven alapul, hogy az ultrahang hullámok váltakozóan magas és alacsony nyomású területeket alakítanak ki azokon a szilárd felületeken, melyek folyadékba merülnek (6. ábra) ([50](#)). Az alacsony nyomású állapotban nagy számú mikroszkópikus méretű apró gőzbuborék alakul ki (kavitáció), amik összeesnek a nagy nyomású fázisban (implózió), ami során nagy mennyiségű energia szabadul fel a protézis felszínén ([50](#)), ez a biofilm feltöredezését eredményezi.



6. ábra; Illusztráció a szonikáció mechanizmusáról felszínen megtapadt biofilm kezelése során. A baktériumok piros pontok, a biofilm zöld terület, az ultrahang által keltett buborékok sárga körök.

A szonikátumot, hasonlóan a többi mintához, haemokultura palackban és transzport táptalajon juttatjuk a mikrobiológiai vizsgálatra. A szonikációs eljárás a mikrobiológiai vizsgálatok pontosságát szignifikánsan javítani tudja. Irodalmi adatok szerint a hagyományos transzport táptalajon elküldött vizsgálatok eredménye 34,1%-ban, míg szonikáció után 76,9%-ban ad pozitív eredményt (51). A 7. ábra jól szemlélteti az azonos betegből nyert minta szonikáció nélkül (7. ábra B) és szonikáció utáni (7. ábra C) tenyésztésének eredményességét (52). A két táptalaj összehasonlításával az látszik, hogy szonikáció után több baktérium telep fejlődik ki, nagyobb csíraszámban kerülnek baktériumok a vizsgált mintába.



7. ábra; Ultrahangos kád az implantátumok szonikálására (A), szonikálás nélküli minta (B) tenyésztési eredménye, és szonikáció utáni (C) tenyésztési eredménye.

[Ide írhat]

1.7. A biomarkerek szerepe a periprotetikus fertőzések diagnosztikájában

Számos olyan, a protézist körülvevő ízületi folyadékban megtalálható biomarkert ismerünk, melyek megléte, vagy emelkedett értéke utalhat a fennálló fertőzésre. A korábbi fejezetekben már említésre került két fontos biomarker, az alfa-defenzin és a leukocita észteráz. Ezek azért kerültek korábban részletezésre, mert a jelenleg alkalmazott diagnosztikus kritériumok között minor kritériumként szerepelnek. Az utóbbi évtizedben jelentős hangsúlyt kapott a biomarkerek kutatása, és számos új, jelenleg még rutinszerűen nem alkalmazott potenciális lehetőség került publikálásra. Elindult az a fajta törekvés, mely talán némileg versenynek is tekinthető a legjobb, legpontosabb, legszenzitívebb biomarker megtalálására, illetve annak klinikailag is hasznosítható, betegágy melletti gyorstesztként alkalmazható formáinak legyártására.

A biomarkerek tárgyalása során fontos hangsúlyozni, milyen mintából származnak. Beszélhetünk ízületi folyadékból vagy perifériás vérszérumból vett mintáról és abból mért értékről.

A szérumból vett mintából C-reaktív protein (CRP) illetve vörösvértest süllyedést (We) vizsgálunk rutinszerűen a fehérvérsejtszámon (WBC) felül. Azonban ígéretes eredményeket mutat a szérum D-dimer érték is, mely krónikus infekcióban emelkedett, akut infekcióról pontos adat nincsen (53).

A CRP akut fázis fehérje, melyet Tillet és Francis 1930-ban publikáltak először (54, 55). A máj termeli, maximális termelése 24-35 órával a gyulladás kezdete után (53) történik. Korábbi vizsgálatok mutatják, hogy az interleukin-6 (IL-6) jelentős CRP mRNS indukciós hatást fejt ki a máj sejteken. A CRP a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokhoz is kötődik, stimulálja az adhézíójukat és a leukociták általi fagocitózisukat. Azonban nem csak bakteriális fertőzésre specifikus paraméter, ugyanis rheumatoid arthritisben, trauma után, csonttörés vagy akár steril műtét után is emelkedhet a szérum szintje (56). Szisztémás kortikoszteroidok hatására szérum szintje csökkenhet (57).

A mindennapi rutin során kevésbé alkalmazzuk, de érdemes megemlíteni az IL-6-ot, mely gyulladásos citokin, a monociták és makrofágok által termelődnek. Indukálja az akut fázis fehérjék, mint pl.: CRP termelését, hatással van a B-, és T-limfociták

működésére is. Egy 2010-ben publikált meta-analízis felveti a lehetőségét, hogy a CRP és We értékeknél is jobban használható lehet periprotetikus fertőzés diagnosztikájában (58). Ebben a metaanalízisben az IL-6 szenzitivitása 97%, specificitása pedig 91% volt periprotetikus fertőzések kimutatásában, bár ez az érték különböző közleményekben széles skálán mozgott és jelentősen függött a megválasztott határértéktől. Ezen variabilitás és következetesség hiánya miatt a fenti eredmények korlátozott értékűek és meggátolják, hogy a diagnosztikus kritériumok közé és a mindennapi használatba kerüljön.

Az elmúlt 15 évben a procalcitonin (PCT) az első számú szérumból izolálható szepszis biomarkerré vált (59). A procalcitonin egy fehérje, melyet a neuroendokrin sejtek és a pajzsmirigy parafolikuláris sejtjei termelnek különböző fiziológiai állapotokban. Szepszisben a PCT-t főként a makrofágok és különböző szervek monocitái termelik, mint például a máj (55). A PCT értékének magas diagnosztikus pontossága van szisztémás szepszis kimutatásában vagy monitorozásában (60), azonban periprotetikus fertőzés kimutatásában a diagnosztikus értéke bizonytalan. Egy 2017-ben publikált meta-analízis hat korábbi vizsgálat eredményét dolgozta fel a PCT diagnosztikus pontosságáról periprotetikus fertőzésekben (61). Ezen adatok alapján a szérum PCT nem ideális biomarker a krónikus (low-grade) periprotetikus fertőzések diagnosztikájában az alacsony szenzitivitása miatt, azonban akut fertőzés kimutatására és monitorozására megfelelő.

További ígéretes szérum biomarker a D-dimer, mely időközben az ICM konszenzus alapján került be a minor diagnosztikus kritériumok közé. Széles körben elérhető, a fibrinolitikus aktivitás meghatározására használatos thromboemboliás eseményekben, mely nagy érzékenységet mutatott a PPI diagnózisában is (62). Shahi és munkatársai egy prospektív 154 beteget vizsgáló tanulmányban azt találták, hogy a D-dimernek magasabb szenzitivitása (97,7%) és specificitása (93,6%) van, mint a CRP-nek vagy a We-nek. A D-dimer szintén széles körben elérhető és azóta több tanulmány is igazolta a magasabb diagnosztikus pontosságát.

Kevésbé került be a mindennapi használatba a tumor nekrozis faktor-alfa (TNF- α), mely szintén egy akut fázis gyulladáshoz kötött citokin, melyet a makrofágok és monociták termelnek. Két vizsgálat is elemezte a szerepét periprotetikus fertőzés esetén (63, 64),

mindkettő hasonló eredményt mutatott: alacsony szenzitivitás (43% és 35%), valamint relatív magas specificitás (94% és 86%). A minta instabilitása miatt javasolt 60 percen belül feldolgozni, ami szintén nehezíti a mindennapi klinikumban való elterjedését.

Az intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) egy membrán glycoprotein, mely kulcsszerepet játszik a leukocita migrációban és aktivációban, szerepét szintén vizsgálták periprotetikus infekció során. Két korlátozott értékelhetőségű vizsgálat felvetette annak lehetőségét, hogy az ICAM-1 szérumszintje magasabb periprotetikus infekcióban, azonban az egyik vizsgálat kis esetszámmal történt, és mindkettőnél a periprotetikus infekció diagnózisa főként klinikai jeleken és pozitív mikrobiológiai leleteken alapult (65, 66). További kutatások szükségesek, mielőtt az ICAM-1 a rutin diagnosztikus eljárások közé sorolható.

Lipopolysacharid binding protein (LBP) egy, a májsejtek által termelt polipeptid, mely az IL-1 és IL-6 által indukálódik. LBP elősegíti a bakteriális lipopolysacharid kötődését a CD14-hez, mely a monocitákon és makrofágokon van jelen. Az LBP potenciális biomarker lehetne a periprotetikus fertőzések diagnosztikájában, de két korábbi vizsgálat is korlátozott klinikai hasznosságot, alacsony szenzitivitást és specificitást jelzett periprotetikus infekcióban (64, 67).

A szérumban detektálható biomarkerek mellett az ízületi folyadékban szabadon lévő biomarkerek kutatása is nagy hangsúlyt kapott. A fent említett alfa-defenzin és LE mellett a következő biomarkerekkel történtek vizsgálatok.

A CRP-t nem csak szérumból, de ízületi folyadékból is lehet mérni. Mivel különböző gyulladásos reakciókban a máj termeli, és a szérumban is jól mérhető, a periprotetikus fertőzésre nem teljesen specifikus, és értéke low-grade periprotetikus fertőzésben normális, vagy közel normális is lehet. Azonban korábbi tanulmányok azt mutatják, hogy az ízületi folyadékból mért CRP-nek magasabb szenzitivitása van (68, 69). Bár a pontos határérték és a diagnosztikus pontosság meghatározása a meglévő vizsgálatok között nem egyezik.

Az adenzin egy purin nukleozid, mely anti-inflammatorikus és szöveti védelmező funkcióval rendelkezik (70). Felmerült annak a lehetősége, hogy a szerózus testfolyadékokban az adenzin (ADA) szintjét megmérve sikerülhet azonosítani az immunrendszer aktivációjának a szintjét. Jelenleg még nincs vizsgálat arról, hogy a periprotetikus fertőzések diagnosztikájában hasznos lehet-e. Azonban korábban már vizsgálták szeptikus arthritis, rheumatoid arthritis és kristály indukálta arthritis elkülönítésére (68, 71, 72). Sousa és munkatársai azt találták, hogy az ADA ízületi folyadékból izolálva > 61 U/L felett kifejezetten jó diagnosztikus pontosságot kínál szeptikus folyamat bizonyítására(73).

Az alpha-2-macroglobulin ($\alpha 2M$) elsődleges feladata a szövetsérülés során felszabaduló felesleges proteázok gátlása. A proteázokat a neutrofilek szabadítják fel a gyulladás helyén, de exogén forrásból, például kórokozókól is származhat (74). Jacovides és munkatársai szignifikánsan magasabb $\alpha 2M$ szintet mértek periprotetikus fertőzésben szenvedő betegek ízületi folyadékjából (75). Vizsgálatuk során sikerült határértéket is meghatározni, mely 0.26 mg/mL (260 mg/L) 89,5%-os diagnosztikus pontossággal.

Calprotectin egy citoplazmában előforduló fehérje, mely a neutrofilek aktivációja során ürül az extracelluláris térbe. Mangánhoz, cinkhez és vashoz kötődve a calprotectin csökkenti a baktériumokon jelen lévő szuperoxid-diszmutázt, és gátolja a baktériumok védekezését a reaktív oxigéngyökökkel szemben (76-78). Szintjének mérése ELISA alapú teszttel a kórházi laborokban végezhető, de úgy melletti teszt is elérhető lateral flow immunoassay formájában, mely 20 perc alatt elkészül (79). Wouthuyzen-Bakker és munkatársai vizsgálatuk során 50 mg/L határértéket határoztak meg, melynek 97%-os negatív prediktív értéke volt (79).

A periprotetikus fertőzésben használható biomarkerek kutatásának aktualitását mi sem jellemzi jobban, mint az, hogy jelen dolgozat írása közben is megjelent egy áttekintő közlemény Schindler és munkatársaitól (25), akik a periprotetikus fertőzések diagnosztikájára felhasználható biomarkerek kutatásáról megjelent prospektív tanulmányokat elemezték és értékelték. Ebbe az összefoglaló közleménybe kutatócsoportunk által 2022-ben publikált, jelen dolgozat alapjául szolgáló kutatás is beválasztásra került (80). Az elmúlt öt évben tizenkilenc olyan közlemény született, ami

a szerzők által állított beválasztási kritériumainak megfelelt. Tizenöt (78%) beválasztott közleményben ízületi folyadékot, háromban (16%) vér szérumot, egyben (5%) pedig vizeletet vizsgáltak a szerzők. A közleményben említett legtöbb biomarkert a korábbi felsorolás tartalmazza, összefoglalásként azonban érdemes az általuk közölt táblázatot megtekinteni. A 4. táblázatban a biomarkereket biológiai tulajdonságaik alapján alcsoportokra osztották. Ebből az látható, hogy nagyobb érdeklődés van a calprotectin, a D-laktát, Cf-DNA és extracelluláris vezikulák irányánt. Ami ebből megjósolható, hogy a calprotectin, illetve a D-lactate, elérhetősége miatt potenciálisan akár a mindennapi diagnosztikai algoritmusba is bekerülhet, amennyiben a további vizsgálatok során megfelelő szenzitivitási és specificitási értékeket mutatnak.

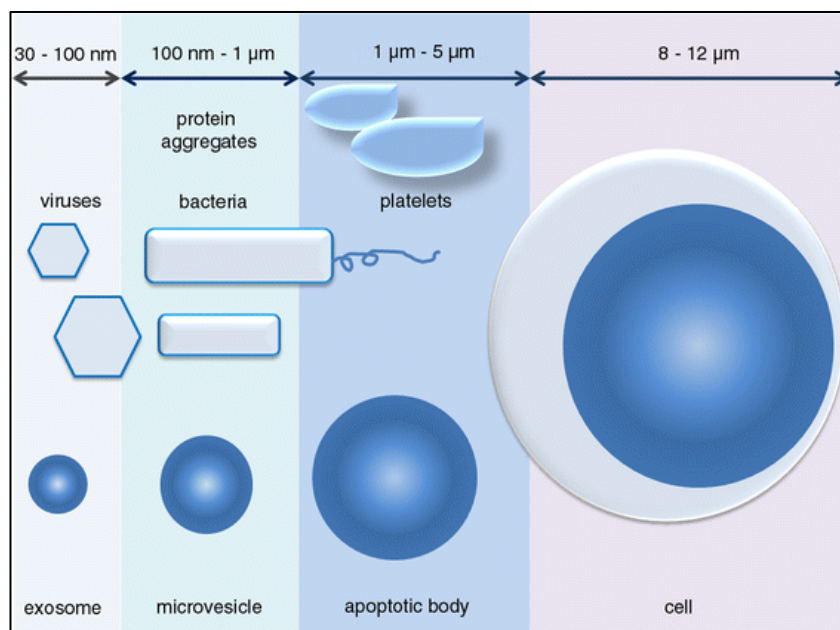
4. táblázat; A periprotetikus ízületi fertőzés új diagnosztikai markerei: az elmúlt öt év szakirodalmának szisztematikus áttekintése.

Marker	Number of studies
Protein	9
Calprotectin	Grassi et al. (2022), Warren et al. (2022), Warren et al. (2021) (3)
LTF, MND4, PRTN3	Wang et al. (2019) (1)
NGAL	Dijkman et al. (2020) (1)
Urinary peptide markers	Omar et al. (2021) (1)
Lipocalin-2	Vergara et al. (2019) (1)
Soluble Pecam-1	Fuchs et al. (2021) (1)
Zonulin, LPS, sCD14	Chisari et al. (2022) (1)
sCD28, sCD80, sCTLA-4, sBTLA	Jubel et al. (2021) (1)
Exosomes	2
EVs	Rüwald et al. (2020), Sallai et al. (2022) (2)
Interleukins	1
Cytokines (IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, GM-CSF, TNF- α , INF- γ)	Fröschen et al. (2020) (1)
Lysosomes	1
MPO	Ikeda et al. (2020) (1)
DNA	2
Cf-DNA	Echeverria et al. (2021), Cobra et al. (2022) (2)
Molecule	3
BJI InoPlexT	Dartus et al. (2021) (1)
D-lactate	Karbysheva et al. (2020), Yermak et al. (2019) (2)

1.8. Az extracelluláris vezikulákról általában

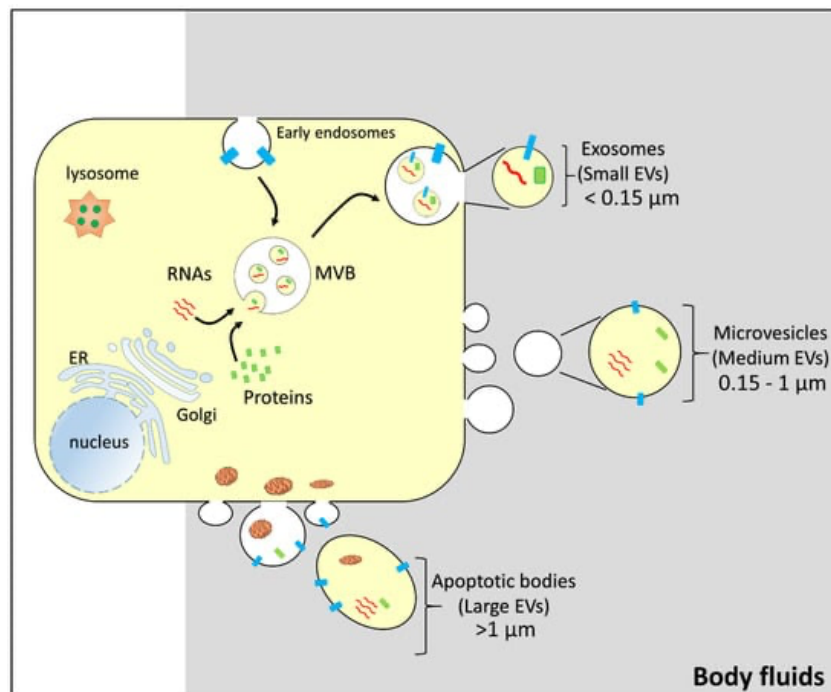
Az elmúlt évtizedben ugrásszerűen felgyorsult a sejtekből felszabaduló membránnal körülhatárolt partikulumok – extracelluláris vezikulák kutatása. Minden eukariota és prokariota sejt képes a tőle távol eső sejtekkel kommunikálni extracelluláris vezikulák felszabadításával (81). Extracelluláris vezikulák közé tartoznak mindazok a partikulák, melyek a sejtekből szabadulnak fel, lipid kettős membránnal határoltak és nem képesek duplikálódni, illetve nem tartalmaznak funkcionális sejtmagot (82), különböző méretűek lehetnek, melyek transzmembrán fehérjéket, citoszolból származó fehérjéket és RNS-t tartalmaznak (81).

A Nemzetközi Extracelluláris Vezikula Társaság (International Society for Extracellular Vesicles – ISEV) ezeket a partikulumokat eleinte keletkezési módjuk alapján három nagy csoportba rendezte - apoptotikus testek (1 μm – 5 μm), mikrovezikulák (100 nm – 1 μm) és exoszómak (30-100 nm) (8. ábra) (83-85).



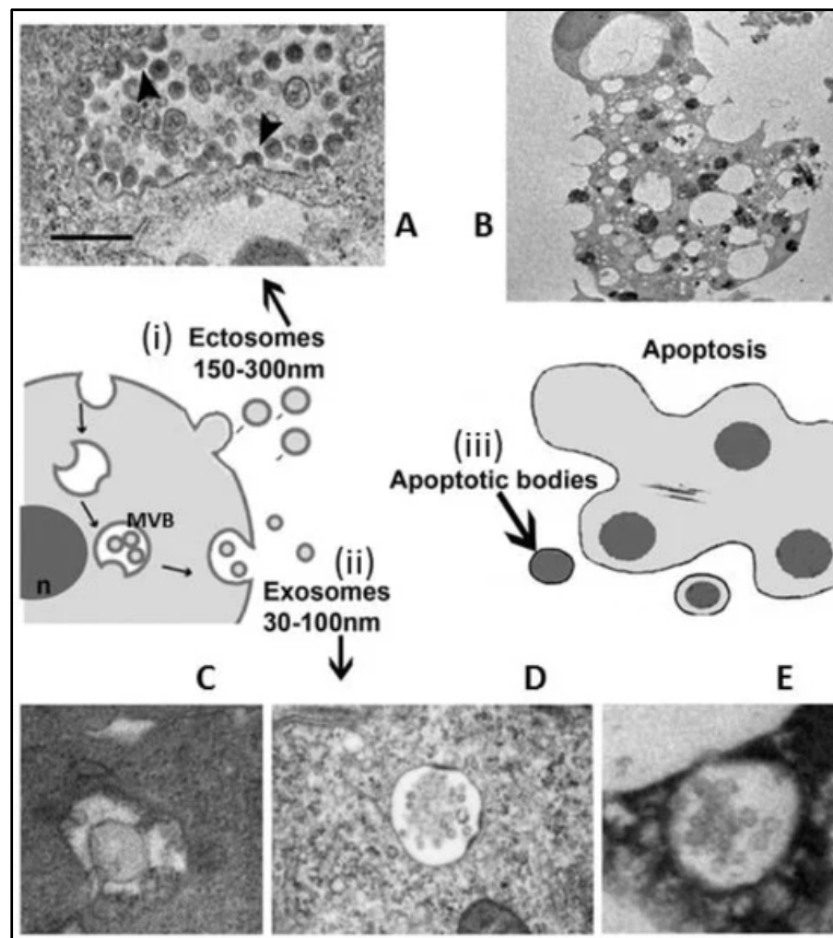
8. ábra; A különböző vezikulák mérettartományának összehasonlítása egyéb mikroorganizmusokkal és sejtekkel - György, Bence, et al. (2011). A legkisebb méretű vezikulák a vírusok, a közepes méretűen a baktériumok, fehérje komplexek ill. immunkomplexek, míg az apoptotikus testek a vérlemezkék mérettartományába esnek.

Ezeket a korábban használatos elnevezéseket (mikrovezikula, mikropartikula, exoszóma stb.) (86, 87) a 2018-as felújított MISEV útmutató publikálásával az extracelluláris vezikula elnevezésre egységesítették, és méretük szerint kis- (<150 nm), közepes- (150 nm – 1 µm), és nagy (>1 µm) EV-nek nevezték el (9. ábrán) (88).



9. ábra; Az extracelluláris vezikulák biogenezisének ábrázolása. A donorsejtből különböző vezikulák szabadulhatnak fel: exoszómák/kis extracelluláris vezikulák (méret: kevesebb mint 0,15 µm); mikrovezikulák/közepes extracelluláris vezikulák (méret: 0,15-1 µm); apoptotikus testek/nagy extracelluláris vezikulák (méret: több mint 1 µm). MVB, multivezikuláris test; EV, extracelluláris vezikulum. Intracelluláris organelumok, RNS-ek (piros) és fehérjék (zöld és világoskék) jelölve (Console, L., & Scalise, M. 2022).

A közepes méretű extracelluláris vezikulák (EV), melyek a 150 nm – 1 µm közötti mérettartományba esnek a sejtmembránról való direkt lefűződéssel, úgynevezett ectocitózis útján keletkeznek és kerülnek az extracelluláris térbe (10. ábra) (89). Ez a folyamat energiaigényes és intracelluláris kalcium ion koncentráció emelkedéssel jár (90, 91). A kis méretű extracelluláris vezikulák mérete <150 nm, korábban exoszómának is nevezték őket, a késői endoszómából kialakult multivezikuláris testek exocitózisa alkalmával kerülnek az extracelluláris térbe (92).



10. ábra; Az extracelluláris vezikulák sejtől való felszabadulásának lehetséges módjait ábrázolja a középső sematikus rajz, (i) ektoszómák vagy közepes méretű extracelluláris vezikulák, a kép A-val jelölt része mutatja az elektronmikroszkópos képet, (ii) exoszómák, vagy legkisebb méretű vezikulák, melyek multivezikuláris testből exocitózissal jutnak az extracelluláris térbe, C-E mutatja az elektronmikroszkópos képet, (iii) apoptotikus testek, vagy legnagyobb méretű extracelluláris vezikulák, melyekről B ábra mutat elektronmikroszkópos képet.

Számos fiziológiai és patológiai folyamatot azonosítottak, amiben az extracelluláris vezikulák szállító funkciója és az általuk szállított anyagok fontos szerepet töltenek be. Ilyenek pl.: gyulladáshoz vezető betegségek (krónikus obstruktív és gyulladással járó légúti betegség, emphysema) (93, 94), autoimmun megbetegedések (95), daganatos megbetegedések (96), bakteriális fertőzés (97). Azonban az utóbbi időben az is egyre inkább kirajzolódik, hogy nem csak a gazda szervezetből, de a fertőzést kiváltó kórokozók fel szabaduló EV-knek is jelentős szerepük van a bakteriális fertőzések lezajlásában. Ezt az extracelluláris vezikulák bidirekcionális szerepének nevezik (98).

1.9. A neutrofil granulociták szerepe a bakteriális fertőzés elleni védekezésben

A gyulladáshoz vezető válasz kiváltásában a fehérvérsejteknek fontos szerepük van: a neutrofil granulocitákból fel szabaduló vezikulák az immunrendszer működésében, a kórokozók eliminálásban játszanak szerepet (99). A neutrofil granulociták a természetes immunrendszer sejtjei. A csontvelőben a myeloid őssejtekből keletkeznek, átlagos élettartamuk 4-6 óra (100, 101). A véráramban keringenek, bakteriális hatásra kilépnek az érfalon keresztül a szövetközi térbe, aktiválódnak, és számos proinflammatorikus citokin és növekedési faktor segítségével (IL-1, TNF- α , IL-8, G-CSF, GM-CSF) (102, 103) gyulladást hoznak létre. Az antigénnel érintkezve létrejön a neutrofil degranuláció, mely során különböző antibakteriális enzimeket választ ki a sejt.

A neutrofilek kétféle granulátumot tartalmaznak; primer (azurofil) granulátumokat és szekunder (specifikus) granulátumokat (amelyek érettebb sejtekben találhatóak). A proteolitikus enzimek és a katepszin G lebontják a (bakteriális) fehérjéket, a lizozim a baktériumsejtfal lebontásával, a myeloperoxidáz toxikus szabadgyökök termelésével járul hozzá a baktériumok pusztulásához (104). Ezen kívül a neutrofil granulocitákból származó anyagok stimulálják az IgG-vel bevont (opszonizált) baktériumok fagocitózisát.

A másodlagos granulomok olyan vegyületeket tartalmaznak, amelyek toxikus oxigén vegyületek, lizozim és laktoferrin képződésében vesznek részt. A neutrofil

granulociták nem csak extracelluláris, de intracelluláris mechanizmusokkal is küzdenek a baktériumok ellen. Fagocitálják, majd intracellulárisan különböző enzimekkel és oxigén-szabadgyökökkel elpusztítják a baktériumokat, majd a makrofágok eliminálják a keringésből a granulocita-baktérium komplexet. Az orvostudomány sokáig azt gondolta, hogy ez az elsődleges mechanizmus, mellyel a szervezet védekezik a bakteriális fertőzésekkel szemben. ([105](#), [106](#)).

1.10. A neutrofil granulocitákból származó extracelluláris vezikulák

A neutrofil granulocitákból származó extracelluláris vezikulák antibakteriális hatásával több tanulmány is foglalkozik ([107](#)). Tímár és munkatársai közleményükben beszámolnak arról, hogy egészséges donorok perifériás vérszérumából a CD11b és CD177 elleni antitestekkel történő kettős festés után neutrofil eredetű extracelluláris vezikulákat tudtak rutinszerűen azonosítani. Az ilyen EV-k száma 5-6-szor nagyobb volt, akkor, ha a vérvételt megelőző 24 órán belül *Staphylococcus aureus* bakteriémiája és láza volt a vizsgálatban részt vevő alanyoknak. Az izolált neutrofil granulociták bakteriális opszonizáció után antibakteriális tulajdonságú extracelluláris vezikulákat szabadítanak fel. Az általuk különböző ingerekre (pl.: bakteriális infekció, tumor, gyulladás) kibocsájtott extracelluláris vezikulák hasonló méretűek és irányultságúak voltak, azonban fehérje tartalmuk és funkciójuk különböző volt ([107](#)).

Az opszonizált részecskékkel stimulált neutrofil granulociták által termelt extracelluláris vezikulák csökkentették a baktériumok növekedését, ellentétben a többi módon stimulált neutrofilekből származó extracelluláris vezikulákkal. Ezek a vezikulák nagyobb méretűek voltak, mint az exoszómak (30-100 nm) vagy a neutrofilekből származó granulomák, továbbá plazmamembrán markerek jelenléte volt detektálható rajtuk, ami azt sugalja, hogy nem intracelluláris granulomákról van szó. Ezek a vezikulák bakteriosztatikus tulajdonságúak, míg a neutrofil granulociták baktericidek, továbbá az antibakteriális tulajdonságuk különbözik a már leírt neutrofil extracelluláris csapdák (neutrophil extracellular traps – NETs) tulajdonságaitól ([108](#)).

A neutrofil extracelluláris csapdák (109) olyan kromatin és szerin proteázokból álló rostszálakat tartalmaznak, amelyek extracellulárisan csapdába ejtik és elpusztítják a baktériumokat. A NETs és az extracelluláris vezikulák közötti különbséget azért érdemes részletezni, mert mindkettő a neutrofilek védekező mechanizmusa, melyek nagyon hasonlóak és a korai vizsgálatok alkalmával nem lehetett pontosan eldönteni, hogy külön védekezési mechanizmusról van-e szó. Ez ma már kimondható, hogy nem tekinthetők azonos folyamatoknak. Az extracelluláris csapdák működése a baktériumok aggregációján alapul (108). A NETs hatásának kialakulásához, illetve annak formálódásához 2-4 órára van szüksége (110), míg az extracelluláris vezikulák felszabadulása 20 perc alatt megtörténik. A DNase enzim a NETs formálódást képes elpusztítani (108), míg az extracelluláris vezikulák aktivitása nem volt befolyásolható DNase ezimmel. Az antibakteriális hatás két fő tulajdonságra vezethető vissza. Az első fontos tulajdonság a nagy méretű aggregátumok képzése baktériumokkal, mely csak akkor jön létre, ha mindkét alkotó (baktérium és neutrofil granulocitából származó extracelluláris vezikula) jelen van. A másik pedig az extracelluláris vezikulák által szállított antibakteriális hatású fehérjék, melyek különböznek a nem bakteriális stimuláció után felszabaduló extracelluláris vezikulák által szállított fehérjéktől. A neutrofil granulociták által felszabadított extracelluláris vezikulákat egészséges donorok szérumában is detektálták, ezeknek a száma markánsan megnövekedett aktív *S. aureus* fertőzésben (107). Ehhez hasonló megfigyelést korábban már meningococcus fertőzésben szenvedő betegeknél is leírtak (111). Ez a megfigyelés azt sugallja, hogy a neutrofil granulocitákból származó extracelluláris vezikulák felszabadulása *in vivo* is bekövetkezik bakteriális stimuláció hatására. Egészséges donorok szérumához hasonlítva bakteriaemiában szenvedő betegekből izolált extracelluláris vezikulák kifejezett aggregációs képességet mutattak *ex vivo*. Ez a tulajdonság a baktériumok szaporodását gátolhatja az infekció korai szakaszában.

1.11. A neutrofil granulocitákból származó extracelluláris vezikulák azonosítása

A biológiai mintákban számos, különböző eredetű extracelluláris vezikulát detektálhatunk. Ahhoz, hogy el tudjuk különíteni áramlási citométer segítségével, hogy valóban EV által kiváltott jelről beszélünk és nem egyéb protein komplexről, több jelölést és vizsgálati módszert alkalmazhatunk. A közepes méretű extracelluláris vezikulák nagy részére jellemző a foszfatidilszerin externalizáció, ami miatt annexin V kötésére alkalmasak. Ennek az a magyarázata, hogy amikor a sejtek apoptózison mennek keresztül vagy valamilyen stressznek vannak kitéve, a plazmamembrán lipid kettős rétege aszimmetrikussá válik, ami a foszfatidilszerin externalizációját eredményezi. Számos extracelluláris partikula, köztük az apoptotikus testek és a közepes méretű EV-k is hordoznak foszfatidil-szerint a felszínükön (112). Az Annexin V egy olyan fehérje, ami nagy affinitással kötődik a foszfatidilszerinhez. Fluorokrómmal, például FITC-vel (fluoreszcein-izotiocianát) jelölve specifikusan képes az EV-k felszínén lévő foszfatidilszerinhez kötődni (113). Az Annexin V szelektív a foszfatidilszerinre, így ideális marker a foszfatidilszerinrel rendelkező EV-k megkülönböztetésére heterogén mintában lévő más részecskéktől, például sejtörmeléktől vagy protein aggregátumtól (114).

Ezzel azonban még nem tudjuk teljesen specifikálni az EV-ket, emiatt neutrofil granulocitára jellemző markert is kell választanunk. A közepes méretű extracelluláris vezikulák a kiindulási sejtek sejt felszíni tulajdonságait „öröklik”, így azok felületén is nagyobb mennyiségben kell jelen lennie a CD177 sejt felszíni markernek. A CD177, más néven neutrofil-specifikus antigén NB1, egy sejt felszíni marker, amely elsősorban a neutrofilek egy részén található (115). Ez egy glikoprotein, amely szerepet játszik a neutrofilek működésében, és bizonyos klinikai állapotokhoz kapcsolódik. A CD177 (NB1 és PRV-1) 58-64 kDa közötti méretű glycoprotein, mely kizárólag a neutrofileken expresszálódik, neutrofil metamyelocytakon és myelocytakon, de a vér többi alakos elemén nem (116, 117). Többek között bakteriális infekció során a CD177 sejt felszíni marker mennyisége a neutrofileken megnövekszik (118), továbbá a CD177 antitest-mediált clustering oxidatív stressz reakciót indít be a neutrofileknél (119). Ezekből a megfigyelésekből következtethetünk arra, hogy a CD177 sejt felszíni marker szerepet játszik a neutrofil „host-defense” folyamatban.

Egy másik tanulmány arról számol be, hogy a neutrofil-endotel sejt kapcsolat kialakulásában is szerepet játszik a CD177 (120). A CD177 a leukocita antigén-6 szupercsalád tagjaként hasonló szerkezettel rendelkezik, mint az urokináz-plazminogén aktivált receptor (121). Az urokináz plazminogén aktivátor receptor számos sejt-típuson expresszálódik és fontos szerepet játszik a sejt-extracelluláris mátrix és a sejt-sejt kölcsönhatásban a vitronektin kötődése, valamint a leukociták $\beta 1$ és $\beta 2$ integrinfüggő adhéziójának szabályozása révén (122).

A CD177 egy olyan marker, amely megkülönbözteti a vérben lévő neutrofilek egy bizonyos alcsoportját. Nem minden neutrofil granulocita expresszálja a CD177-et. Ez a specifitás teszi értékes markerré a neutrofilek azonosítására és jellemzésére laboratóriumi és klinikai körülmények között. A CD177 pontos funkciója a neutrofil granulocitákon nem teljesen tisztázott, de feltételezhetően szerepet játszik a neutrofil granulociták adhéziójában és a gyulladás ill. fertőzés helyére történő migrációban. A neutrofil aktiváció szabályozásában is részt vehet. (123).

Mindezeket figyelembe véve a CD177 sejt-felszíni marker keresése optimális választásnak tűnik, ha bakteriális indukción átesett neutrofil eredetű extracelluláris vezikulák azonosítását tervezzük, hiszen a CD177 expressziója kizárólag neutrofil granulocitákhoz köthető, bakteriális infekció során növekszik a sejt-felszínen való megjelenése

Azonban azt is figyelembe kell venni, hogy az extracelluláris vezikuláknak jelenleg nincsen egy, jól definiált markerük, hanem marker kombinációk alapján azonosíthatjuk őket. Amennyiben az áramlási citometriai mérések során egy partikulán mindkét jelölés detektálható, akkor feltételezhetjük, hogy az adott jelet adó részecske rendelkezik a neutrofil granulocita eredetű tulajdonságokkal.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálatunk során a nagyízületi protetika legrettegettebb szövődményével, a protézis körül kialakult fertőzés újfajta diagnosztikai lehetőségével foglalkoztunk. Ahogy azt a korábbi fejezetekben írtuk, mind a baktériumok direkt kimutatása, mind az immunrendszer aktíválódása során termelődő egy-egy specifikus fehérje detektálása nehéz feladat, emiatt más módszert kerestünk. Új lehetőséget jelentett az irodalmi áttekintőben részletesen tárgyalásra került, bakteriális hatásra a neutrofil granulocytákból felszabaduló extracelluláris vezikulák kimutatása. A feltételezésünk az volt, hogy azokban az esetekben, ahol a baktériumok a biofilmben élnek és rejtőznek a szervezet védekező rendszere elől így a hagyományos mikrobiológiai vizsgálatok álnegatív eredményt adhatnak, valamint a különböző biomarkerek szintje alacsony, az extracelluláris vezikulák kimutatása egy új út lehet a periprotetikus fertőzések diagnosztikai folyamatában.

Vizsgálatunk célja volt a biztosan szeptikus lazulás miatt revízióra kerülő protézis mellőli ízületi folyadékból izolált extracelluláris vezikulák izolálása és vizsgálata, valamint kontroll csoporthoz való hasonlítása. Mivel korábbi adat csak natív ízületekből izolált extracelluláris vezikulákról állt rendelkezésre, ezért a szeptikus revíziók kontroll csoportjának az aszeptikus lazulás miatt revízióra kerülő protézisek mellől vett ízületi folyadékból izolált extracelluláris vezikulákat választottuk. Így, az MSIS/ICM2018 kritériumok alapján biztosan szeptikus és biztosan aszeptikus protetizált ízületekből vett mintákat hasonlítottunk össze.

Az eddigi kutatások általában a gyulladós folyamatok egy-egy dedikált résztvevőjét vagy részletét vizsgálták. Vizsgálatunk célkitűzése volt az is, hogy a protézisek körül zajló infekciók folyamatát is megismerjük az extracelluláris vezikulák és az általuk szállított fehérjék megismerésén keresztül. Ezáltal egy komplex képet tudjunk felvetíteni a periprotetikus infekciós folyamattal kapcsolatban.

Munkánk során a következő feladatokat terveztük elvégezni és az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

1. Nem állt rendelkezésre számunkra ideális extracelluláris vezikula izolálási protokoll, ezért munkacsoportunk első és legfontosabb célkitűzése egy univerzális, mind szeptikus, mind aszeptikus mintával elvégezhető, standard, reprodukálható extracelluláris vezikula izolálási protokollt kidolgozása volt.

2. A vizsgálatunk további célkitűzése volt, hogy a szeptikus és aszeptikus revíziók során azonos körülmények között gyűjtött, előkészített mintákból izolált extracelluláris vezikulák mennyiségi és minőségi tulajdonságait különböző mérési technikákkal összehasonlítsuk. A membrán tulajdonságokat az irodalom által megjelölt sejtfelszíni markerek (annexin V, CD177) alapján vizsgáltuk és arra voltunk kíváncsiak, hogy a szeptikus mintából izolált vezikulák felületén nagyobb mennyiségben jelenik-e meg a fenti marker?

3. A klinikumban gyakran előfordul az, hogy a betegek úgy kerülnek periprotetikus fertőzés gyanújával vizsgálatra, hogy előzetesen antibiotikus kezelést kaptak. Fontosnak gondoltuk ezért annak a vizsgálatát, hogy befolyásolja-e az előzetes antibiotikus kezelés az ízületi folyadékból izolált extracelluláris vezikulák számát?

4. Tapasztalunk-e különbséget az extracelluláris vezikulákra vonatkozó mennyiségi és denzitás tulajdonságokban a szeptikus és aszeptikus minták között?

5. Morfológiai szempontból különböznek-e a két vizsgálati csoportból izolált extracelluláris vezikulák tulajdonságai?

6. Van-e különbség a szeptikus és aszeptikus mintákból izolált extracelluláris vezikulák által szállított proteinek összetételében?

3. MÓDSZEREK

Prospektív monocentrikus vizsgálatunkat a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikáján végeztük 2016-2020 között, a vizsgálat első fázisában 2016-2018-ig protokoll kidolgozás és validálás történt, 2018-2020 között vontuk be a vizsgált betegeket. A vizsgálat a Helsinki Deklaráció elveit követve, a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottság engedélyével (engedélyszám: SE TUKÉB: 4/2015) zajlott. Minden vizsgálatba bevont beteg a betegtájékoztató elolvasása után beleegyező nyilatkozatot töltött ki. A minták gyűjtése a MISEV ajánlása szerint történt ([124](#)).

A vizsgálatot két fázisra oszthatjuk.

Első fázis: klinikánkon korábban nem álltak rendelkezésre extracelluláris vezikulák vizsgálatára alkalmas eszközök, továbbá korábban nem zajlott intézetünkben extracelluláris vezikulák vizsgálata. Így legelőször ezen feltételek megteremtése, infrastruktúra és tudományos kapcsolatok kiépítése volt a legfontosabb feladat. Ez után a kezdeti fázisban irodalomkutatás és a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt és Immunbiológiai Intézet kutatócsoportjától kapott indulási protokollal kialakítottuk a saját, mind purulens szeptikus, mind mechanikus lazulás melletti ízületi folyadékra egységesen használható EV izolálási protokollunkat (lsd. következő fejezetek). Ezen minták mérési adatai hivatalos publikálásra nem kerültek, csak belső használatra készültek, ami alapján megbizonyosodtunk arról, hogy az általunk alkalmazott protokoll során valóban a keresett extracelluláris vezikulák izolációja történik. A minták tárolására biobankot hoztunk létre, mely folyamatosan őrzi az általunk gyűjtött natív és elkészített mintákat.

Második fázis: harmincnégy (n=34) standard módon előkészített minta minőségi és mennyiségi tulajdonságok elemzésére alkalmas vizsgálata történt áramlási citometria, elektronmikroszkóp, tömegspektrometria, NTA és mikrobiológiai vizsgálatok segítségével, majd ezen eredmények értelmezése, értékelése és publikálása.

3.1. Beteganyag

A vizsgálat második fázisában 17 szeptikus és 17 steril lazulásból származó mintát dolgoztunk fel (5. táblázat). A szeptikus csoportba bevont betegeket két alcsoportra osztottuk. Akut szeptikus szövődmény miatt 8 (nő:ffi=7:1) beteg vontunk be, közülük 4 teljes felszínpótló csípőprotézissel és 4 teljes felszínpótló térdprotézissel élt (átlag életkor: 75.3±9.4). Low-grade infekció miatt 9 beteg (nő:ffi=4:5) került bevonásra, közülük 6 teljes felszínpótló csípőprotézissel és 3 teljes felszínpótló térdprotézissel élt (átlag életkor: 73.1±11.4). A steril, mechanikus lazulás miatt operált betegek alkották a kontroll csoportot, amibe szintén 17 beteget (nő:ffi=15:2) vontunk be, közülük 13 teljes felszínpótló csípőprotézissel 4 beteg pedig teljes felszínpótló térdprotézissel élt (átlag életkor: 70.8±8.3). A periprotetikus fertőzés diagnózisának felállításakor a 2018-as Musculoskeletal Infection Society and International Consensus Meeting során megfogalmazott elveket követtük ([125](#)).

5. táblázat; A vizsgálatba bevont betegek demográfiai és klinikai adatait áttekintő táblázat.

	szeptikus		aszeptikus
	akut	low grade	
betegek (n=)	8	9	17
	(7 nő; 1 ffi)	(4 nő; 5 ffi)	(15 nő; 2 ffi)
életkor (év; átlag ± SD)	75.3 ± 9.4	73.1 ± 11.4	70.8 ± 8.3
érintett ízület (csípő/térd)	4 csípő / 4 térd	6 csípő / 3 térd	13 csípő / 4 térd
preoperatív CRP (mg/L; mean)	156	61	6.7
preoperatív We (mm/h; mean)	71	54.3	17.3
preoperatív WBC (G/L; mean)	13.1	10.2	5.9

3.2. Vezikula preparálás lépései szinoviális folyadékból:

3.2.1. A mintavétel menete

A vizsgálat protokollja szerint a mintavétel akut szeptikus, krónikus szeptikus, valamint aszeptikus lazulás miatt vizsgált betegek csípő-, térdízületeiből történt. A mintavétel vagy a műtét előtti kivizsgálás részeként, ambuláns keretek között végzett perkután ízületi punkció során (szükség szerint képerősítő segítségével), vagy már a sebészi ellátás alkalmával, a műtéti beavatkozás közben történt. Amennyiben revíziós beavatkozás alkalmával vettünk mintát, úgy a műtéti feltárást követően, de az ízületi tok megnyitása előtt, azon keresztül 18G-s tűvel végeztük azt. A vezikulák preparálásához legalább 3 milliliter minta levételére van szükség.

3.2.2. A levett minta transzportja

Az EV-k biológiai folyadékokban történő elemzését sok tényező zavarhatja, mint például a sejtek aktiválódása, amely *in vitro* vezikulációhoz vezet. A neutrofil granulociták az emberi testből kikerülve azonnal *ex vivo/in vitro* degranulálódnak. Ez a folyamat a mintában lévő extracelluláris vezikula koncentráció emelkedéséhez vezetne, így pontatlan mérési eredményeket kapnánk. Az *in vitro* degranuláció esélyének minimalizálása érdekében az ACD-A csövekben citromsav és dextróz található. A citrát (a heparinnal ellentétben) gyenge kelátképző hatással rendelkezik. A citrát kelát komplexet képezve az aktiváláshoz és degranulációhoz szükséges kalciumot kivonja a rendszerből megakadályozva ezzel a neutrofil degranulációt (126). Ezért a punkciót követően a levett mintát azonnal ACD-A (citrátos vérvételi cső) vákuumcsőbe tettük az *in vitro* vezikulatio elkerülése érdekében, ahogy azt a bevezetés elején hivatkozott György B. és munkatársai közleményében is szerepel (126). Egy kémcsőbe legalább 3 milliliter szinoviális folyadék kerül, melyhez hozzáadódik a kémcsőben lévő 1 ml folyadék (a véralvadás gátlás érdekében citromsavat és dextrózt tartalmaz). A minta előkészítését a levétel időpontjától számítva a lehető legrövidebb időn belül el kell kezdeni. A transzport ideje alatt, illetve az előkészítés elkezdéséig szobahőmérsékleten (23-25°C) tároljuk a mintát.

3.2.3. Alacsony fordulatszámon való első ülepités

Az előkészítés első lépéseként a levett mintát alacsony fordulatszámon centrifugáljuk, ezzel leülepitjük a kémcső aljára a sejtes elemeket (vörösvértest, apoptotikus sejtörmelék, fehérvérsejtek), az eljáráshoz BOECO gyártmányú asztali centrifugát használtunk 15 percen keresztül 2500 RCF fordulatszámon. Amennyiben a pungált váladék kifejezetten viszkózus, érdemes 20-25 percre növelni a centrifugálás idejét vagy kétszer ülepitni a mintát. A felülúszót hosszú 18G-s tűn keresztül óvatosan leszívjuk, gondosan ügyelve, hogy a mintánkba ne kerüljön az üledékből, másnéven pelletből. A továbbiakban a felülúszót használjuk tovább, a kémcső alján lévő üledéket kidobjuk. A fecskendőbe leszívott felülúszót kémcsövekbe osztjuk. A következő lépéseknél fel nem használt mintát -30°C -on fagyasztóban, beazonosításra alkalmas módon tároljuk.

3.2.4. Hyaluronidáz enzimmel történő emésztés

Az EV izolálási protokoll következő lépéseként hyaluronidáz enzim segítségével emésztjük a mintában jelenlevő extracelluláris mátrixot (hyaluronsav és hyaluronsav típusú mukopoliszacharidok hidrolizálása), hogy a harmadik lépésben alkalmazott szűrésnél a hyaluronsav és más mátrixképző polimerek egyrészt ne tömítsék el a szűrőt, másrészt azok a granulálódott polimerek, amik esetleg a mikrovezikulák mérettartományába esnek, ne adjanak megtévesztő eredményt. A minta hyaluronidázzal történő emésztése egy korábban közölt közleményben, szinoviális folyadékból izolált mikrovezikula preparátum izolálási protokolljában már sikerrel szerepelt ([127](#)). Az általunk használt hyaluronidáz enzimet juh heréből izolálták. Molekulasúlya: 55 kDa, tárolása -20°C -on, felhasználása szobahőmérsékleten történik. Biokémiai/életteni hatása: véletlenszerűen hasítja a β -N-acetilhexozamin-(1-4)-glikozid kötéseket a hyaluronsavban, kondroitinben és kondroitin-szulfátokban.

A hyaluronidáz enzim 440 mg (>3000 U/mg) liofilizált por formájában állt rendelkezésünkre, így szükség volt egy enzimet tartalmazó törzsoldat kitrálására. 100 mg liofilizált enzimet 10 ml PBS oldatban oldottunk fel. Vortexelés és $0,2\ \mu\text{m}$ -es szűrést követően egy teljesen tiszta, áttetsző törzsoldatot kaptunk. A hyaluronidáz enzimet három különböző koncentrációban (3000/1500/750 U/ml) is kipróbáltuk. A különböző

koncentrációban használt hyaluronidáz szemmel látható mértékben nem befolyásolta a mért eseményszámokat, ugyanakkor méréseink során megállapítottuk, hogy a 750 U/ml hígítás használatával valamivel nehezebb volt a minta 0,8 μm -es szűrése, mint a másik két töménységénél, azaz az enzim ebben a hígításban kevésbé tűnt hatékonyak. Az 1500 és 3000 U/ml koncentráció között érdemi különbséget nem tapasztaltunk, így a továbbiakban 1500 U/ml koncentrációban használtuk az enzimet.

A fenti vizsgálatok alapján protokollunkban a következők szerint jártunk el: az alacsony fordulatszámú ülepités után a 3 ml mintához 150 μl (30.000 U/ml) hyaluronidáz enzimet teszünk, ezáltal 1500 U/ml koncentrációban használjuk az enzimet. Szobahőmérsékleten 30 percig inkubáljuk, időnként óvatos forgatással keverést végzünk.

3.2.5. A minta szűrése 1,2 μm és 0,8 μm -es szűrőn keresztül

Az enzimmel való emésztési idő végén a mintát (0,2 μm -es szűrővel) szűrt PBS oldattal duplájára hígítjuk. Ezt követően BOECO asztali centrifugával 15 percig centrifugálunk 2500 RCF fordulatszámon, a továbbiakban ismét a felülúszóval dolgozunk. Ez után először 1,2 μm -es majd 0,8 μm -es fecskendő szűrőn keresztül gravitációs szűrést végzünk. A szűrést követően az átszűrt mintákat 2 ml-es Eppendorf csövekbe osztjuk szét.

3.2.6. A minta magas fordulatszámú ülepitése

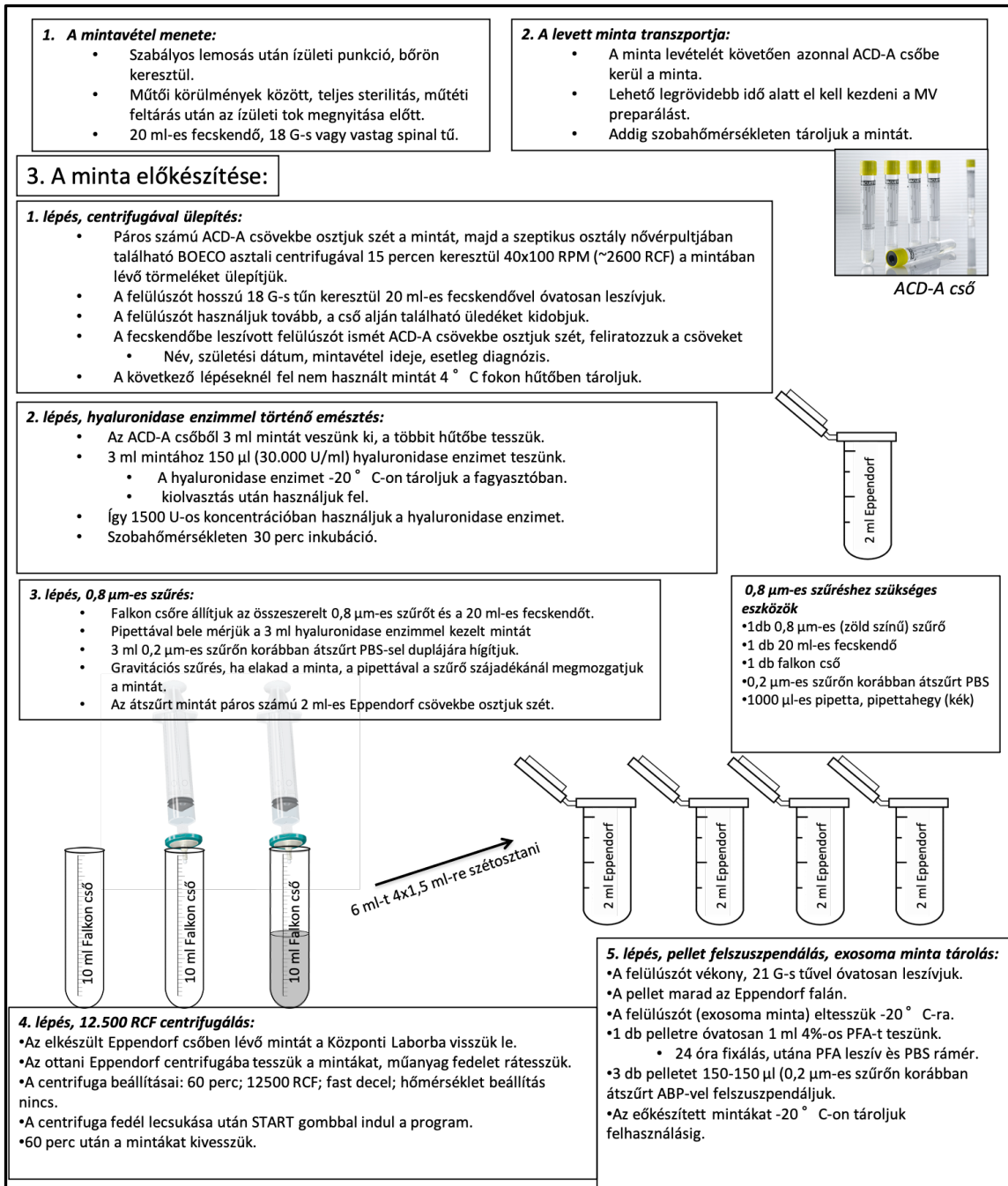
Az elkészült Eppendorf csőben lévő mintákat Eppendorf centrifugába tesszük, és 60 percen keresztül 12.500 RCF sebességgel, szobahőmérsékleten centrifugáljuk. Korábbi közlemények összehasonlító vizsgálatait figyelembe véve, többnyire két fordulatszámot, a 12.500 és 22.000 RCF-et javasoltak (127),(128),(129). A protokoll beállítások során mindkettőt kipróbáltuk és a mennyiséget qNANO-val mértük meg. Nem volt szignifikáns különbség a két fordulatszám között, így a 12.500 RCF-et alkalmaztuk a továbbiakban.

A centrifugálási idő letelte után a csöveket kivesszük, a felülúszót vékony, 21G-s tűvel, ügyelve a pelletre óvatosan leszívjuk. A pellet marad az Eppendorf cső falán. A felülúszóban exosomák (130),(131),(132),(133) vannak jelen, ezeket 100.000 G-s 60

perces ultracentrifugával történő ülepités után a vizsgálat későbbi fázisában terveztük felhasználni (134), addig -30°C -on tároljuk.

Az Eppendorf cső alján maradt pellet előkészítését az elvégzendő vizsgálatoknak megfelelő módszerrel fejezzük be. Transzmissziós elektronmikroszkópiára szánt mintát 4%-os paraformaldehiddel és glutáraldehiddel fixáljuk (hűtőben 4°C -on tároljuk). A tömegspektrometriára küldött mintát magas tisztaságú desztillált vízzel szuszpendáljuk fel. Az áramlási citométer vizsgálatához ABP-t használunk. Erre azért van szükség, mert az áramlási citometria során többek között Annexin V festékkel is jelölünk és az Annexin V mikrovezikulákhoz való kötődéséhez szükség van ABP oldatra. Az így előkészített mintákat -30°C -on tároljuk a további mérésekig.

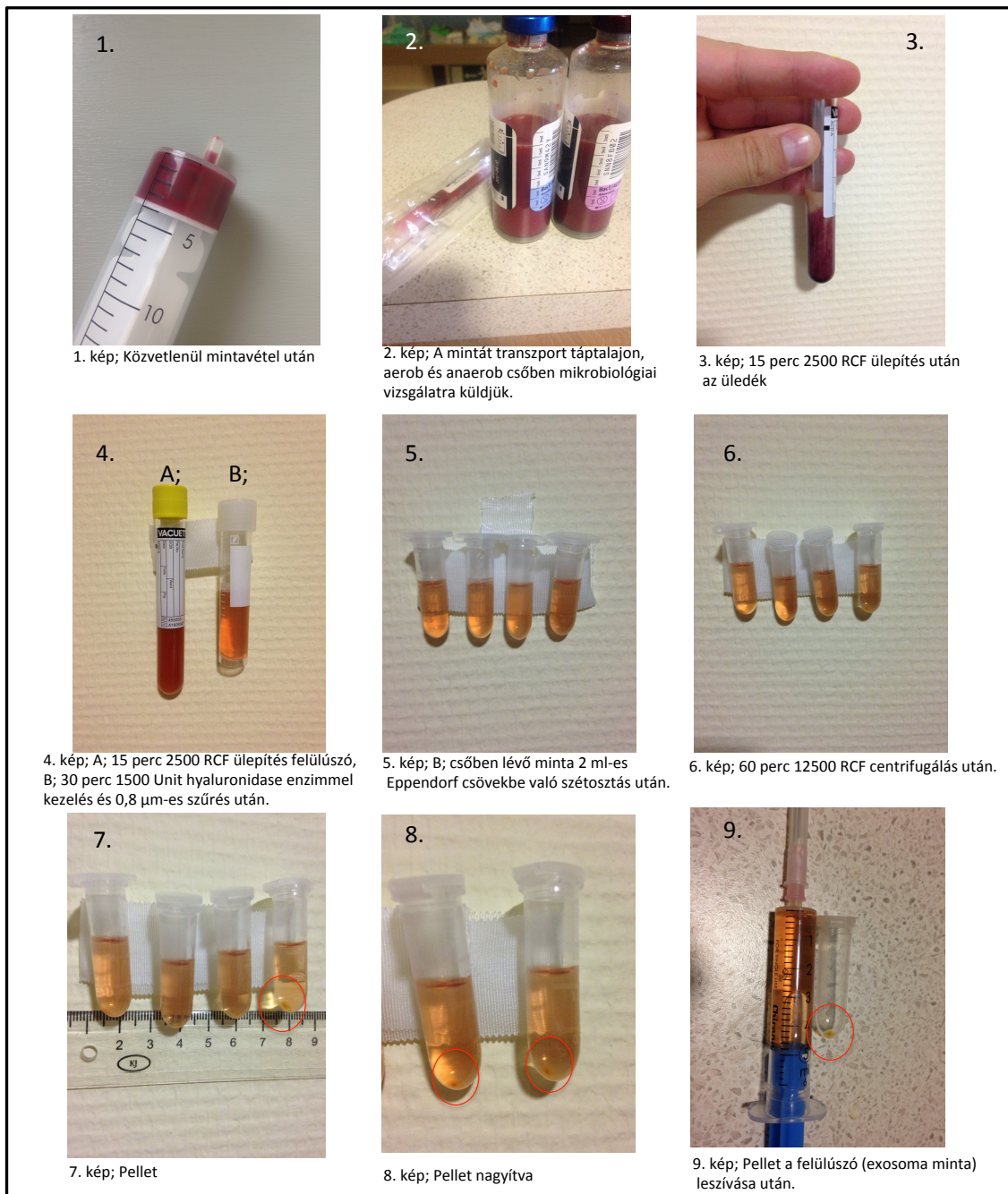
A vezikula preparálás lépéseit összefoglalva a 12-13. ábra mutatja be.



10. ábra; Az extracelluláris vezikulák izolálásának lépései, melyet munkacsoportunk szepsztikus és aszeptikus mintákra egyaránt optimalizált, így univerzálisan használható, ezáltal a minták előkészítése nem befolyásolja a további vizsgálatok összehasonlíthatóságát. (kiegészítés: a minták feldolgozása során nyert tapasztalatok alapján a feldolgozás lépéssorozatába bekerült a 0,8 µm-es szűrés elé egy 1,2 µm-es szűrési lépés azzal a céllal, hogy a nagyobb méretű elemeket előszűrje, és ezáltal javítsa a 0,8 µm-es gravitációs szűrés határfokát.)

[Ide írhat]

A vezikula preparálás lépései szinoviális folyadékból (fényképes dokumentáció)



11. ábra; Fényképes dokumentáció az extracelluláris vezikulák izolálásának lépéseiről. Az 1-3. képen látható, hogy az akut purulens, vérrel festenyzett ízületi váladékból is lehetséges az optimalizált protokoll segítségével az extracelluláris vezikulák izolálása. (megjegyzés: a mintavételek során bizonyosságot nyert, hogy könnyebb a feldolgozás és pontosabb a későbbi analízis, ha a minta nem véres, így a protokollt azzal módosítottuk, hogy a levett minta nem, vagy csak minimális mennyiségű vért tartalmazhat.)

3.3. Az izolált extracelluláris vezikulákon elvégzett vizsgálatok

A kutatás ideje során a vizsgálati technikák lehetősége a megszerzett tudással és a mintáinkban lévő extracelluláris vezikulák alaposabb megismerésével folyamatosan bővült. Továbbá a vizsgálatba bevont betegekben nyerhető minták mennyisége is széles spektrumon mozgott. Ezzel magyarázható az, hogy a következőkben felsorolt vizsgálati módszereket nem minden mintán végeztük el. A következőkben már a kidolgozott izolálási módszerrel elkülönített extracelluláris vezikulákon végzett további vizsgálatok ismertetése következik.

3.3.1. Az áramlási citometriai vizsgálat

Alapok: ez a technológia a folyadékszuszpenzióban lévő egyes sejtek és részecskék jellemzőinek elemzésére és számszerűsítésére szolgál. Az áramlási citometria lényege a lézersugár és a folyadékmintában lévő részecskék közötti kölcsönhatáson alapul. Ahogy a minta áthalad a lézersugáron, a kibocsátott fény különböző irányokban szóródik. Ez a szóródás információt szolgáltat a mintában lévő részecskék méretéről, szemcsézettségéről és alakjáról. Számos biológiai molekula, például antitestek, fluoreszcens markerrel jelölhetők. Lézerfény hatására ezek a markerek fluoreszcenciát bocsátanak ki, amely detektálható és mérhető. Ez lehetővé teszi az egyes sejtípusok azonosítását és a sejten belüli különböző molekulák mennyiségi meghatározását. Az egyes részecskék fényszórási és fluoreszcenciajellemzőinek elemzésével lehetővé válik a sejtípusok megkülönböztetése és tulajdonságaik, például a sejt felszíni markerek vagy a sejten belüli komponensek értékelése. Az áramlási citométeregek egyszerre több jellemzőt is képesek mérni, lehetővé téve több marker értékelését egyetlen mintán belül. Ez teszi az áramlási citometriát felbecsülhetetlenné az olyan összetett biológiai folyamatok vizsgálatában, mint az immunfenotipizálás és a sejt ciklus-elemzés(135, 136) .

A vizsgálathoz fluoreszcens festékekkel megjelölt antitesteket használtunk. (Sony Biotechnology, San Jose, USA). Minden mintát egységes protokoll szerint festettünk: 50 µl minta, 2 µl fluoreszcens festék. FITC-konjugált Annexin V, PE-konjugált anti-human CD177, fluoreszcenseket használtunk.

A festési fázis után 4°C-on 40 percet inkubáljuk a mintát. Inkubáció után ABP oldattal, szeptikus minták esetében ABP pufferben oldott antibiotikummal, 400 µl

össztérfogatra hígítjuk. Majd újabb 20 percig 4°C-on inkubáljuk. Az így előkészített mintákkal végeztük az áramlási citometriai méréseket.

Az áramlási citométer mérései során a vezikuláris és nonvezikuláris jelek (pl.: protein komplexek) is detektálásra kerülnek. Az extracelluláris vezikulák által keltett jeleket differenciálni szükséges a nonvezikuláris jelektől, hogy a mérési eredmények a valóságot tükrözzék. Annak érdekében, hogy elkülönítsük a vezikula és nem vezikula által keltett, áramlási citometriás vizsgálat során detektált jeleket, differenciáló detergens lízist végeztünk Triton X-100 (0,01%, 60 másodperc) detergens anyag segítségével az első áramlási citometriai vizsgálat után (137). A detergens lízis lépés során a Triton X-100 kezelés hatására a valóban vezikula természetű partikulák roncsolódnak és a kezelés után áramlási citométerrel nem detektálhatóak. A különbség az első és második mérés eseményszáma között adja meg a valós extracelluláris vezikulák által keltett eseményszámot, melyet a további elemzések során használtunk.

Az antibiotikumok extracelluláris vezikulákra gyakorolt hatását szintén áramlási citométerrel vizsgáltuk. A minták izolálása után a pelletben található extracelluláris vezikulákat különböző koncentrációban hígított antibiotikus oldattal reszuszpendáltuk. A méréseinkhez vancomycint és gentamicint használtunk; előbbi 4 µg/ml és 10 µg/ml, utóbbit 2 µg/ml és 5 µg/ml koncentrációban, melyek általában négy és tízszeres MIC értékek voltak. Először önmagában ABP-t, majd ABP-t antibiotikummal együtt alkalmaztunk. Kíváncsiak voltunk képez-e az antibiotikum olyan kristályokat, ami az áramlási citométeren detektálhatók, és zavaró lehet a mérés során? Aztán steril mintához adtunk antibiotikumot, hogy megnézzük, változtat-e a vezikulák megjelenésén. Végül szeptikus mintákat is kezeltünk antibiotikummal, összehasonítva a különböző koncentrációkat. Arra voltunk kíváncsiak, hogy az antibiotikum rongálja-e a vezikulák membránját, azaz okoz-e vezikulaszám veszteséget?

Ennél a mérésnél is kizárólag Annexin V-höz csatolt fluorokrómmal festettünk, mivel itt is csak a vezikula eredetű események detektálása a lényeges. Kémcsövek összetétele:

1. 50 µl minta + 2 µl Annexin V + 350 µl ABP (antibiotikum mentes)
2. 50 µl minta + 2 µl Annexin V + 350 µl ABP-ben oldott vancomycin

(cc. 4µg/ml)

3. 50 µl minta + 2 µl Annexin V + 350 µl ABP-ben oldott vancomycin

(cc. 10µg/ml)

4. 50 µl minta + 2 µl Annexin V + 350 µl ABP-ben oldott gentamicin (cc. 2µg/ml)

5. 50 µl minta + 2 µl Annexin V + 350 µl ABP-ben oldott gentamicin

(cc. 5µg/ml)

3.3.2. Tömegspektrometriai mérés (LC-MS analízis)

Alapok, folyadékkromatográfia (LC): Az LC összetett keverékeket az egyes összetevőire választja szét. Ebben a folyamatban egy folyékony mozgó fázis viszi át a mintát egy álló fázison (általában egy apró részecskékkel töltött oszlopon). Az elválasztás a vegyületek kémiai tulajdonságainak, például a polaritásnak, a méretnek és a töltésnek a különbségein alapul. Tömegspektrometria (MS): A tömegspektrometria az elválasztott vegyületekből keletkező ionok tömeg-töltés arányát méri. Ez a mintában lévő molekulák ionizálásával történik, jellemzően olyan technikákkal, mint az elektropray-ionizáció (ESI) vagy a légköri nyomású kémiai ionizáció (APCI). Az ionizáció után az ionok egy tömegelemző készülékbe kerülnek, amely szétválasztja őket. A tömegelemzők gyakori típusai közé tartoznak a kvadrupolok, a repülési idő (TOF) és az ioncsapdák. A tömegspektrum bizonyos értékeknél csúcsokat tartalmaz, amelyek megfelelnek a mintában lévő vegyületeknek. E csúcsok intenzitása arányos az egyes vegyületek mennyiségével. Ez az információ a keresett vegyületek azonosítására és mennyiségi meghatározására szolgál. Ezután komplex adatelemző szoftvereket alkalmaznak a tömegspektrumok értelmezésére és mennyiségi és minőségi eredmények létrehozására. Ezek az adatok segítenek az ismeretlen vegyületek azonosításában és az ismert vegyületek mennyiségi meghatározásában ([138](#), [139](#)).

Az EV-k fehérje tartalmát egymást követő fagyasztás-olvasztás ciklusok alkalmazásával nyertük ki ([140](#)). Tíz µg fehérjének megfelelő mintamennyiséget

emésztettünk oldatban tripszin enzim segítségével (141). Az enzim alkalmazása előtt a mintákat redukáltuk, majd a cisztein hidak visszaalakulásának megelőzése céljából alkiláltuk jódiacetamid reagenssel. Az így kapott peptideket szilárdfázisú extrakció segítségével sómentesítettük, majd 500 ng emésztményt injektáltunk a HPLC-MS rendszerbe (142). A nyers mérési adatokat a Compass DataAnalysis szoftverrel (Bruker, Bréma, Németország) dolgoztuk fel. A fehérjék azonosítását és jelölésmentes mennyiségi meghatározását a MaxQuant szoftverrel (1.6.17.0 verzió) végeztük egy szűkített fehérje adatbázison. A szűkített adatbázist a mintákban található fehérjék Byonic szoftverrel (v3.6.0, Protein Metrics Inc, San Carlos, CA, USA) történő azonosítását követően készítettük. A Byonic keresés során humán adatbázist és az alábbi keresési feltételeket alkalmaztuk: 20 ppm prekursor tömegtolerancia, 40 ppm fragmens ion tömegtolerancia, hasítási hely lizin és arginin aminosavak C-terminálisán, maximum 2 kihagyott hasítási hely peptidenként és 1% hamis találati arány. A peptideken az alábbi módosulásokat engedjük meg: karbamidometil /+57.021464 @ C | fix módosulásként, míg oxidáció /+15.994915 @ M | és Glu->pyro-Glu/-18.010565 @ NTerm E | variábilis módosulásként.

Az azonosított nagyszámú fehérjék vizualizálását és rendszerben történő elhelyezését segítik a fehérje-fehérje interakciós hálózatok klaszterezési és annotációs elemzési technikái. A fehérjék klaszterezésére számos különböző módszert ismerünk, mindnek van előnye és hátránya. A fehérjék klaszterezése más néven osztályokba sorolása történhet szekvencia-, szerkezeti-, és funkcionális hasonlóság alapján. Vizsgálatunkban a funkcionális alapú klaszterezést alkalmaztuk, mely a fehérjéket közös biológiai funkció vagy aktivitás alapján csoportosítja. Ez a klaszterezési forma különösen hasznos a fehérjék közötti funkcionális kapcsolatok azonosítására, mint például azonos anyagcsere-útvonal, vagy fehérjekomplex tagjai.

Az azonosított fehérjék funkcionális alapú klaszterezésére a STRING, KEGG, Gene Ontology adatbázisokat használtuk, melyek különböző módszereket használnak a fehérjék közötti funkcionális kapcsolatok azonosítására különböző bizonyítékforrások alapján, beleértve a kísérleti adatokat, a szekvencia-homológiát és a koexpressziós mintázatokat. A végleges vizualizációt Cytoscape 3.9.1. szoftverrel végeztük.

A STRING adatbázis által azonosított interakciók a következő értékekkel jellemezhetők. A fehérjék száma az adott ismert tagszámú hálózatban (count in network,

CIN pl.: 10/100): amiben az első szám a mintánkban azonosított fehérjék számát, a másik az adott hálózathoz az adatbázisban hozzárendelt összes fehérje számát jelenti. A (Strength) dúsulás mértéke a tízes alapú logaritmus az azonosított és az adatbázisban már ismert fehérje számok hányadosának. Az úgynevezett hamis találati arány (false discovery rate, FDR) azt mutatja meg, hogy mekkora eséllyel jelenik meg az adott interakció véletlenszerűen kiválasztott fehérjék esetén. Továbbá feltüntetjük azt is, hogy a mintánkból azonosított fehérjék hány százaléka (%) vesz részt az adott interakcióban.

Miután a fehérjéket funkcionális csoportokba soroltuk, fontos ezeknek a csoportoknak az információval való annotálása. A fehérjék annotálása során funkcionális címkékkel látjuk el azokat, ami kulcsfontosságú a fehérjék biológiai szerepének megértésében. A funkcionális alapú annotáció során egy fehérje tulajdonságait ismert funkciójú fehérjékkel való összehasonlításából következtethetjük.

A további statisztikai ábrázolás és számítás Graphpad és FunRich (3.1.4.) software-rel történt. Két mintás T-tesztet végeztünk $p < 0.05$ szignifikancia szint mellett.

3.3.3. Nanoparticle tracking analysis (NTA)

Alapelv: Lézeres fényszórás: Az NTA a lézerefény és a folyadék szuszpenzióban lévő nanorészecskék kölcsönhatásán alapul. Egy lézersugarat irányítanak a mintán keresztül, és ahogy a nanorészecskék áthaladnak a sugáron, szórják a fényt. Ez a szórás arányos a részecskék méretével. Brown-mozgás elemzése: Az NTA a nanorészecskék Brown-mozgását követi. Mivel a nanorészecskék véletlenszerűen mozognak egy folyékony közegben, mozgásukat befolyásolja a méretük. A kisebb részecskék kisebb tömegük miatt gyorsabb és kiszámíthatatlanabb mozgást végeznek, míg a nagyobb részecskék lassabban mozognak. Egy nagysebességű kép rögzítésére alkalmas kamera rögzíti a fény szóródását és a nanorészecskék mozgását. Ezt a videoadatot ezután elemzik az egyes részecskék nyomon követése, valamint méretük és koncentrációjuk számszerűsítése céljából. Az egyes részecskék mozgását idővel elemzik, így információt kapnak a méretükről és a diffúziós együtthatójukról. A részecskék mozgásának elemzésével és ismert kalibrációs szabványokkal való összehasonlításával az NTA szoftver kiszámítja a mintában lévő részecskék méreteloszlását. A nanorészecskék koncentrációját is megbecsüli. Komplex adatelemző eszközökkel értelmezi a videoadatokat, és méreteloszlási hisztogramokat,

koncentrációméréseket és más, a részecskékkel kapcsolatos mérőszámokat készít. Ezek az adatok segítenek a minta részecskepopulációjának megértésében ([143](#), [144](#)).

Ezzel a vizsgálati technikával három (n=3) szeptikus és négy (n=4) aszeptikus minta került elemzésre. Az extracelluláris vezikula méreteloszlás és koncentráció vizsgálatára ZetaView PMX120 készülékkel (Particle Metrix, Germany) végeztünk méréseket. A megfelelő partikula koncentrációs tartomány elérésére a mintákat 1 ml foszfát pufferelt oldatban (PBS) hígítottuk. Minden mérést 11 ponton scannelt a készülék, 25°C-on (2 ciklusban) a következő kamera beállításokkal: shutter speed-100, sensitivity-75, frame rate-7.5, video quality—medium (30 frames). A videó értékelése ZetaView Analyze software 8.05.10 segítségével történt, minimum terület 5, maximum terület 1000, minimum világosság 20.

3.3.4. Elektronmikroszkópos vizsgálat (Transmission Electron Microscopy TEM)

Alapelv: A fénymikroszkóptól eltérően a TEM látható fény helyett fókuszált elektronsugarat használ. Az elektronok rövidebb hullámhosszúak, ami sokkal nagyobb felbontást tesz lehetővé. A TEM-ben az elektronok áthaladnak a mintán, ami lehetővé teszi a belső struktúrák hihetetlen részletességű megfigyelését. A mintáknak ultravékonyaknak kell lenniük, jellemzően 100 nanométer körüli vékonyságúnak, és a kontraszt fokozása érdekében nehézfémekkel kell megfesteni őket. A mágneses lencsék az elektronsugarat a mintára, majd egy detektorra fókuszálják, és így képet készítenek ([145](#), [146](#)).

Hat mintát (2 aszeptikus, 2 low-grade infekció és 2 akut szeptikus) vizsgáltunk TEM segítségével. A vizsgálat célja az extracelluláris vezikulák vizualizálása minden típusú mintában, azok tulajdonságainak, hasonlóságainak és különbségeinek morfológiai leírása volt. Az extracelluláris vezikula izolálási protokoll végén kapott pellettről minden PBS-t eltávolítottunk és 4%-os paraformaldehiddel (pH 7,5) fixáltuk 2 órán keresztül szobahőmérsékleten. Leöblítettük PBS oldattal, majd 1%-os OsO₄ segítségével postfixáltuk 15 percig. Rövid desztillált vizes öblítést követően a pellet dehidrációja következett ethanollal, majd festés 1%-os uranyl acetattal 50%-os ethanolban 15 percre. Végül Taab 812 (Aldermaston T031 UK) gyantába ágyazás következett, mely egy éjszakán keresztül 60°C-on polymerizálódott. Ezt követően 60 nm-es ultravékony

metszést végeztünk Leica UCT ultramicrotome (Leica Microsystems, UK) segítségével és az elkészült metszeteket Hitachi7100 (Hitachi, Japan) elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A kontraszt és világosság Adobe Photoshop CS3 (Adobe Photoshop Incorporation, CA) segítségével került beállításra.

3.3.5. Mikrobiológiai vizsgálat

Minden betegből mikrobiológiai vizsgálatra is küldtünk mintát. A műtét előtt történt a percutan mintavétel, mely segített a besorolásban, hogy a szeptikus vagy az aszeptikus csoportba kerülnek-e a betegek. Emellett a műtét közben nyert mintákból is kerültek mikrobiológiai vizsgálatra transzport táptalajon és hemokultúrák palackban minták. Ezeket az eredményeket is feldolgoztuk.

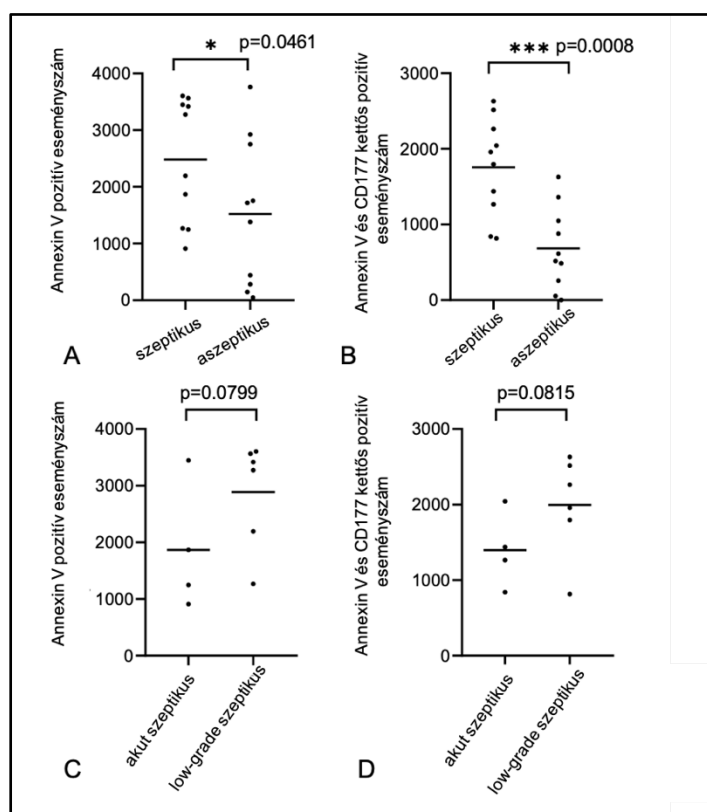
3.3.6. Statisztikai elemzések

A statisztikai elemzés és grafikai ábrázolás a Perseus és GraphPad statisztikai software-ek segítségével történt. A vizsgálati csoportok közti eltérések megállapítása az egyes vizsgálati csoportokban való normál eloszlás kiszámolása után T-próba, one-way ANOVA és post hoc Tukey statisztikai tesztekkel történt. A különbséget szignifikánsnak tekintettük, ha a $p < 0.05$. A flow citometriai és tömegspektrometriai adatok $\text{mean} \pm \text{SD}$ formában kerültek megadásra.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Áramlási citometria mérések eredményei

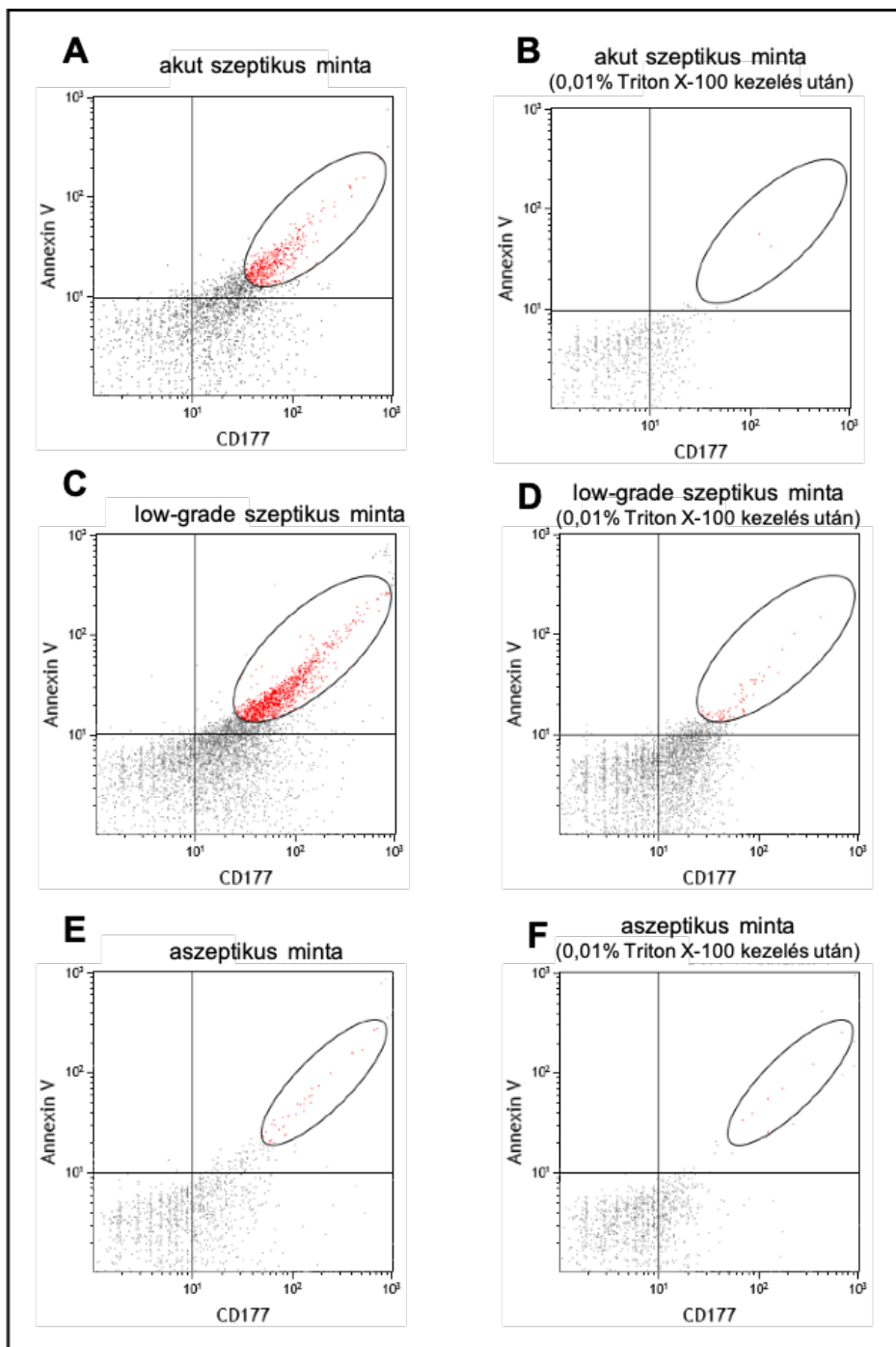
Tíz (n=10) szeptikus (6 akut és 4 low-grade) és tíz (n=10) aszeptikus mintát vizsgáltunk. Először kizárólag FITC konjugált Annexin V jelölést alkalmaztunk a vezikula természet igazolására. A detergens kezelés után az első mérés során detektált események számából kivontuk a második mérés (detergens lízis után) során detektált jeleket. A két mérés különbsége volt a valódi extracelluláris vezikulák által keltett jelek, melyek a detergens lízis után már nem voltak detektálhatóak. A kiszámolt eseményszám a szeptikus mintákban 2480 ± 1096 esemény volt, míg az aszeptikus csoportban 1521 ± 1308 esemény volt (13 ábra A).



13. ábra; Annexin V jelölt eseményszám szignifikánsan magasabb volt a szeptikus csoportban ($p=0,046$, t-teszt), mint az aszeptikus csoportban. A CD177 és Annexin V dupla jelölés szignifikánsan magasabb volt a szeptikus csoportban ($p = 0.000809$, t-teszt), mint az aszeptikus csoportban (A,B). Az akut és low-grade szeptikus minták között nem volt szignifikáns különbség (C,D)

A különbség a két csoport között szignifikáns volt ($p = 0.046$, t-teszt). Nem volt szignifikáns különbség az akut és low-grade szeptikus minták között ($p = 0.0799$ és $p = 0.0815$, t-teszt), (13. ábra C, D). Kettős jelölést, FITC konjugált Annexin V és PE konjugált anti-human CD177 antitesttel végeztük (13. ábra B), mely szignifikánsan magasabb eseményszámot mutatott a szeptikus minták között, mint az aszeptikus mintákban (1753 ± 648 vs. 648 ± 541 esemény, illetve, $p = 0.000809$, t-teszt).

Az áramlási citometria vizsgálat során kapott mérési eredmények vizuális anyagát (14. ábra) dot plot segítségével szemléltetjük. Az extracelluláris vezikulák által kiváltott, 200-800 nm tartományba eső eseményszámok kerültek regisztrálásra, amik detergens lízis után már nem voltak detektálhatóak. Az aktivált neutrofil granulocitákra jellemző CD177+ eseményszám nagyobb mennyiségben volt detektálható a szeptikus mintákból izolált extracelluláris vezikulák felszínéről, mint az aszeptikus mintákból izolált extracelluláris vezikulák felszínéről. Minden mintánál kettős fluoreszcens jelölést alkalmaztunk, Annexin V és CD177 kombinációban. Az aszeptikus mintákban kevésbé látható a csóva szerű kép (E) és a detergens lízis után (F) sem változott túlzottan a detektált jelek mennyisége.



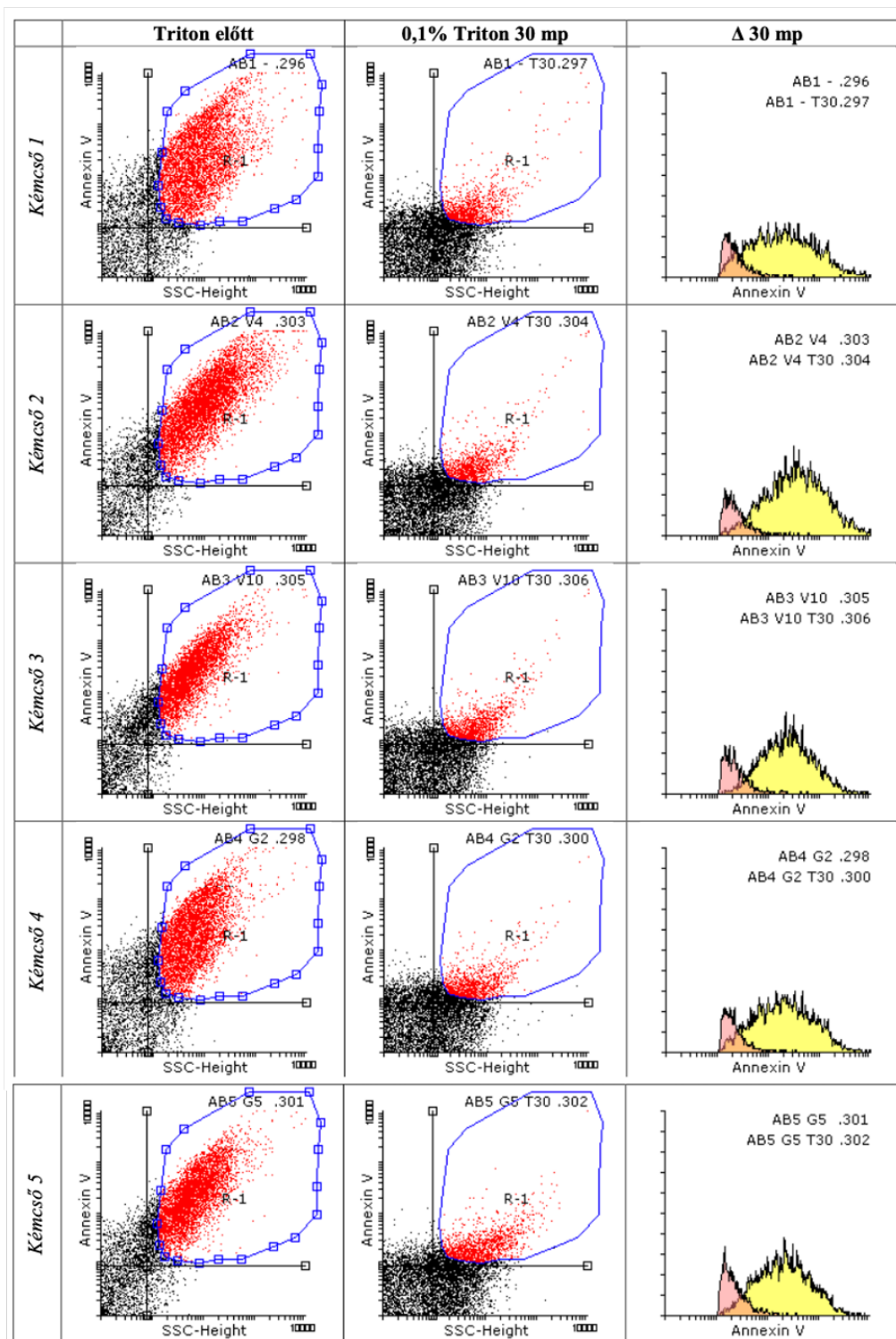
14. ábra; A dot plot ábrák mutatják az akut szeptikus (A), low-grade szeptikus (C) és aszeptikus (E) mintákat, melyeket annexin V és CD177 sejtfelszíni markerekkel jelöltünk. Miután 0,01%-os Triton X-100 detergenssel kezeltük a mintákat (B,D,F) a valódi extracelluláris vezikulák által keltett jelek eltűntek a dot plotról. A két mérés közti eseményszám különbség adja meg a valós extracelluláris vezikula számot.

[Ide írhat]

Az antibiotikus kezelés után a mintákból mért extracelluláris vezikulák által keltett események száma (6. táblázat, 15. ábra) nem különbözött szignifikáns (t-teszt, $p=0,2469$) mértékben az antibiotikus kezelés nélküli méréshez hasonlítva. A 15. ábra mutatja az antibiotikus kezelés nélkül (kémcső 1), a vancomycin 4 μ g/ml (kémcső 2), a vancomycin 10 μ g/ml (kémcső 3), a gentamicin 2 μ g/ml (kémcső 4) és gentamicin 5 μ g/ml (kémcső 5) FACS méréseinek dot plot ábráit.

6. táblázat; az antibiotikum kezelés hatása az extracelluláris vezikulák által áramlási citometriás mérés során keltett eseményszámokra.

($p=0,2469$)	minta 1	minta 2	minta 3	minta 4	minta 5
detergens (triton) előtt	4694	5920	4400	4720	4630
0,1% Triton 30 mp	1085	1080	1130	1060	1389
különbség	3609	4840	3270	3660	3241

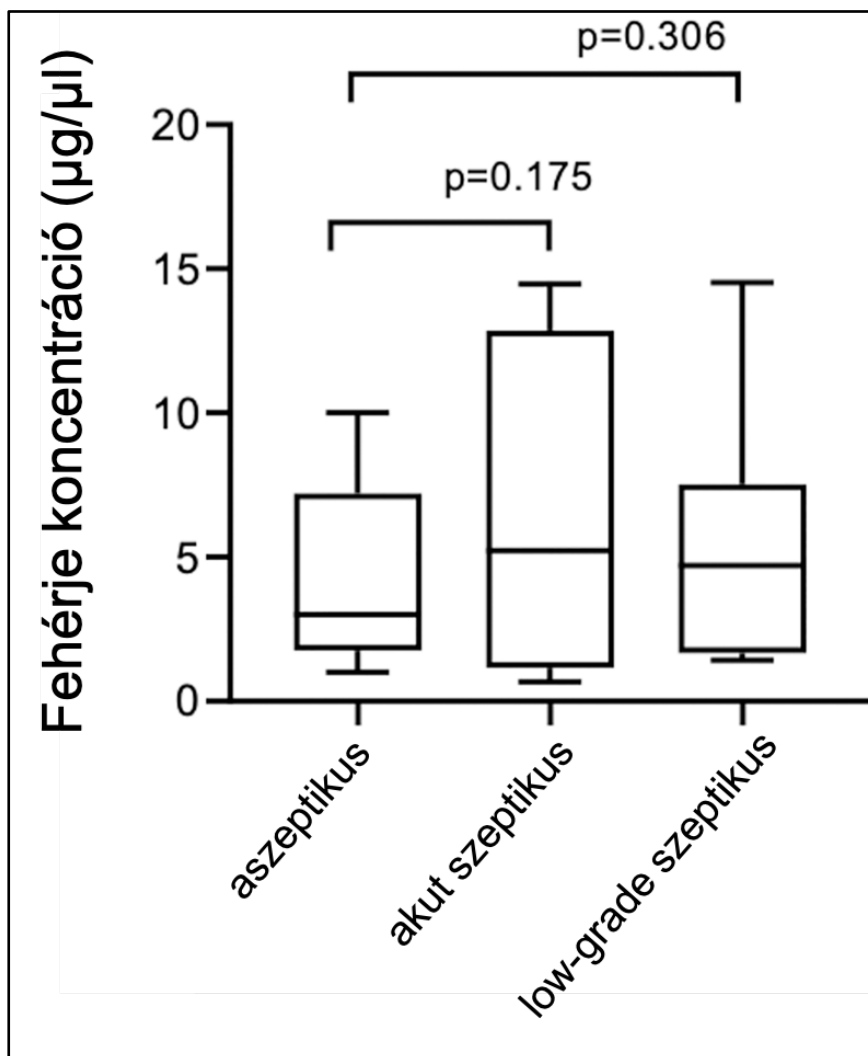


15. ábra; Antibiotikus kezelés hatása az EV-k eseményszámára az antibiotikumok különböző koncentrációi függvényében. (SSC-H: relatív granuláltság; Annexin V: festettség; R-1: általunk mért mikrovezikulák tartománya) Színekódok: fekete: mért esemény; piros: kijelölt tartományban mért esemény; citromsárga: Triton előtt; narancssárga: Triton után 30 mp)

[Ide írhat]

4.2. Tömegspektrometriai elemzés (LC-MS analízis)

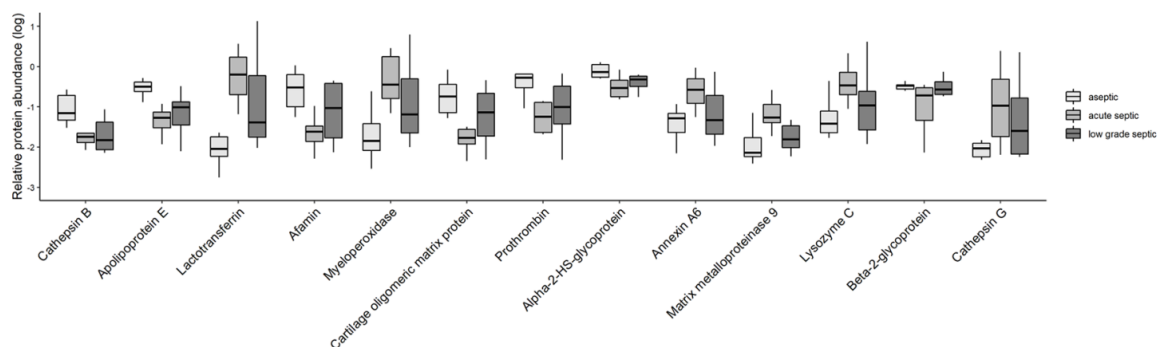
A tömegspektrometriai vizsgálatainkat kilenc (n=9) aszeptikus, hat (n=6) akut szeptikus és hét (n=7) low-grade szeptikus mintán végeztük el. A kumulált fehérje koncentráció (16. ábra) az akut szeptikus mintákban $6.65 \pm 6.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, a low-grade szeptikus mintákban $5.3 \pm 4.67 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ és az aszeptikus mintákban pedig $4.3 \pm 3.32 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ volt. A három csoport fehérje tartalma között nem volt szignifikáns különbség.



16. ábra; A tömegspektrométerrel vizsgált minták kumulált fehérje koncentrációja (ug/ul). Az akut szeptikus csoportban volt a legmagasabb, ezt a low-grade szeptikus minták követték, a legalacsonyabb az aszeptikus mintákban volt. A különbségek nem voltak szignifikánsak ($p = 0.175$ és $p = 0.306$).

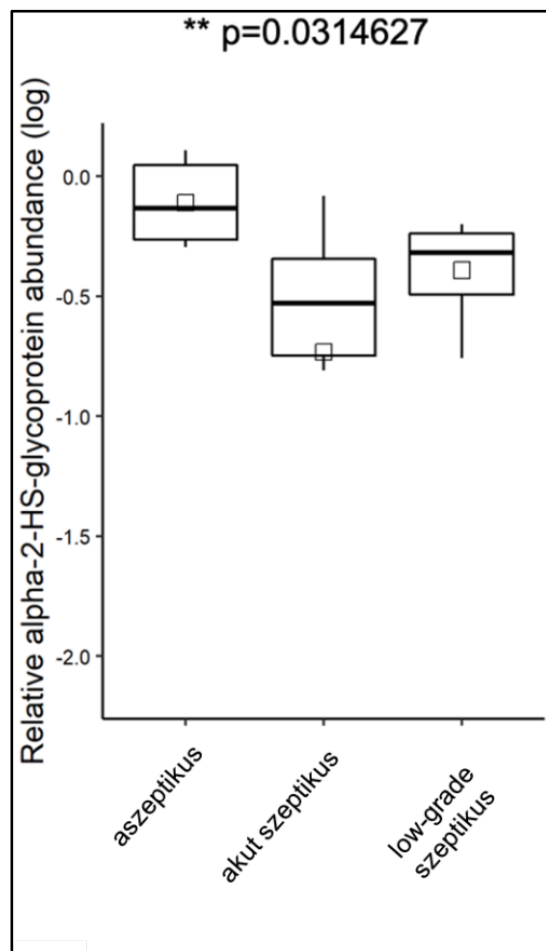
[Ide írhat]

A három csoportban összesen háromszáznyolcvan (n=380) fehérjét sikerült azonosítani. Normalizálás után azokat a fehérjéket választottuk ki további statisztikai analízisre (ANOVA és FDR korrekció), amelyek legalább a minták két-harmadában jelen voltak detektálható mennyiségben (17 ábra).

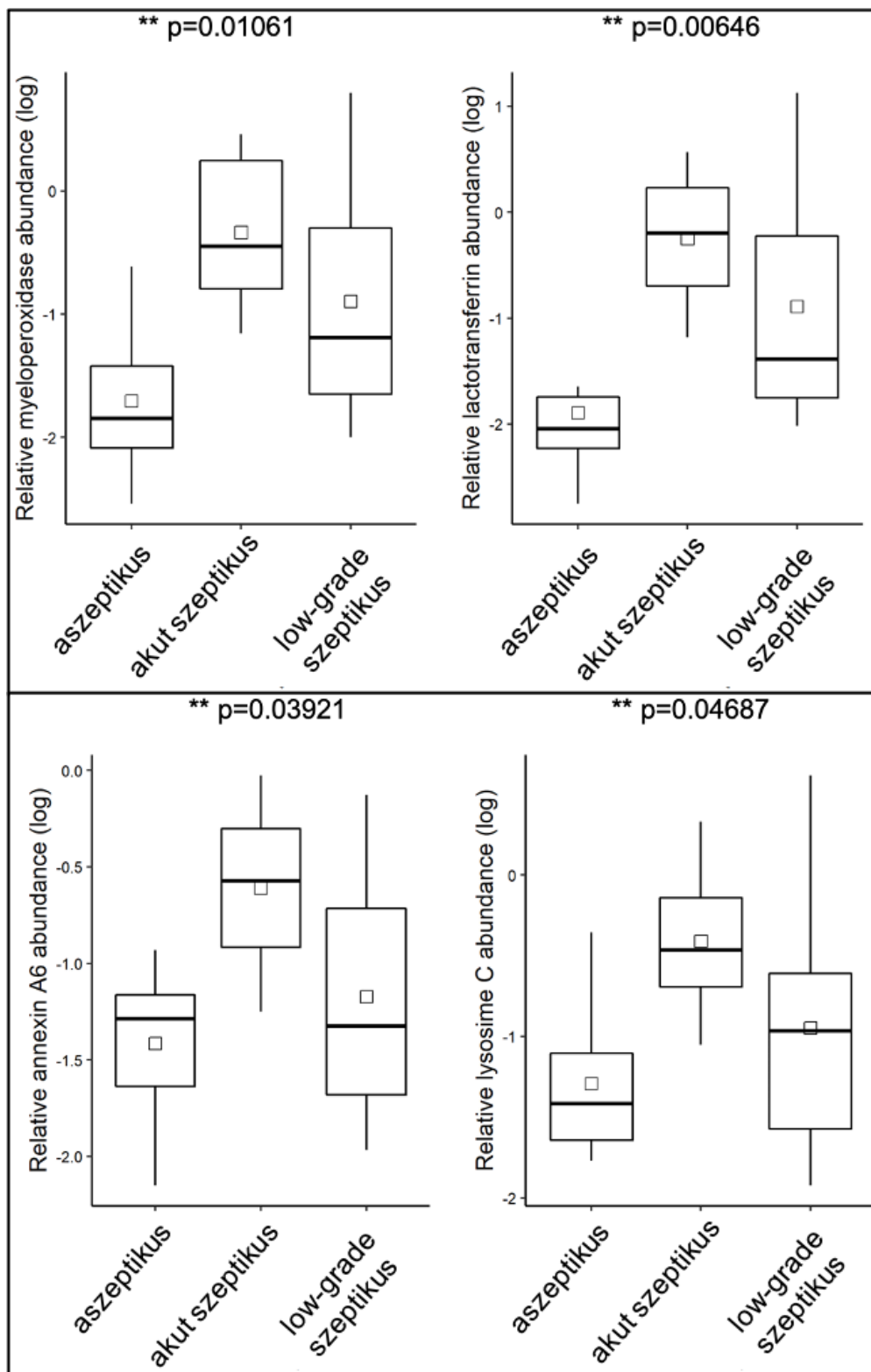


17. ábra; A relatív extracelluláris vezikula fehérje mennyisége (log) a három felsorolt csoportban. A boxok mutatják az azonosított fehérje mennyiségeket logaritmizálás után. Az átlag értékeket a boxokban feltüntetett fekete vonalak jelzik.

A vizsgált fehérjék közül az alpha-2-HS-glycoprotein-nek (18. ábra) volt szignifikánsan magasabb mennyisége ($p=0,0314627$) az aszeptikus mintákban, mint az akut szeptikus mintákban. A szeptikus mintákban mért fehérjék közül szignifikánsan magasabb volt a mennyisége a lactotransferrinnek, myeloperoxidasnak, lysosyme C-nek és annexin A6-nak (19. ábra). Az ábrákon a vizsgált fehérjék „relative abundance (log)” értékei láthatóak. Mivel ennek megfelelő jól használható rövid fordítás nem áll rendelkezésre, ezért az ábrát nem fordítottuk le, de a szöveges részben magyar fordítással körülírtuk.



18. ábra; Az alpha-2-HS-glycoprotein mennyisége szignifikánsan magasabb volt az aszeptikus mintákban ($p=0,0314627$) mint az akut szeptikus mintákban.



19. ábra; A szeptikus mintákban a lactotransferrinnek, myeloperoxidasnak, lysosyme C-nek és annexin A6-nak volt szignifikánsan magasabb a mennyisége az aszeptikus mintákhoz viszonyítva.

4.2.1. Az akut és a krónikus szeptikus mintákból izolált extracelluláris vezikulák fehérjéi közti azonosságok.

A szeptikus és aszeptikus minták összehasonlítása után az akut szeptikus és low-grade (krónikus) szeptikus minták extracelluláris vezikula fehérje tartamát hasonlítottuk össze.

Az azonosított fehérjéinket a következő csoportokra osztottuk: akut – csak az akut mintáknak legalább felében, de a krónikus mintáknak kevesebb mint felében azonosított (50 db fehérje); krónikus – csak a krónikus mintáknak legalább felében, de az akut mintáknak kevesebb mint a felében azonosított (33 db fehérje); „mind” – minden akut és minden krónikus mintában, azaz az összes (13 db) mintában azonosítható fehérje (86 db), továbbá azok a fehérjék, melyeket mind az akut, mind a krónikus mintáknak több mint felében azonosítottunk (222 db fehérje).

A fehérje kölcsönhatási hálózatok vizsgálata és a funkcionális feldúsulási elemzése fontos fehérjekapcsolatokat tárt fel és jelentős biológiai útvonalakat emelt ki, részletes képet adva arról, hogy a fehérjék hogyan működnek együtt, és milyen alapvető funkciókhoz járulnak hozzá a sejtben. Ezt a vizsgálatot STRING adatbázis elemző program segítségével végeztük. Az azonosított fehérjéket számos, biológiai folyamatban való részvételük alapján lehet elemezni. A következőkben a vezikula mediált transzport folyamat példáján részletes szöveges magyarázattal kifejtve elemzünk végig egy, az izolált fehérjék alapján felmerülő biológiai útvonalat a következő szempontok alapján (a könnyebb olvashatóság kedvéért az összes elemzett biológiai folyamat a 6. táblázatban kerül összefoglalva ábrázolásra).

A kiválasztott biológiai folyamat: *vezikula mediált transzport folyamatban* a CIN: 48/1699, (ez az általunk azonosított fehérje, minden mintában meglévő fehérje 62.3%-a), a dúsulási hatás: 0.86; FDR: 1.76×10^{-28} .

Ha ezeket az értékeket külön elemezzük, a következőket mondhatjuk el. CIN (Count in Network, szám a hálózatban): A vezikulák által közvetített transzportfolyamat összefüggésében a CIN: 48/1699 azt jelenti, hogy a STRING adatbázisban ismert és ehhez a folyamathoz csoportosított 1699 fehérjéből a mintáinkból 48 fehérje vesz részt a vezikulák által közvetített transzportfolyamatban vagy kapcsolódik ahhoz. Ez a metrika a meghatározott folyamaton belüli fehérjék számát jelzi az összes kimutatott fehérjéből.

A mintában jelen lévő összes fehérje 62,3%-a: Ez arra utal, hogy a mintában azonosított fehérjék 62,3%-a részt vesz a vezikulák által közvetített transzportfolyamatban. Ez az adott folyamathoz kapcsolódó fehérjék számának aránya az összes kimutatott fehérje számához viszonyítva.

Összefoglalva, az elemzés azt jelzi, hogy a mintáinkból azonosított fehérjék csoportjában a vezikulák által közvetített transzportfolyamatban jelentős számú fehérje vesz részt (1699 ismert fehérjéből 48), ami a mintában lévő összes fehérje körülbelül 62,3%-át teszi ki. Ezek a fehérjék olyan feldúsulási hatást mutatnak, amely arra utal, hogy a véletlenszerűség alapján várhatóhoz képest mérsékelten felülreprezentáltak, és a rendkívül alacsony FDR kiemeli, hogy nagy a megbízhatóság az azonosított fehérjéknek a vezikulák által közvetített transzportfolyamathoz való társulásában.

Dúsulási hatás (dúsulási arány): A 0,86-os dúsulási hatás (enrichment effect) érték azt jelzi, hogy a vezikulák által közvetített transzportfolyamathoz kapcsolódó fehérjék milyen mértékben felülreprezentáltak ahhoz képest, ami véletlenszerűen várható lenne. Az 1-hez közeli érték azt jelenti, hogy ezek a fehérjék mérsékelten dúsultak.

FDR (False Discovery Rate): ez a mérőszám, $1,76 \times 10^{-28}$, rendkívül alacsony érték. Az FDR egy olyan statisztikai mérőszám, amely azt a valószínűséget mutatja, hogy tévesen azonosítják-e a fehérjék és a folyamat (ebben az esetben a vezikulák által közvetített szállítás) közötti asszociációt, amikor valójában nincs is kapcsolat. Az alacsony FDR, mint például a fenti érték, magas szintű megbízhatóságot sugall a talált asszociációkkal kapcsolatban - ami nagy valószínűséggel jelzi, hogy ezek az asszociációk nem a véletlen művei. A továbbiakban még pár biológiai folyamat mért adatait listázzuk fel, az értelmezésük a fentieknek megfelelően lehetséges.

A 7. táblázatban a következő biológiai folyamatok kerültek még kiemelésre: *neutrofil degranulációs* folyamatban CIN: 25/485; (32.5%) dúsulási hatás: 1.12; FDR: 9.33×10^{-19} (7. táblázat). Az *idegen organizmusra adott védekező reakció* folyamatában CIN: 24/859; (31.2%) dúsulási hatás: 0.85; FDR: 9.28×10^{-13} . A *neutrofil degranuláció pozitív szabályozása* folyamatban CIN: 2/4; (2.3%), dúsulási hatás: 2.1; FDR: 0.0016. A *bakteriális agglutináció indukciójának* folyamatában szintén CIN: 2/6; (2.3%), dúsulási hatás: 1.93; FDR: 0.0028.

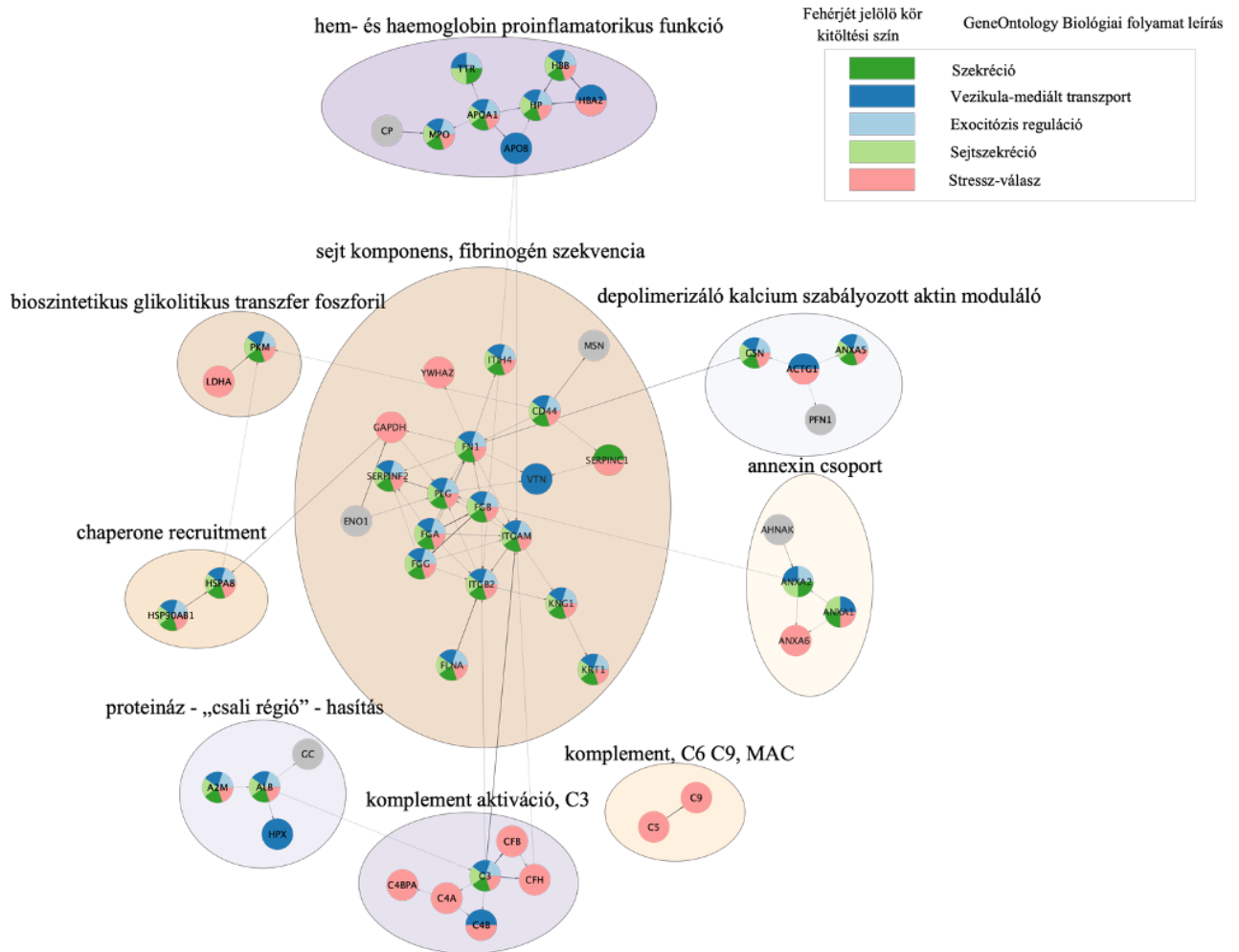
7. táblázat; A fehérjék száma az összes mintában, jellemzően az akut és krónikus mintákban, amelyek egy adott hálózatban jelen vannak, ismert tagokkal (count in network, CIN), a feldúsulás mértéke, a false discovery rate (FDR), valamint az azonosított fehérjék százalékos aránya az adott folyamatban érintett minta (%). *(KEGG Pathways)

	Biological process (Gene Ontology)	Count In Network (CIN)	Strength Log10(observed / expected)	False Discovery Rate, (FDR)	% (biological process protein/all observed)
all samples	vesicle-mediated transport	48/1699	0,86	1.76×10^{-28}	62,3
	neutrophil degranulation	25/485	1,12	9.33×10^{-19}	32,5
	defense response to other organism	24/859	0,85	9.28×10^{-13}	31,2
	positive regulation of neutrophil degranulation	2/4	2,1	0.0016	2,3
	induction of bacterial agglutination	2/6	1.93	0.0028	2.3
	Complement and coagulation cascades *	20/78	1.81	1.81×10^{-27}	25,9
	Staphylococcus aureus infection *	10/50	1,7	2.39×10^{-12}	12,9
mainly acute	vesicle-mediated transport	27/1699	0.81	1.62×10^{-13}	54
	neutrophil degranulation	15/485	1.1	6.81×10^{-11}	30
	neutrophil mediated immunity	15/498	1.12	2.06×10^{-11}	30
mainly low-grade	vesicle-mediated transport	15/1699	0.84	2.36×10^{-7}	45.5
	neutrophil degranulation	7/485	1.05	0.00016	21.2
	inflammatory response	4/482	0.81	0.0370	12
	complement activation, classical pathway	3/34	1.84	0.00056	8.8

Az EV-k feltárása után a minták vizsgálata során 222 olyan fehérjét azonosítottunk, mely az akut és a krónikus csoportban legalább a minták felében megtalálható volt. Ezeket számos szempont szerint megvizsgáltuk. Először ezek közül azokat a fehérjéket elemeztük, melyek az összes 13 vizsgált mintában detektálható mennyiségben jelen voltak. Ez alapján mindkét csoportban (akut és a krónikus fertőzés) azonosított fehérjék száma 86 darab volt (20 ábra).

A 20. ábrán látható a minden mintában azonosított fehérjék közti interakciók ábrázolása nyilak segítségével, illetve ez alapján történő klaszterekbe sorolása. Az általunk alkalmazott beállítással kilenc klaszter került megkülönböztetésre. Ezek közül fontos kiemelni a hem- és hemoglobin proinflammatorikus funkcióval bíró csoportot, valamint a komplement kaskád két csoportját. Az ábrán színekkel jelöltük azokat a biológiai folyamatokat, amelyekben az azonosított fehérjék részt vesznek.

Minden mintában
megjelenő fehérjék



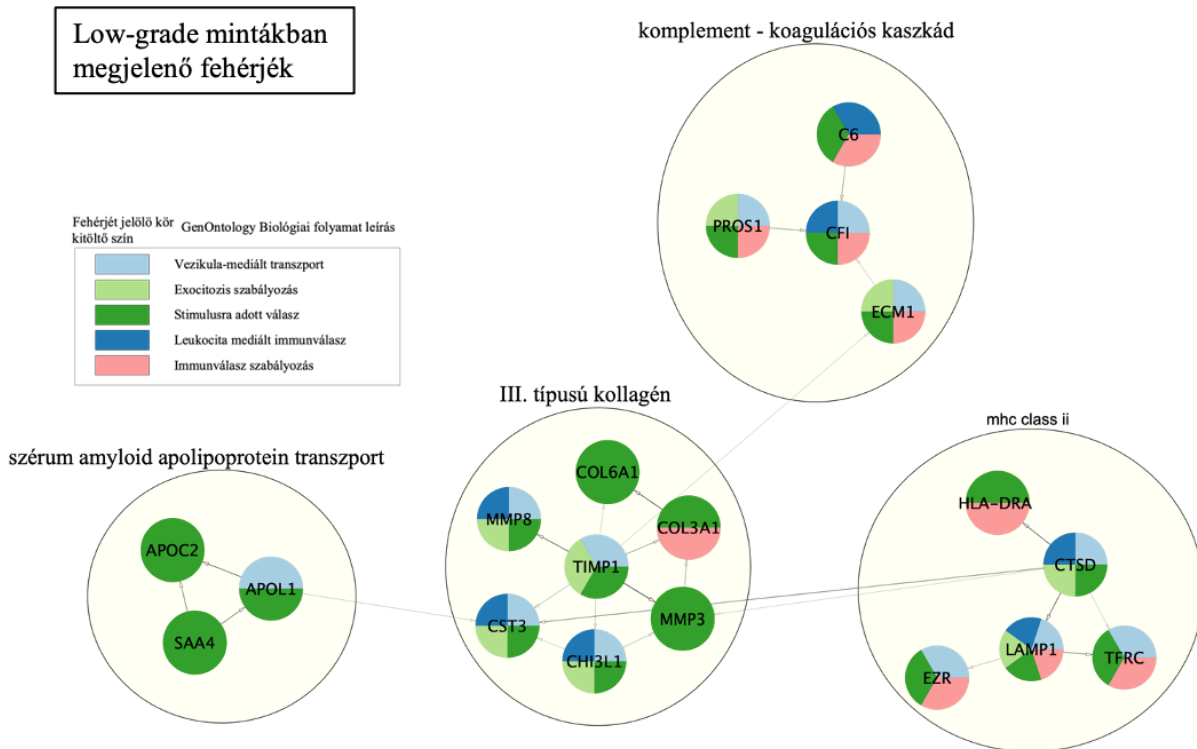
20. ábra; A tömegspektrometriai mérés során azonosított fehérjék klaszter szerinti ábrázolása. Az ábrázolás során a „minden mintában”, megjelenő fehérjék kerültek feltüntetésre. Az azonosított fehérjéket különböző színű és méretű körökkel jelölt klaszterekbe csoportosítottuk, valamint az abban ábrázolt fehérjéket különböző színekkel jelöltük, az alapján, hogy a GeneOntology leírása alapján melyik biológiai folyamatban vesz részt.

[Ide írhat]

4.2.2. *Az akut és a krónikus szeptikus mintákból izolált extracelluláris vezikulák fehérjéi közti különbségek.*

Nem minden fehérje volt azonosítható minden mintában, ezért az elemzés következő lépéseként megnéztük, hogy melyek azok a fehérjék, amik vagy csak a krónikus, vagy csak az akut mintáknak legalább a felében azonosíthatók voltak. Azokat a fehérjéket vizsgáltuk itt, amik az egyik csoportban legalább a minták felében vagy annál több mintában detektálható mennyiségben megjelentek, és a másik csoportban kevesebb, mint a minták felében voltak azonosíthatók. Ez alapján 50 olyan fehérjét azonosítottunk, amik jellemzően inkább az akut mintákból izolált EV-k feltárása után került azonosításra. A krónikus csoportban pedig 33 ilyen fehérjét találtunk. Összesen a két csoportban 83 ilyen fehérjéről beszélhetünk.

A krónikus fertőzött (low-grade) mintákban előforduló fehérjék négy klaszterre oszthatók (21. ábra). A fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex - *MHC class II*) klaszter fehérjéi az adaptív immunválaszban vesznek részt a krónikus bakteriális fertőzésekben. Ide tartozó fehérjék: HLA-DRA, cathepsin D, lizozim-asszociált membrán glikoprotein 1, transferrin receptor protein 1, ezrin. Jelen volt még továbbá a szérum amiloid apolipoprotein transzport fehérje klaszter, amiben szérum amiloid A-4, apolipoprotein C-II és apolipoprotein L1 volt elkülöníthető, melyek a bakteriális infekció során kialakult immunválasz modulálásában játszhatnak szerepet. Továbbá megjelennek a komplement kaskád további elemei is. A negyedik nagy fehérje elemszámmal rendelkező klaszter a III. típusú kollagén fehérje klaszter volt, melyben a mátrix-metalloproteináz 8, mátrix-metalloproteináz 3, valamint metalloproteináz inhibitor, kollagén alfa lánc 1 (VI és III), illetve cisztatin C fehérjék is jelen vannak, amik az implantátum asszociált krónikus fertőzésekben kialakult biofilm képződésében játszhatnak fontos szerepet.



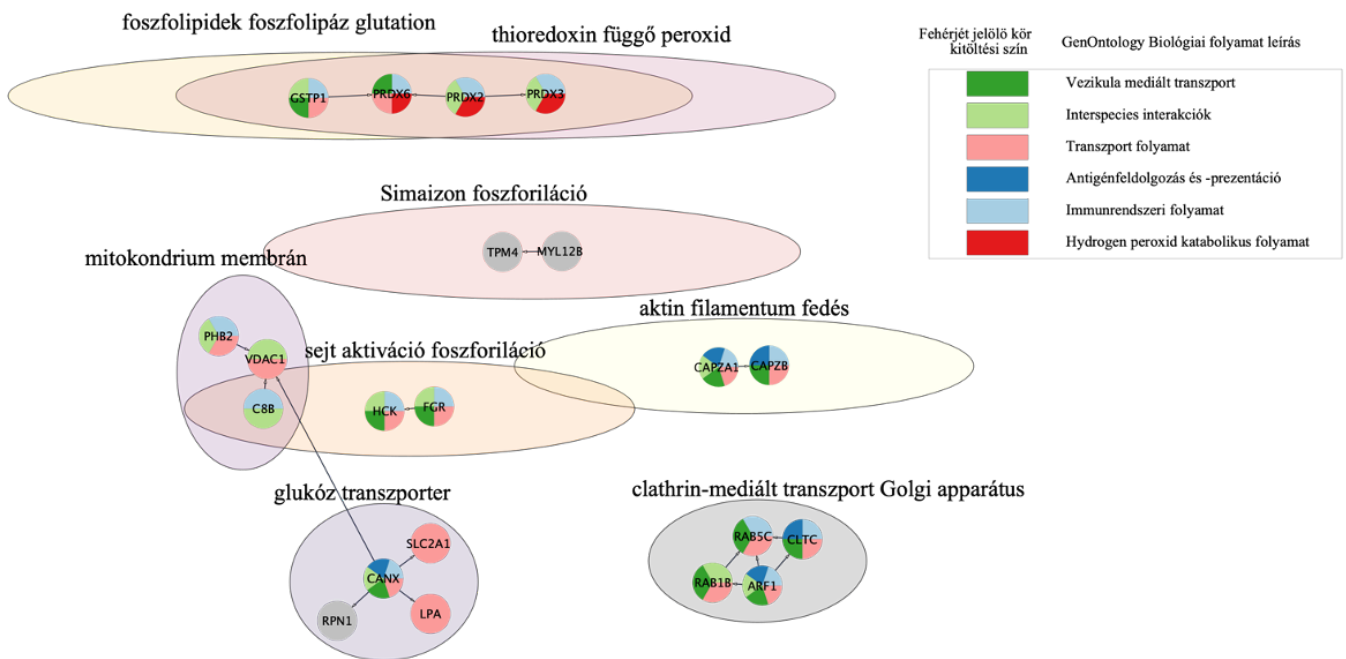
21. ábra A tömegspekrometriai mérés során azonosított fehérjék klaszter szerinti ábrázolása. Az ábrázolás során a „low-grade mintákban”, megjelenő fehérjék kerültek feltüntetésre. Az azonosított fehérjéket különböző színű és méretű körökkel jelölt klaszterekbe csoportosítottuk, valamint az abban ábrázolt fehérjéket különböző színekkel jelöltük, az alapján, hogy a GeneOntology leírása alapján melyik biológiai folyamatban vesz részt.

Az akut fertőzött mintákban kisebb elemszámú klasztereket lehet elkülöníteni (22. ábra). Kiemelendő ezek közül a thioredoxin függő peroxid fehérje klaszter, melynek elemei: peroxiredoxin-2, thioredoxin-függő peroxid reductáz, valamint peroxiredoxin-6, amik antioxidáns fehérje család részei, és az oxidative stressztől védik meg a sejteket. Jelen van még a klatrin mediált transzport fehérje klaszter és a mitokondrium membrán fehérje klaszter is. A glukóz transzport fehérje klaszter elemei: calnexin,

[Ide írhat]

apolipoprotein(a), solute carrier family 2, dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase, melyek az akut gyulladásos folyamatok során az immunsejtek fokozott cukorfelvételében játszanak szerepet.

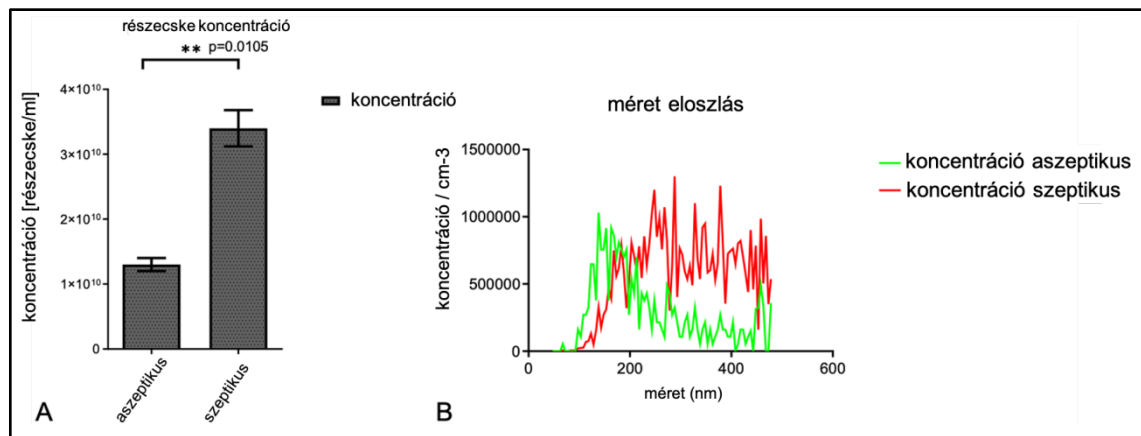
Akut mintákban megjelenő fehérjék



22. ábra A tömegspekrometriai mérés során azonosított fehérjék klaszter szerinti ábrázolása. Az ábrázolás során az „akut mintákban”, megjelenő fehérjék kerültek feltüntetésre. Az azonosított fehérjéket különböző színű és méretű körökkel jelölt klaszterekbe csoportosítottuk, valamint az abban ábrázolt fehérjéket különböző színekkel jelöltük, az alapján, hogy a GeneOntology leírása alapján melyik biológiai folyamatban vesz részt.

4.3. Nanoparticle tracking analysis eredményei

Négy (n=4) aszeptikus és három (n=3) szeptikus mintát vizsgáltunk NTA-val. Az extracelluláris vezikulák száma különböző volt a két csoportban, a szeptikus mintákban mért extracelluláris vezikula koncentráció szignifikánsan magasabb volt, mint az aszeptikus csoportban. ($p = 0,0105$, t-teszt) (23. ábra A). Nem csak a részecske koncentráció, de a méretbeli eloszlás is különböző volt. Mindkét csoportban 150-450 nm mérettartományban voltak a részecskék, de a szeptikus csoportban a nagyobb mérettartomány irányába tolódtak el a részecskék és több csúcsot mutattak a 300-400 nm tartományban. Az aszeptikus minták részecskéinek eloszlása más mintázatot követett, itt a legmagasabb koncentráció a 150-200 nm mérettartományban volt és csökkent a nagyobb mérettartományban (23. ábra B).



23. ábra; A szeptikus minták magasabb koncentrációban tartalmaznak extracelluláris vezikulákat, mint az aszeptikus minták ($p=0,0105$, t-teszt) (A). Különböző méreteloszlás a két csoportban NTA-val vizsgálva. Zöld vonal az aszeptikus, piros vonal a szeptikus mintákat jelöli (B).

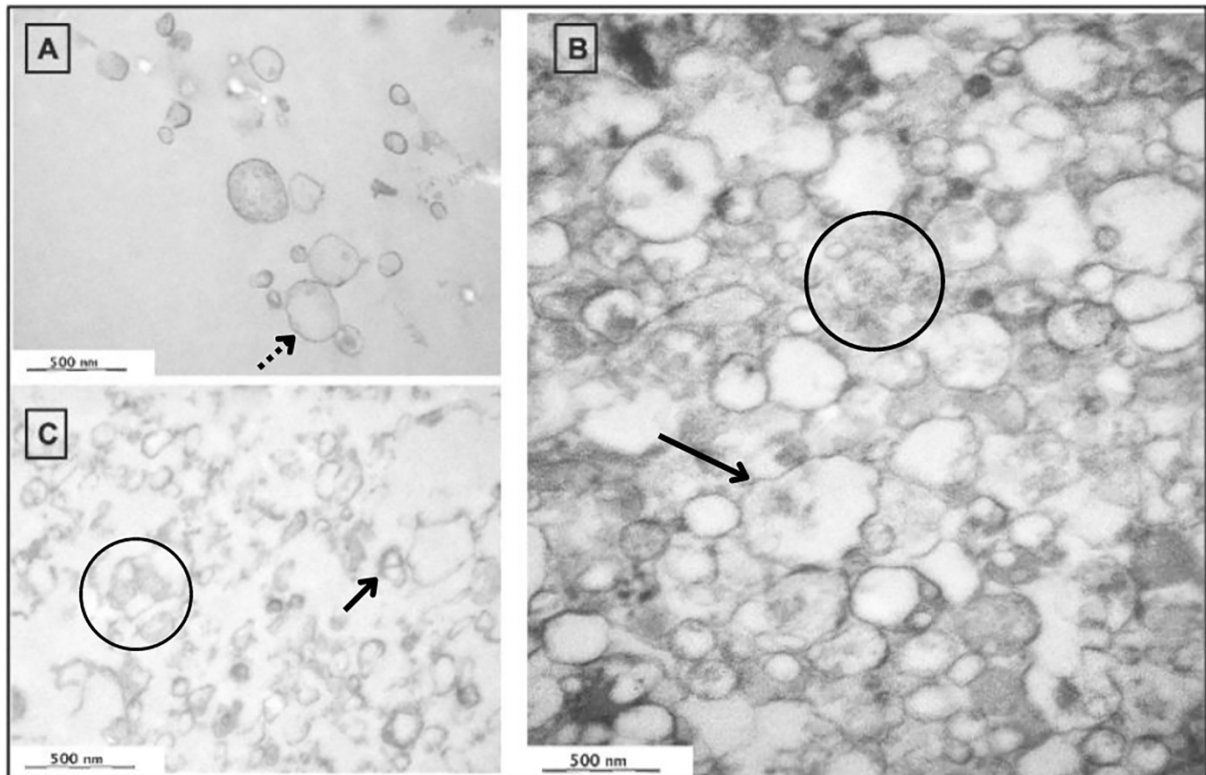
4.4. Morfológiai leírás TEM segítségével

Előkészítés és fixálás után 2 aszeptikus, 2 low-grade szeptikus és 2 akut szeptikus minta morfológiai vizsgálatát végeztük TEM segítségével. Minden mintában találtunk extracelluláris vezikulaként azonosítható struktúrákat, azonban jelentős számbeli és morfológiai különbségeket figyeltünk meg a három minta között.

Az aszeptikus mintáinkban (24. ábra A) kevesebb és kisebb méretű extracelluláris vezikulát észleltünk, a szeptikus mintákhoz hasonlítva. A mérettartomány 150-200 nm volt. Az aszeptikus mintákból izolált extracelluláris vezikulákat körülvevő membrán vékony és szabályos volt, valamint a belsejében kevés magasabb denzitású „szállítmányt” figyeltünk meg.

A legmagasabb extracelluláris vezikula koncentrációt az akut szeptikus mintáinkban (24. ábra B) találtuk. Mérettartományuk főként 350-400 nm között volt, vastagabb, kissé szabálytalanabb membránnal körülvéve és nagyobb mennyiségű magasabb denzitású „szállítmányt” tartalmaztak, valamint ugyanez a struktúra körülöttük szabadon is megfigyelhető volt.

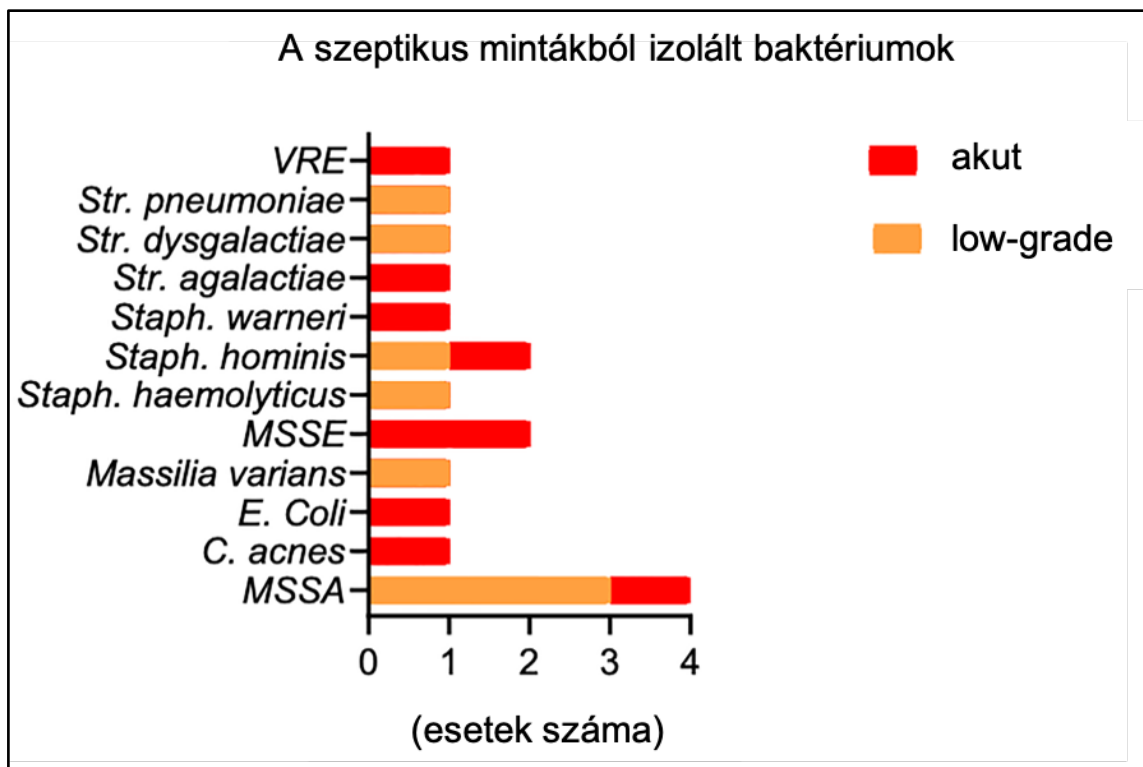
A low-grade mintákban (24. ábra C) az előbb említett két tulajdonság keverékét tapasztaltuk. Mérettartományban 150-300 nm között voltak észlelhetőek, az extracelluláris vezikulák kevésbé voltak szabályosak, mint az aszeptikus mintákban, és a fentebb említett magasabb denzitású „szállítmány” inkább a vezikulák körül volt észlelhető.



24. ábra; Aszeptikus mintáinkból izolált extracelluláris vezikulák (A), vékony membránnal rendelkeznek (szaggatott nyíl). Az akut szeptikus mintákból izolált extracelluláris vezikulák (B) vastagabb, szabálytalanabb membránnal rendelkeznek (folyamatos nyíl), bennük és körülöttük magasabb denzitású „szállítmány” látható (kör). A low-grade szeptikus mintákból izolált extracelluláris vezikulák (C) az előző két mérettartomány között, vékonyabb, de nem túl szabályos membránnal (nyíl) és főként extravezikularisan elhelyezkedő „szállítmánnyal” (kör) rendelkeznek. (Nagyítás: 30x, a képek bal alsó sarkában található jelzések 500 nm mérettartománynak felelnek meg)

4.5. Mikrobiológiai vizsgálat eredményei

Minden esetben végeztünk mikrobiológiai vizsgálatot műtét előtt, a betegek besorolása részben ez alapján történt szeptikus vagy aszeptikus csoportokba. Továbbá minden esetben történt a műtét során is mintavétel, melyet transzport táptalajon és hemokultúrás palackban mikrobiológiai vizsgálatra küldtünk. A tenyésztések eredményei: (25. ábra) négy (n=4) esetben találtunk methicillin érzékeny *Staphylococcus aureus* (MSSA), két (n=2) esetben methicillin érzékeny *Staphylococcus epidermidis* (MSSE), két (n=2) esetben *Staphylococcus hominis*, további egy-egy esetben: *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus dysgalactiae*, vankomycin rezisztens *Enterococcus faecalis* (VRE), *Cutibacterium acnes*, *Massilia variant*, *Staphylococcus warneri*, *Streptococcus agalactiae* tenyésztett a mintákból.



25. ábra; A szeptikus mintákból izolált baktériumok listája. Piros színnel az akut szeptikus esetekből izolált kórokozók, narancssárgával a low-grade szeptikus mintákból izolált kórokozók.

5. MEGBESZÉLÉS

A periprotetikus fertőzések diagnosztikája és ellátása mind a mai napig kihívás elé állítja az ortopéd sebészeket és az ellátó rendszert. Az extracelluláris vezikulák biológiai tulajdonságairól folyamatosan bővül a tudásunk és egyre több információnk van azzal kapcsolatban is, hogy bakteriális infekció alkalmával milyen szerepet töltenek be a fertőzés folyamatában ([85](#), [99](#), [107](#), [133](#), [147](#), [148](#)). Funkciójuk, illetve a bakteriális gyulladásban betöltött szerepük alaposabb megismerése és megértése új lehetőségeket nyithat a periprotetikus fertőzések diagnosztikájában.

Rendkívül kevés adat áll rendelkezésre a neutrofil granulociták által felszabadított extracelluláris vezikulák szerepéről protézis körül kialakult infekciók esetében. Mivel az irodalomban a tanulmányunk megírásáig nem volt olyan közlemény, ami az általunk vizsgált módon nézte volna a protézis mellőli ízületi folyadékából az extracelluláris vezikulákat, így csak megközelítőleg tudtuk összehasonlítani az általunk kapott eredményeket az irodalom adataival. Tímár és munkatársai extracelluláris vezikulák mennyiségének szignifikáns növekedéséről számoltak be neutrofil granulociták bakteriális opszonizációja után *in vitro* körülmények között ([107](#)) szérumból, ennek alapján feltételeztük, hogy ez a folyamat az ízületben is lejátszódhat.

A vizsgálatunk megkezdésének idején a nemzetközi irodalomban nem szerepelt olyan extracelluláris vezikula izolálási protokoll, amit standardizált módon, reprodukálhatóan, elfogadottan használni tudtunk volna. Így a kutatás első fázisában az első mintákat arra használtuk, hogy a meglévő irodalmi adatok alapján mind a szeptikus, mind az aszeptikus mintákon standard módon használható, reprodukálható izolálási protokollt dolgozzunk ki, mely során a lehető legkisebb mértékben változik a minták extracelluláris vezikula mennyisége és minősége. Így került kidolgozásra az általunk a teljes vizsgálat ideje alatt alkalmazott extracelluláris vezikula izolálási protokoll, melyet korábban szeptikus és aszeptikus periprotetikus szinoviális folyadék feldolgozására nem használtak ([80](#)). Később az első közleményünk publikálása előtt megjelent Rűwald és munkatársai közleménye, de abban a tanulmányban a munkacsoport más mérettartományú extracelluláris vezikulákat vizsgált, más izolálási protokollal. Rűwald és munkatársai kis méretű (>200nm) vezikulák számbeli növekedéséről számoltak be szinoviális folyadékot vizsgálva periprotetikus infekciók esetében ([149](#)). Hasonló

eredményt kaptunk a saját mintáink vizsgálata során. A minták NTA vizsgálata során a biztosan szeptikus mintákban magasabb koncentrációban észleltünk extracelluláris vezikulákat. Különbségként jelölhető meg, talán az eltérő vezikula izolálási protokollnak köszönhetően, hogy az általunk izolált extracelluláris vezikulák nagyobb mérettartományba estek, mint Rühwald és munkatársaié. Azonban az általunk vizsgált két csoport (szeptikus és aszeptikus) mintáiból izolált extracelluláris vezikulák mérettartományában is különbségeket tapasztaltunk. Az aszeptikus mintákból izolált extracelluláris vezikulák többsége 150-200 nm mérettartományba, míg a szeptikus mintákból izoláltak a nagyobb 300-450 nm mérettartományba estek. Rühwald és munkatársai által vizsgált vezikulák a kis mérettartományba estek, így azzal való összehasonlítás nem lehetséges.

Az általunk elvégzett elektronmikroszkópos vizsgálat által fontos morfológiai különbségeket tudunk tenni a szeptikus és aszeptikus mintákból származó extracelluláris vezikulák között. Az aszeptikus mintákból származó extracelluláris vezikulák szabályos alakú, vékonyabb membránnal rendelkező, kevés magasabb denzitású „szállítmányt” tartalmaznak. Ezzel szemben a szeptikus szinoviális folyadékból izolált extracelluláris vezikulák membránja vastagabb, szabálytalanabb és nagyobb mennyiségű, sűrűbb „szállítmányt” tartalmaznak, ami több esetben az extracelluláris vezikulák körül is észlelhető.

A periprotetikus fertőzés miatt vizsgált betegek szinoviális folyadékából izolált extracelluláris vezikulák származhatnak például baktériumoktól, granulocitáktól, makrofágoktól, őssejtektől. A sejtfelszíni markerek jelölésével és az azokhoz csatolt fluoreszcensek detektálásával vizsgálni tudjuk, hogy a mintában milyen sejtfelszíni markerekkel rendelkező extracelluláris vezikulák vannak jelen. Az Annexin V kötődés közös extracelluláris vezikula tulajdonság, ami ideálisan Ca^{2+} tartalmú puffer közegben jön létre (150). Mivel a periprotetikus infekciók bakteriális gyulladós folyamatok, ezért a vizsgálatunk során az aktivált neutrofil granulocitákból származó extracelluláris vezikulák detektálása volt a cél. A CD177 sejtfelszíni marker a neutrofil granulociták 40-60%-án expresszálódik egészséges donorokban, ennek fokozott expressziója gyulladós folyamatokban illetve bakteriális fertőzés illetve bakteriaemia során ismert, mely arra utal, hogy szerepet játszik a bakteriális infekcióra adott immunválasz folyamatában (107,

[151](#), [152](#)). Áramlási citometriai vizsgálatunk során az Annexin V és CD177 kettős pozitív extracelluláris vezikulák detektálására fókuszáltunk.

Az áramlási citometria mérési eredmények értelmezése előtt mindenképpen szót kell ejteni arról, hogy a mérések során detektált jelek nem mind származnak extracelluláris vezikulától. Sok hasonló biofizikai tulajdonsággal (méret, fényszórás, ülepedés) rendelkező eseményt detektálhat az áramlási citométer, ami nem extracelluláris vezikula eredetű. Ilyenek például a korábban György és munkatársai által leírt oldhatatlan immunkomplexek, melyek méretük alapján átfedést mutatnak az általunk is detektálni kívánt extracelluláris vezikulákkal és ezáltal felül becsülhetjük a mintából izolált események számát ([150](#)). Ezen kívül még antitestek és antitest aggregátumok tudnak fehérje komplexeket alkotni, amik szintén zavaróak az eredmények értelmezésekor ([85](#)). A két típusú esemény elkülönítését úgynevezett differenciáló detergens lízis technikával végezhetjük el, mely alkalmas a 100-1000 nm mérettartományba eső extracelluláris vezikulák által keltett jelet elkülöníteni a fehérje komplex eredetű jelektől ([85](#), [137](#)). Vizsgálatunkban Triton X-100 detergenst alkalmaztunk 0,01%-os koncentrációban. Az első mérés után minden mintát Triton X-100 detergennel kezeltünk, majd ismételt mérés következett. A két mérés eseményszámában észlelt különbség adta meg a valós extracelluláris vezikula által keltett eseményszámot.

Vizsgálatunkban tíz (n=10) szeptikus és tíz (n=10) aszeptikus revíziós műtét mintáiból izolált extracelluláris vezikulákat vizsgáltunk áramlási citométerrel. Mindkét csoport azonos fluoreszcens jelölést kapott (Annexin V és CD177) megegyező előkészítési protokollal. Mind az egyszeres (csak Annexin V) mind a dupla (Annexin V és CD177) jelölés alkalmával szignifikánsan magasabb eseményszámot mértünk detergens lízis után a szeptikus mintákban, mint az aszeptikus mintákban ($p = 0.046$, $p = 0.000809$, t-teszt). A vezikulák nagyobb számban való jelenléte a szeptikus csoportban, a vezikulák felszabadulásában vagy összetételében mutatkozó különbségekre utalhat, ami potenciálisan a szeptikus és aszeptikus állapotokat megkülönböztető jellemző tulajdonságként szolgálhat e minták kontextusában. Az aktivált neutrofil granulocita eredetű extracelluláris vezikulák nagyobb mennyisége a zajló bakteriális infekcióra utal. Alkalmazható lehet a low-grade fertőzések aszeptikus lazulástól való elkülönítésben is.

Megvizsgáltuk azt is, hogy az előzetes antibiotikus kezelés befolyásolja-e az áramlási citometria során mért eseményszámokat. Mérésünk során azt találtuk, hogy még

a magas koncentrációban alkalmazott antibiotikus kezelés sem változtatja meg szignifikánsan (t-teszt, $p=0,2469$) a mért eseményszámokat. Amennyiben a későbbiekben a módszer akár napi gyakorlatban alkalmazható tesztként funkcionál, a betegek előzetes antibiotikus kezelése nem befolyásolja az ízületi folyadékból származó extracelluláris vezikulák mennyiségét, ellentétben a mikrobiológiai vizsgálatokkal, ami jelentősen befolyásolható a minta levétele előtti antibiotikus kezeléssel. Természetesen ez jelenleg még elképzelés és a későbbiekben a meglévő teszttel validációs méréseket kell ismételt elvégezni.

Korábbi vizsgálatok is elemezték már a protézis mellőli ízületi folyadékból származó fehérjéket, keresték a különbségeket a szeptikus és aszeptikus minták között. Ezek a vizsgálatok az ízületi folyadékban szabadon lévő, centrifugálással a felülúszóból kinyerhető fehérjéket vizsgálták. Shahi és munkatársai közleményében szerepel egy lista, mely az általuk izolált potenciálisan új biomarkerek között említi a neutrophil elastase, bactericidal/permeability-increasing protein és neutrophil gelatinase-associated lipocalin fehérjéket (153). A szerzők hangsúlyozták a potenciális, de jelenleg még nem eleget vizsgált biomarkerek lehetséges szerepét a periprotetikus infekciók diagnosztikájában. Deirmengian és munkatársai közleményükben a human α -defensin 1–3, neutrophil elastase 2, bactericidal/permeability-increasing protein, neutrophil gelatinase-associated lipocalin, és lactoferrin fehérjéket jelölik meg, mint a periprotetikus fertőzések esetén alkalmazható biomarkereket, melyek magas szenzitivitással (közel 100%) és specificitással jellemezhetőek (154). Wang és munkatársai periprotetikus infekcióval diagnosztizált betegek ízületi folyadék mintáit vizsgálták tömegspektrométerrel és lactoferrin, polymorphonuclear leukocyte serine protease 3, és myeloid nuclear differentiation antigént találtak ígéretes szinoviális biomarkernek a differenciáldiagnosztikában (155).

Az általunk végzett vizsgálatban nem a szinoviális folyadékban szabadon, hanem az extracelluláris vezikulákból többszöri fagyasztás-olvasztás feltárási módszerrel kinyert intravezikuláris fehérjéket vizsgáltuk. A következő fehérjéket azonosítottuk szignifikánsan magasabb koncentrációban a szeptikus mintákban, az aszeptikus mintákhoz hasonlítva: lactotransferrin ($p = 0.00646$), myeloperoxidase ($p = 0.01061$),

lysozyme C ($p = 0.04687$) és annexin A6 ($p = 0.03921$) one way ANOVA teszttel vizsgálva.

Vizsgálatunk során azonosítottunk egy fehérjét, mely koncentrációja a szeptikus mintákban szignifikánsan csökkent. Ez az alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG), mely az aszeptikus mintákban szignifikánsan magasabb koncentrációban volt jelen, mint a szeptikus mintákban ($p = 0.03146$ one-way ANOVA teszt). Az AHSG egy ismert negatív akut fázis fehérje, mely szérum szintje fordítottan korrelál a C-reaktív protein (CRP) szintjével ([156](#), [157](#)), mely a mi eredményeinket is magyarázza.

A PPI folyamatában az EV-k szerepe eddig még kevésbé vizsgált, funkciójukról keveset tudunk. In vitro körülmények között a neutrofil granulociták bakteriális stimulációra megnövelik az általuk kibocsájtott EV-k mennyiségét ([107](#)). A szinoviális folyadékból kimutatható, a neutrofil granulocitákból felszabaduló EV-k patofiziológiai szerepéről szintén keveset tudunk. Vizsgálatunkban az EV-k által szállított fehérjék azonosításával és elemzésükkel kerültünk közelebb az általuk betöltött funkcióhoz.

A szinoviális folyadékból izolált EV-k feltárásából nyert minden mintában azonosított *vezikula mediált transzport folyamatra* és *neutrofil degranulációs folyamatra* jellemző fehérjék, melyek relevánsak lehetnek az ízületben zajló szeptikus folyamatok felismerésében: haptoglobin, lactotransferrin, lysosyme C, myeloperoxidase, alpha-1-acid glycoprotein 1, pyruvate kinase, HSP90-beta, leucine rich alpha-2-glycoprotein voltak.

A felsorolt fehérjék relatív gyakoriságában nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az akut és a krónikus szeptikus minták között. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a krónikus fertőzés felismerésében is felhasználhatók lehetnek azok a fehérjék, amik akut fertőzés alkalmával neutrofil granulocitákból felszabaduló EV-kben található.

A jelenleg ismert biomarkerek nem alkalmazhatóak egyedüli vizsgálatként a PPI diagnózisának a felállításában, de kérdéses, hogy létezik-e olyan biomarker, ami egyedüli szereplőként biztos választ adhat erre a nehezen eldönthető kérdésre. Fröschen és munkatársai közleményükben arra utalnak, hogy érdemes lehet gondolkodásmódot váltani és az „egy legjobb biomarker” kiválasztása helyett a gyulladásos folyamatban részt vevő fehérjék hálózatának megismerésére helyezni a fókuszot és abból egy jellemző

listát meghatározni (158). Ez a gondolkodás főként a krónikus, bizonytalan panaszokat okozó PPI esetében lehet fontos. Munkájukban a komplement kaskád szerepére hívják fel a figyelmet, melyet korábban krónikus protézis fertőzésekben nem vizsgáltak. A nagyízületi protézisek körül kialakuló akut és krónikus bakteriális gyulladási folyamatok komplex jelátviteli útvonalak hálózatán keresztül szabályozódnak a szervezetben, amik nyomon követése a jelátviteli utakban szerepet játszó fehérjék azonosítása alapján történhet. Vizsgálatunkban Fröschen és munkatársai gondolatmenetét is megvizsgálva az EV-kben „utazó” biomarkerek feltérképezését végeztük. Ez a szinovialis folyadékból izolálható főként aktivált neutrofil granulocitákból származó EV-k szerepének megértését segíti.

A krónikus fertőzött mintákban előforduló fehérjéket négy klaszterre tudtuk osztani. A fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex – *MHC class ii*) klaszter fehérjéi az adaptív immunválaszban vesznek részt a krónikus bakteriális fertőzések során. Ide tartozó fehérjék: HLA-DRA, cathepsin D, lizozim-asszociált membrán glikoprotein 1, transferrin receptor protein 1, ezrin.

Jelen volt még továbbá a szérumban amiloid apolipoprotein transzport fehérje klaszter, amiben szérumban amiloid A-4, apolipoprotein C-II és apolipoprotein L1 volt elkülöníthető, melyek a bakteriális fertőzés során kialakult immunválasz modulálásában játszhatnak szerepet.

A harmadik nagy fehérje elemszámmal rendelkező klaszter a III. típusú kollagén fehérje klaszter volt, melyben a mátrix-metalloproteináz 8, mátrix-metalloproteináz 3, valamint metalloproteináz inhibitor, kollagén alfa lánc 1 (VI és III), illetve cisztatin C fehérjék is jelen vannak. Az implantátum asszociált krónikus fertőzésekben kialakult biofilm képződésében, illetve ez elleni védekezésben játszhatnak fontos szerepet, de ezen folyamatban betöltött szerepük nem tisztázott még.

Az akut fertőzött mintákban azonosított thioredoxin függő peroxid fehérje klaszter (antioxidáns fehérje család részei), fontos szerepet játszik a sejtek oxidatív stressztől való védelmében (159). Mintáinkban azonosított elemei: peroxiredoxin-2, thioredoxin-függő peroxid reductáz, valamint peroxiredoxin-6. Mind az emlősök, mind pedig a baktériumok rendelkeznek thiol-függő antioxidáns rendszerrel (160, 161). A thioredoxin függő fehérjék elsődleges feladata a reaktív oxigénradikálok (ROS) és peroxidok semlegesítése, amelyek a normál sejttanyacsere során, és nagyobb oxidatív stressz, vagy környezeti

hatásoknak, toxinoknak való kitettség során keletkeznek. A peroxidok és ROS-ok eltávolításával megakadályozzák a káros molekulák felhalmozódását, amelyek oxidatív károsodást okozhatnak a sejtkomponensekben, például a fehérjékben, lipidekben és a DNS-ben. Ez a védőszerep különösen fontos olyan helyzetekben, amikor a sejtek nagyfokú oxidatív stressznek vannak kitéve, például gyulladás, öregedés vagy környezeti toxinoknak való kitettség során (159).

Jelen vannak még a klatrin mediált transzport fehérje klaszter elemei, melyek az endocitózis és a sejten belüli szállítás funkcióban játszanak szerepet mind fiziológiai, mind patológiai folyamatokban (162). Látszólag ellentmondásba ütközhetünk, hiszen vizsgálatunkban a sejten kívüli vezikulákat vizsgáltuk, az endocitózis során pedig sejten belüli vezikulák jönnek létre. Azonban az EV-k a sejt-sejt közti kommunikáció során az általuk szállított fehérjéket, miRNS, és egyéb anyagokat bejuttatják a fogadó sejtbe. Erre számos mechanizmus létezik, melyet két fő csoportra osztanak: fagocitózis és pinocitózis. A fagocitózis az endocitózis egy olyan típusa, amely során viszonylag nagy (>1 μm) részecskék felvétele történik, és jellemzően a specializálódott fagociták végzik. A pinocitózis ezzel szemben minden sejt-nél előfordul, és általában klatrinfüggő endocitózisra (CDE), klatrinfüggetlen endocitózisra (CIE) és makropinocitózisra (MP) osztják (163, 164).

A glukóz transzport fehérje klaszter elemei: calnexin, apolipoprotein(a), solute carrier family 2, dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase, melyek az akut gyulladásos folyamatok során az immunsejtek fokozott cukorfelvételében játszanak szerepet.

Vizsgálatunknak természetesen vannak korlátai, aminek ismeretében kell értékeljük az eredményeinket. Először is a vizsgálatba bevont betegek száma alacsony, mely torzíthatja és gyengítheti a statisztikai elemzések eredményeit. Továbbá az ízületekben talált különböző mennyiségű folyadék miatt nem minden mintán tudtunk minden vizsgálati modult elvégezni. Hasonló nehézségek miatt az irodalomban jelenleg közölt vizsgálatok is hasonló elemszámmal történtek (149). A vizsgálati eredmények erősítésére a már kidolgozott izolálási protokoll segítségével érdemes nagyobb elemszámú csoporton elvégezni a vizsgálatot. A minták előkészítésének automatizálása is könnyítheti és gyorsíthatja a folyamatot, ugyanis a mostani előkészítési módszer

meglehetősen sok humánerőforrást igényel. További kérdés, hogy a különböző kórokozók által létrehozott periprotetikus fertőzések esetén az eltérő baktérium törzsönként lehet-e eltérés az általunk vizsgált paraméterekben.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

A „Célkitűzések” fejezetben leírt pontok alapján az itt felsorolt következtetéseket vontuk le:

1. Munkánk során univerzális, mind szeptikus, mind aszeptikus mintával elvégezhető, standard, reprodukálható periprotetikus ízületi folyadékból származó extracelluláris vezikula izolálási protokollt dolgoztunk ki.
2. Megállapítottuk, hogy mind az egyszeres (csak Annexin V) mind a dupla (Annexin V és CD177) jelölés alkalmával szignifikánsan magasabb eseményszámot mértünk detergens lízis után a szeptikus mintákban, mint az aszeptikus mintákban. Így vizsgálatunk alapján feltételezhetjük, hogy a CD177 sejtfelszíni markerek detektálása jó kiindulási pont lehet a szeptikus és aszeptikus lazulások megkülönböztetésére. Azonban, mivel mind a szeptikus mind az aszeptikus mintákban detektálható volt a CD177, így a későbbiekben mindenképpen szükséges olyan vizsgálat, ami a pontos határértéket is meghatározza.
3. A klinikumban gyakran előfordul, hogy a mintavétel a betegekből már előzetes antibiotikus kezelés után kerül sorra. Ez a mikrobiológiai vizsgálat találati arányát jelentősen rontja és álnegatív eredményeket adhat. Megvizsgáltuk, hogy az általunk izolált EV-k antibiotikus kezelés után továbbra is detektálhatóak maradnak és mennyiségi szempontból szignifikáns módon nem változnak meg.
4. A szeptikus és aszeptikus mintákból izolált extracelluláris vezikulák között mennyiségi, méreti és denzitási különbségeket is találtunk. A mintákat NTA-val vizsgálva a szeptikus mintákban mért extracelluláris vezikula koncentráció szignifikánsan magasabb volt, mint az aszeptikus csoportban. A szeptikus mintákban nagyobb mennyiségű, valamint a nagyobb mérettartományba eső (300-400 nm) EV-eket találtuk.
5. Az izolálási protokoll végén nyert üledékben mind a szeptikus mind az aszeptikus mintákban sikerült TEM segítségével extracelluláris vezikulákat vizualizálni és a morfológiai tulajdonságaikat megismerni. A detektált extracelluláris vezikulák

[Ide írhat]

morfológiailag több eltérést is mutattak. A szeptikus mintákból nagyobb méretű extracelluláris vezikulákat izoláltunk. A másik fontos morfológiai különbség a vezikulákban észlelt „szállítmány” denzitása volt, ami a szeptikus mintákban markánsabban volt látható. Ez későbbi tömegspektrometriai vizsgálattal igazolódott, hogy mennyiségét tekintve több fehérje szállítmánya volt a szeptikus mintákból izolált extracelluláris vezikuláknak.

6. Tömegspektrometriai vizsgálat során a következő fehérjéket azonosítottuk szignifikánsan magasabb koncentrációban a szeptikus mintákban, az aszeptikus mintákhoz hasonlítva: lactotransferrin, myeloperoxidase, lysozyme C és annexin A6, valamint az alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG), mely az aszeptikus mintákban szignifikánsan magasabb koncentrációban volt jelen, mint a szeptikus mintákban.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálatunk során szignifikánsan magasabb neutrofil granulocita eredetű extracelluláris vezikulát azonosítottunk a szeptikus komplikáció miatt elvégzett műtét során vett periprotetikus ízületi folyadékból, mint az aszeptikus mintákból. A méreteloszlás szintén különbözött: a szeptikus mintákban az extracelluláris vezikulák inkább a nagyobb mérettartomány irányába tolódtak el, míg az aszeptikus mintákból kisebb méretű extracelluláris vezikulákat izoláltunk. Az előzetes antibiotikus kezelés a mérési eredményeket vizsgálatunk alapján nem befolyásolta. Transzmissziós Elektronmikroszkóp vizsgálattal morfológiai különbségeket is találtunk. A szeptikus mintákból nagyobb, kevésbé szabályos, vastagabb membránnal rendelkező, magasabb denzitású „szállítmányt” tartalmazó extracelluláris vezikulákat izoláltunk, míg az aszeptikus mintákból származók kisebbek voltak, szabályosabbak, bár ezeket a paramétereket szignifikancia szintjén nem elemeztük. A fehérjetartalmat elemezve kijelenthetjük, hogy a szeptikus minták szignifikánsan magasabb koncentrációban tartalmaztak lactotransferrin, myeloperoxidase, lysozyme C és annexin A6 fehérjéket és szignifikánsan alacsonyabb koncentrációban tartalmaztak alpha-2-HS-glycoproteint. További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy a fenti eredmények újfajta megközelítést nyújthatnak-e a periprotetikus infekciók diagnosztikájában. Kutatásunk megfelelő alapot szolgáltat arra, hogy a jövőben az izolálási protokollal részleges automatizálásával, a folyamatok megfelelő fejlesztésével a napi rutin vizsgálatok körébe is beléphessen. A neutrofil granulocitákból származó extracelluláris vezikulák detektálása alternatív megoldási lehetőség lehet a tenyésztés-negatív periprotetikus infekciók esetében. Fontos, hogy vizsgálatunk célja nem egy újabb biomarker kiválasztása volt, hanem az extracelluláris vezikulák szerepének leírása, amivel jobban betekinthetünk a periprotetikus infekció során zajló folyamatokba. Az extracelluláris vezikulák szerepe a bakteriális gyulladásos folyamatokban esszenciális lehet, megismerésükkel formálhatjuk a periprotetikus infekció diagnosztikájával kapcsolatos nézőpontunkat.

Vizsgálatunk jelenlegi állása és eredményeinkről való beszámolás után sok kérdés marad még nyitottan, azonban a későbbiekben folytatjuk kutatásunkat a válaszok megtalálására.

SUMMARY

One of the outstanding successes of musculoskeletal surgery is major joint arthroplasty. It results in significant improvement in quality of life, pain reduction, and improvement in self-sufficiency. Its most important complication is prosthetic joint infection (PJI), which poses a significant challenge to the operating physician, both diagnostically and therapeutically.

In summary, our investigation showed a significantly higher number of activated PMN-derived extracellular vesicles in the synovial fluid of patients with periprosthetic joint infection than that of patients with aseptic implant loosening. The size distribution of these extracellular vesicles differed also demonstrating a shift towards a larger size range in septic patients. Transmission electronmicroscopy analysis showed morphological variations, as septic extracellular vesicles were less regularly shaped, had a thicker membrane and contained a dense cargo. Larger particles with different morphological properties were observed in the septic group however these alterations were not statistically analysed, or proved to be significant.

When investigating the protein content of the extracellular vesicles, a significantly higher concentrations of lactotransferrin, myeloperoxidase, lysozyme C and annexin A6 were found in septic samples, while the level of alpha-2-HS-glycoprotein was significantly higher in aseptic aspirates. Further investigations are needed to clarify if these results may open a novel approach in the diagnostics of periprosthetic joint infection. Microfluidics and lab on chip techniques can be solutions to simplify and speed up our procedure and give an opportunity to create a point of care test. Detection of activated PMNs derived EVs from synovial fluid can be an alternative solution in culture negative cases.

Detection of these activated PMNs derived extracellular vesicles from blood serum could be the next generation of periprosthetic joint infection diagnostics.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Charnley J. 2 Total Hip Replacement by Low-Friction Arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (1976-2007). 1970;72:7-21.
2. Lidwell O. Sir John Charnley, Surgeon (1911–1982): the control of infection after total joint replacement. *Journal of Hospital Infection*. 1993;23(1):5-15.
3. Kurtz SM, Lau E, Watson H, Schmier JK, Parvizi J. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. *The Journal of arthroplasty*. 2012;27(8):61-5. e1.
4. Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *Jbjs*. 2007;89(4):780-5.
5. Kapadia BH, Berg RA, Daley JA, Fritz J, Bhave A, Mont MA. Periprosthetic joint infection. *Lancet*. 2016;387(10016):386-94.
6. Stanton T. PJI and cancer: more similar than different. *American Association of Orthopaedic Surgeons*. 2017.
7. Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss medical weekly*. 2005;135(17-18):243-51.
8. Zappe B, Graf S, Ochsner PE, Zimmerli W, Sendi P. Propionibacterium spp. in prosthetic joint infections: a diagnostic challenge. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2008;128(10):1039-46.
9. Zmistowski B, Karam JA, Durinka JB, Casper DS, Parvizi J. Periprosthetic joint infection increases the risk of one-year mortality. *JBJS*. 2013;95(24):2177-84.
10. Cancienne JM, Werner BC, Bolarinwa SA, Browne JA. Removal of an infected total hip arthroplasty: risk factors for repeat debridement, long-term spacer retention, and mortality. *The Journal of Arthroplasty*. 2017;32(8):2519-22.

11. Li C, Renz N, Trampuz A. Management of periprosthetic joint infection. *Hip & pelvis*. 2018;30(3):138-46.
12. Gehrke T, Zahar A, Kendoff D. One-stage exchange: it all began here. *The bone & joint journal*. 2013;95(11_Supple_A):77-83.
13. Schinsky MF, Della Valle CJ, Sporer SM, Paprosky WG. Perioperative testing for joint infection in patients undergoing revision total hip arthroplasty. *JBJS*. 2008;90(9):1869-75.
14. Trampuz A, Hanssen AD, Osmon DR, Mandrekar J, Steckelberg JM, Patel R. Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthetic knee infection. *The American journal of medicine*. 2004;117(8):556-62.
15. Fink B, Makowiak C, Fuerst M, Berger I, Schäfer P, Frommelt L. The value of synovial biopsy, joint aspiration and C-reactive protein in the diagnosis of late peri-prosthetic infection of total knee replacements. *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume*. 2008;90(7):874-8.
16. Frommelt L. Principles of systemic antimicrobial therapy in foreign material associated infection in bone tissue, with special focus on periprosthetic infection. *Injury*. 2006;37(2):S87-S94.
17. Sugiuchi H, Ando Y, Manabe M, Nakamura E, Mizuta H, Nagata S, et al. Measurement of total and differential white blood cell counts in synovial fluid by means of an automated hematology analyzer. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2005;146(1):36-42.
18. Font-Vizcarra L, García S, Martínez-Pastor JC, Sierra JM, Soriano A. Blood culture flasks for culturing synovial fluid in prosthetic joint infections. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 2010;468(8):2238-43.
19. St John A, Boyd JC, Lowes AJ, Price CP. The use of urinary dipstick tests to exclude urinary tract infection: a systematic review of the literature. *American journal of clinical pathology*. 2006;126(3):428-36.

20. Tischler EH, Cavanaugh PK, Parvizi J. Leukocyte esterase strip test: matched for musculoskeletal infection society criteria. *JBJS*. 2014;96(22):1917-20.
21. Parvizi J, Jacovides C, Antoci V, Ghanem E. Diagnosis of periprosthetic joint infection: the utility of a simple yet unappreciated enzyme. *JBJS*. 2011;93(24):2242-8.
22. Bingham J, Clarke H, Spangehl M, Schwartz A, Beauchamp C, Goldberg B. The alpha defensin-1 biomarker assay can be used to evaluate the potentially infected total joint arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 2014;472(12):4006-9.
23. Parvizi J, Zmistowski B, Berbari EF, Bauer TW, Springer BD, Della Valle CJ, et al. New definition for periprosthetic joint infection: from the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 2011;469:2992-4.
24. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Executive summary: diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*. 2013;56(1):1-10.
25. Schindler M, Walter N, Maderbacher G, Sigmund IK, Alt V, Rupp M. Novel diagnostic markers for periprosthetic joint infection: a systematic review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2023;13:1210345.
26. Parvizi J, Gehrke T. Definition of periprosthetic joint infection. *The Journal of arthroplasty*. 2014;29(7):1331.
27. Parvizi J, Tan TL, Goswami K, Higuera C, Della Valle C, Chen AF, et al. The 2018 definition of periprosthetic hip and knee infection: an evidence-based and validated criteria. *The Journal of arthroplasty*. 2018;33(5):1309-14. e2.
28. McNally M, Sousa R, Wouthuyzen-Bakker M, Chen AF, Soriano A, Vogely HC, et al. The EBJIS definition of periprosthetic joint infection: a practical guide for clinicians. *The bone & joint journal*. 2021;103(1):18-25.

29. Sigmund IK, Luger M, Windhager R, McNally MA. Diagnosing periprosthetic joint infections: a comparison of infection definitions: EBJIS 2021, ICM 2018, and IDSA 2013. *Bone & Joint Research*. 2022;11(9):608-18.
30. Preobrazhensky PM, Bozhkova SA, Panteleev AN, Tikhilov RM, Kazemirsky AV. Periprosthetic Joint Infection after Primary Total Knee Arthroplasty With and Without Sinus Tract: Treatment Outcomes. *Traumatology and Orthopedics of Russia*. 2020;26(4):21-31.
31. Gbejuade HO, Lovering AM, Webb JC. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections: a review. *Acta orthopaedica*. 2015;86(2):147-58.
32. Jacqueline C, Caillon J. Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(suppl_1):i37-i40.
33. Davidson DJ, Spratt D, Liddle AD. Implant materials and prosthetic joint infection: the battle with the biofilm. *EFORT open reviews*. 2019;4(11):633-9.
34. Aggarwal VK, Bakhshi H, Ecker NU, Parvizi J, Gehrke T, Kendoff D. Organism profile in periprosthetic joint infection: pathogens differ at two arthroplasty infection referral centers in Europe and in the United States. *The journal of knee surgery*. 2014;27(05):399-406.
35. Parvizi J, Erkocak OF, Della Valle CJ. Culture-negative periprosthetic joint infection. *JBJS*. 2014;96(5):430-6.
36. Yoon H-K, Cho S-H, Lee D-Y, Kang B-H, Lee S-H, Moon D-G, et al. A review of the literature on culture-negative periprosthetic joint infection: epidemiology, diagnosis and treatment. *Knee surgery & related research*. 2017;29(3):155.
37. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *Journal of bacteriology*. 2000;182(10):2675-9.
38. Rumbaugh KP. Biofilms in the ICU. *The Southwest Respiratory and Critical Care Chronicles*. 2014;2(6):15-8.

39. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(2):167-93.
40. Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. 2016;14(9):563-75.
41. Monroe D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS biology*. 2007;5(11):e307.
42. Reffuveille F, Josse J, Vallé Q, Gangloff C, Gangloff SC. Staphylococcus aureus Biofilms and their Impact on the Medical Field. The rise of virulence and antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. 2017;11:187.
43. Lamret F, Colin M, Mongaret C, Gangloff SC, Reffuveille F. Antibiotic tolerance of Staphylococcus aureus biofilm in periprosthetic joint infections and antibiofilm strategies. *Antibiotics*. 2020;9(9):547.
44. Saeed K, McLaren AC, Schwarz EM, Antoci V, Arnold WV, Chen AF, et al. 2018 international consensus meeting on musculoskeletal infection: Summary from the biofilm workgroup and consensus on biofilm related musculoskeletal infections. *Journal of Orthopaedic Research®*. 2019;37(5):1007-17.
45. Berbari EF, Marculescu C, Sia I, Lahr BD, Hanssen AD, Steckelberg JM, et al. Culture-negative prosthetic joint infection. *Clinical infectious diseases*. 2007;45(9):1113-9.
46. Parvizi J, Ghanem E, Menashe S, Barrack RL, Bauer TW. Periprosthetic infection: what are the diagnostic challenges? *JBJS*. 2006;88(suppl_4):138-47.
47. Ghanem E, Parvizi J, Clohisy J, Burnett S, Sharkey PF, Barrack R. Perioperative antibiotics should not be withheld in proven cases of periprosthetic infection. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*. 2007;461:44-7.

48. Bejon P, Berendt A, Atkins B, Green N, Parry H, Masters S, et al. Two-stage revision for prosthetic joint infection: predictors of outcome and the role of reimplantation microbiology. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(3):569-75.
49. Kalbian I, Park JW, Goswami K, Lee Y-K, Parvizi J, Koo K-H. Culture-negative periprosthetic joint infection: prevalence, aetiology, evaluation, recommendations, and treatment. *International Orthopaedics*. 2020;44:1255-61.
50. Trampuz A, Osmon DR, Hanssen AD, Steckelberg JM, Patel R. Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®. 2003;414:69-88.
51. Scorzoloni L, Lichtner M, Iannetta M, Mengoni F, Russo G, Panni AS, et al. Sonication technique improves microbiological diagnosis in patients treated with antibiotics before surgery for prosthetic joint infections. *New Microbiol*. 2014;37(3):321-8.
52. Feihl S, Trampuz A, Renz N. Diagnostik implantatassoziiertes Infektionen und Stellenwert der Sonikation. *OP-JOURNAL*. 2017;33(02):102-6.
53. Saleh A, George J, Faour M, Klika A, Higuera C. Serum biomarkers in periprosthetic joint infections. *Bone & joint research*. 2018;7(1):85-93.
54. Tillet W, Francis Jr T. Serological reactions in pneumonia with a nonprotein somatic fraction of pneumococcus. 1930. *J Exp Med*.52:561.
55. Prucha M, Bellingan G, Zazula R. Sepsis biomarkers. *Clinica chimica acta*. 2015;440:97-103.
56. Ansar W, Ghosh S. C-reactive protein and the biology of disease. *Immunologic research*. 2013;56(1):131-42.
57. Greenberg SB. Infections in the immunocompromised rheumatologic patient. *Critical care clinics*. 2002;18(4):931-56.

58. Berbari E, Mabry T, Tsaras G, Spangehl M, Erwin PJ, Murad MH, et al. Inflammatory blood laboratory levels as markers of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *JBJS*. 2010;92(11):2102-9.
59. Becker KL, Snider R, Nysten ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations. *Critical care medicine*. 2008;36(3):941-52.
60. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clinical infectious diseases*. 2004;39(2):206-17.
61. Xie K, Qu X, Yan M. Procalcitonin and α -defensin for diagnosis of periprosthetic joint infections. *The Journal of Arthroplasty*. 2017;32(4):1387-94.
62. Shahi A, Kheir MM, Tarabichi M, Hosseinzadeh HR, Tan TL, Parvizi J. Serum D-dimer test is promising for the diagnosis of periprosthetic joint infection and timing of reimplantation. *JBJS*. 2017;99(17):1419-27.
63. Bottner F, Wegner A, Winkelmann W, Becker K, Erren M, Götze C. Interleukin-6, procalcitonin and TNF- α : markers of peri-prosthetic infection following total joint replacement. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2007;89(1):94-9.
64. Ettinger M, Calliess T, Kielstein JT, Sibai J, Brückner T, Lichtinghagen R, et al. Circulating biomarkers for discrimination between aseptic joint failure, low-grade infection, and high-grade septic failure. *Clinical Infectious Diseases*. 2015;61(3):332-41.
65. Drago L, Vassena C, Dozio E, Corsi M, De Vecchi E, Mattina R, et al. Procalcitonin, C-reactive protein, interleukin-6, and soluble intercellular adhesion molecule-1 as markers of postoperative orthopaedic joint prosthesis infections. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2011;24(2):433-40.
66. Worthington T, Dunlop D, Casey A, Lambert P, Luscombe J, Elliott T. Serum procalcitonin, interleukin-6, soluble intercellular adhesion molecule-1 and IgG to shortchain exocellular lipoteichoic acid as predictors of infection in total joint prosthesis revision. *British journal of biomedical science*. 2010;67(2):71-6.

67. Friedrich MJ, Randau TM, Wimmer MD, Reichert B, Kuberra D, Stoffel-Wagner B, et al. Lipopolysaccharide-binding protein: a valuable biomarker in the differentiation between periprosthetic joint infection and aseptic loosening? *International orthopaedics*. 2014;38(10):2201-7.
68. Zamani B, Jamali R, Ehteram H. Synovial fluid adenosine deaminase and high-sensitivity C-reactive protein activity in differentiating monoarthritis. *Rheumatology international*. 2012;32(1):183-8.
69. Parvizi J, Jacovides C, Adeli B, Jung KA, Hozack WJ, Mark B. Coventry Award: synovial C-reactive protein: a prospective evaluation of a molecular marker for periprosthetic knee joint infection. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 2012;470(1):54-60.
70. Kumar V, Sharma A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *European journal of pharmacology*. 2009;616(1-3):7-15.
71. Yuksel H, Akoğlu T. Serum and synovial fluid adenosine deaminase activity in patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and reactive arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1988;47(6):492-5.
72. Pettersson T, Klockars M, Weber T, Von Essen R. Adenosine deaminase activity in joint effusions. *Scandinavian journal of rheumatology*. 1988;17(5):365-9.
73. Sousa R, Serrano P, Gomes Dias J, Oliveira J, Oliveira A. Improving the accuracy of synovial fluid analysis in the diagnosis of prosthetic joint infection with simple and inexpensive biomarkers: C-reactive protein and adenosine deaminase. *The bone & joint journal*. 2017;99(3):351-7.
74. Rehman AA, Ahsan H, Khan FH. alpha-2-Macroglobulin: a physiological guardian. *Journal of cellular physiology*. 2013;228(8):1665-75.
75. Jacovides CL, Parvizi J, Adeli B, Am Jung K. Molecular markers for diagnosis of periprosthetic joint infection. *The Journal of arthroplasty*. 2011;26(6):99-103. e1.

76. Brophy MB, Hayden JA, Nolan EM. Calcium ion gradients modulate the zinc affinity and antibacterial activity of human calprotectin. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(43):18089-100.
77. Nakashige TG, Zhang B, Krebs C, Nolan EM. Human calprotectin is an iron-sequestering host-defense protein. *Nature chemical biology*. 2015;11(10):765-71.
78. Hood MI, Skaar EP. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(8):525-37.
79. Wouthuyzen-Bakker M, Ploegmakers J, Kampinga G, Wagenmakers-Huizenga L, Jutte P, Muller Kobold A. Synovial calprotectin: a potential biomarker to exclude a prosthetic joint infection. *The bone & joint journal*. 2017;99(5):660-5.
80. Sallai I, Marton N, Szatmári A, Kittel Á, Nagy G, Buzás EI, et al. Activated polymorphonuclear derived extracellular vesicles are potential biomarkers of periprosthetic joint infection. *Plos one*. 2022;17(5):e0268076.
81. Tkach M, Théry C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell*. 2016;164(6):1226-32.
82. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles*. 2018;7(1):1535750.
83. Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255-89.
84. Lässer C, Théry C, Buzás EI, Mathivanan S, Zhao W, Gho YS, et al. The International Society for Extracellular Vesicles launches the first massive open online course on extracellular vesicles. *Wiley Online Library*; 2016. p. 34299.
85. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and molecular life sciences*. 2011;68(16):2667-88.

86. Stein JM, Luzio JP. Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles. *Biochemical Journal*. 1991;274(2):381-6.
87. Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in cell biology*. 2015;25(6):364-72.
88. Console L, Scalise M. Extracellular vesicles and cell pathways involved in cancer chemoresistance. *Life*. 2022;12(5):618.
89. Di Bella MA. Overview and Update on Extracellular Vesicles: Considerations on Exosomes and Their Application in Modern Medicine. *Biology*. 2022;11(6):804.
90. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1 β by microvesicle shedding. *Immunity*. 2001;15(5):825-35.
91. 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 α -Granules. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1999;94(11):3791-9.
92. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews immunology*. 2002;2(8):569-79.
93. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Bedina Zavec A, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*. 2015;4(1):27066.
94. Genschmer KR, Russell DW, Lal C, Szul T, Bratcher PE, Noerager BD, et al. Activated PMN exosomes: pathogenic entities causing matrix destruction and disease in the lung. *Cell*. 2019;176(1-2):113-26. e15.
95. Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, van de Laar MA. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002;46(6):1498-503.

96. Osti D, Del Bene M, Rappa G, Santos M, Matafora V, Richichi C, et al. Clinical significance of extracellular vesicles in plasma from glioblastoma patients. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(1):266-76.
97. Wang J, Wang Y, Tang L, Garcia RC. Extracellular Vesicles in Mycobacterial Infections: Their Potential as Molecule Transfer Vectors. *Front Immunol*. 2019;10:1929.
98. White JR, Dauros-Singorenko P, Hong J, Vanholsbeeck F, Phillips A, Swift S. The complex, bidirectional role of extracellular vesicles in infection. *Biochemical Society Transactions*. 2021;49(2):881-91.
99. Inal JM, Ansa-Addo EA, Lange S. Interplay of host-pathogen microvesicles and their role in infectious disease. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(1):258-62.
100. Kumar V, A.K. Abbas, and J. Aster, Robbins: A patológia alapjai. 2013, Budapest: Medicina Kiadó. 47.
101. Falus A, et al., Az immunológia alapjai. 2014, Budapest: Semmelweis Kiadó. 15, 198.
102. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory investigation*. 2000;80(5):617-53.
103. Berckmans RJ, Nieuwland R, Kraan MC, Schaap MC, Pots D, Smeets TJ, et al. Synovial microparticles from arthritic patients modulate chemokine and cytokine release by synoviocytes. *Arthritis research & therapy*. 2005;7(3):1-9.
104. Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu Rev Biochem*. 2016;85:765-92.
105. Oehmcke S, Westman J, Malmström J, Mörgelin M, Olin AI, Kreikemeyer B, et al. A novel role for pro-coagulant microvesicles in the early host defense against streptococcus pyogenes. *PLoS pathogens*. 2013;9(8):e1003529.

106. L Johnson B, W Kuethe J, C Caldwell C. Neutrophil derived microvesicles: emerging role of a key mediator to the immune response. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*. 2014;14(3):210-7.
107. Timár CI, Lorincz AM, Csépanyi-Kömi R, Vályi-Nagy A, Nagy G, Buzás EI, et al. Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood*. 2013;121(3):510-8.
108. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *science*. 2004;303(5663):1532-5.
109. Timár CI, Lőrincz ÁM, Ligeti E. Changing world of neutrophils. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2013;465(11):1521-33.
110. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of cell biology*. 2010;191(3):677-91.
111. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Böing AN, Th. M. Romijn FP, Westendorp RG, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2000;95(3):930-5.
112. Koopman G, Reutelingsperger C, Kuijten G, Keehnen R, Pals S, Van Oers M. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. 1994.
113. Arraud N, Gounou C, Linares R, Brisson AR. A simple flow cytometry method improves the detection of phosphatidylserine-exposing extracellular vesicles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2015;13(2):237-47.
114. Connor DE, Exner T, Ma DDF, Joseph JE. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thrombosis and haemostasis*. 2010;103(05):1044-52.

115. Demaret J, Venet F, Plassais J, Cazalis M-A, Vallin H, Friggeri A, et al. Identification of CD177 as the most dysregulated parameter in a microarray study of purified neutrophils from septic shock patients. *Immunology letters*. 2016;178:122-30.
116. Stroncek DF, Skubitz KM, McCullough JJ. Biochemical characterization of the neutrophil-specific antigen NB1. 1990.
117. Stroncek D, Shankar R, Noren P, Herr G, Clement L. Analysis of the expression of NB1 antigen using two monoclonal antibodies. *Transfusion*. 1996;36(2):168-74.
118. Göhring K, Wolff J, Doppl W, Schmidt KL, Fenchel K, Pralle H, et al. Neutrophil CD177 (NB1 gp, HNA-2a) expression is increased in severe bacterial infections and polycythaemia vera. *Br J Haematol*. 2004;126(2):252-4.
119. Sachs UJ, Hattar K, Weissmann N, Bohle RM, Weiss T, Sibelius U, et al. Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood*. 2006;107(3):1217-9.
120. Stroncek DF, Herr GP, Plachta LB. Neutrophil-specific antigen NB1 inhibits neutrophil-endothelial cell interactions. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1994;123(2):247-55.
121. Plesner T, Behrendt N, Ploug M. Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR. *Stem cells*. 1997;15(6):398-408.
122. Chavakis T, Kanse S, May A, Preissner K. Haemostatic factors occupy new territory: the role of the urokinase receptor system and kininogen in inflammation. *Biochemical Society Transactions*. 2002;30(2):168-73.
123. Sachs UJ, Andrei-Selmer CL, Maniar A, Weiss T, Paddock C, Orlova VV, et al. The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(32):23603-12.
124. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a

position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1535750.

125. Fillingham YA, Della Valle CJ, Suleiman LI, Springer BD, Gehrke T, Bini SA, et al. Definition of successful infection management and guidelines for reporting of outcomes after surgical treatment of periprosthetic joint infection: from the workgroup of the Musculoskeletal Infection Society (MSIS). *JBJS*. 2019;101(14):e69.

126. György B, Pálóczi K, Kovács A, Barabás E, Bekó G, Várnai K, et al. Improved circulating microparticle analysis in acid-citrate dextrose (ACD) anticoagulant tube. *Thromb Res*. 2014;133(2):285-92.

127. Boere J, van de Lest CH, Libregts SF, Arkesteijn GJ, Geerts WJ, Nolte-'t Hoen EN, et al. Synovial fluid pretreatment with hyaluronidase facilitates isolation of CD44+ extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2016;5:31751.

128. Linares R, Tan S, Gounou C, Arraud N, Brisson AR. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:29509.

129. Kotmakçı M, Akbaba GE. Exosome Isolation: Is There an Optimal Method with Regard to Diagnosis or Treatment? Novel Implications of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Infectious Diseases. 2017:163-81.

130. Németh A, Orgovan N, Sódar BW, Osteikoetxea X, Pálóczi K, Szabó-Taylor KÉ, et al. Antibiotic-induced release of small extracellular vesicles (exosomes) with surface-associated DNA. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-16.

131. Turpin D, Truchetet M-E, Faustin B, Augusto J-F, Contin-Bordes C, Brisson A, et al. Role of extracellular vesicles in autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews*. 2016;15(2):174-83.

132. Araldi E, Krämer-Albers E-M, Hoen EN-t, Peinado H, Psonka-Antonczyk KM, Rao P, et al. International society for extracellular vesicles: first annual meeting, April 17–21, 2012: ISEV-2012. *Journal of extracellular vesicles*. 2012;1(1):19995.

133. Silverman JM, Reiner NE. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cell Microbiol.* 2011;13(1):1-9.
134. Greening DW, Xu R, Ji H, Tauro BJ, Simpson RJ. A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. *Proteomic Profiling: Springer;* 2015. p. 179-209.
135. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology.* 2017;37(2):163-76.
136. Radcliff G, Jaroszeski MJ. Basics of flow cytometry. *Flow Cytometry Protocols.* 1998:1-24.
137. Osteikoetxea X, Sódar B, Németh A, Szabó-Taylor K, Pálóczi K, Vukman KV, et al. Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Org Biomol Chem.* 2015;13(38):9775-82.
138. Schultz G, Henion J. Fundamentals of LC-MS/MS for regulated bioanalysis. *Regulated Bioanalysis: Fundamentals and Practice.* 2017:103-20.
139. Zimmer D. Introduction to quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Chromatographia.* 2003;57:S325-S32.
140. Turiák L, Misják P, Szabó TG, Aradi B, Pálóczi K, Ozohanics O, et al. Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *J Proteomics.* 2011;74(10):2025-33.
141. Turiák L, Ozohanics O, Marino F, Drahos L, Vékey K. Digestion protocol for small protein amounts for nano-HPLC-MS(MS) analysis. *J Proteomics.* 2011;74(7):942-7.
142. Lőrincz Á M, Bartos B, Szombath D, Szeifert V, Timár CI, Turiák L, et al. Role of Mac-1 integrin in generation of extracellular vesicles with antibacterial capacity from neutrophilic granulocytes. *J Extracell Vesicles.* 2020;9(1):1698889.

143. Zagato E, Forier K, Martens T, Neyts K, Demeester J, Smedt SD, et al. Single-particle tracking for studying nanomaterial dynamics: applications and fundamentals in drug delivery. *Nanomedicine*. 2014;9(6):913-27.
144. Van der Pol E, Coumans F, Grootemaat A, Gardiner C, Sargent IL, Harrison P, et al. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014;12(7):1182-92.
145. Zhou W, Apkarian R, Wang ZL, Joy D. Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). *Scanning microscopy for nanotechnology: techniques and applications*. 2007:1-40.
146. Williams DB, Carter CB, Williams DB, Carter CB. *The transmission electron microscope*: Springer; 1996.
147. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066.
148. Johnson BL, III, Kuethe JW, Caldwell CC. Neutrophil derived microvesicles: emerging role of a key mediator to the immune response. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2014;14(3):210-7.
149. Rüdwald JM, Randau TM, Hilgers C, Masson W, Irsen S, Eymael RL, et al. Extracellular Vesicle Isolation and Characterization from Periprosthetic Joint Synovial Fluid in Revision Total Joint Arthroplasty. *J Clin Med*. 2020;9(2).
150. György B, Módos K, Pállinger E, Pálóczi K, Pásztói M, Misják P, et al. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood*. 2011;117(4):e39-48.
151. Yang XT, Wang ZJ. CD177 Expression and Inflammation Grade in *Helicobacter pylori*-Infected Wild-Type and CD177(-/-) C57BL/6 Mice. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2019;2019:9506863.

152. Kolonics F, Kajdácsi E, Farkas VJ, Veres DS, Khamari D, Kittel Á, et al. Neutrophils produce proinflammatory or anti-inflammatory extracellular vesicles depending on the environmental conditions. *Journal of leukocyte biology*. 2021;109(4):793-806.
153. Shahi A, Parvizi J. The role of biomarkers in the diagnosis of periprosthetic joint infection. *EFORT open reviews*. 2016;1(7):275-8.
154. Deirmengian C, Kardos K, Kilmartin P, Cameron A, Schiller K, Parvizi J. Diagnosing periprosthetic joint infection: has the era of the biomarker arrived? *Clin Orthop Relat Res*. 2014;472(11):3254-62.
155. Wang C, Wang Q, Li R, Qin J, Song L, Zhang Q, et al. LTF, PRTN3, and MNDA in Synovial Fluid as Promising Biomarkers for Periprosthetic Joint Infection: Identification by Quadrupole Orbital-Trap Mass Spectrometry. *J Bone Joint Surg Am*. 2019;101(24):2226-34.
156. Pappa E, Perrea DS, Pneumaticos S, Nikolaou VS. Role of fetuin A in the diagnosis and treatment of joint arthritis. *World journal of orthopedics*. 2017;8(6):461.
157. Vörös K, Gráf Jr L, Prohászka Z, Gráf L, Szenthe P, Kaszás E, et al. Serum fetuin-A in metabolic and inflammatory pathways in patients with myocardial infarction. *European journal of clinical investigation*. 2011;41(7):703-9.
158. Fröschen FS, Schell S, Wimmer MD, Hischebeth GTR, Kohlhof H, Gravius S, et al. Synovial complement factors in patients with periprosthetic joint infection after undergoing revision arthroplasty of the hip or knee joint. *Diagnostics*. 2021;11(3):434.
159. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;66:75-87.
160. Mishra S, Imlay J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Archives of biochemistry and biophysics*. 2012;525(2):145-60.
161. Holmgren A. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxidants & redox signaling*. 2000;2(4):811-20.

162. Qin H, Diaz A, Blouin L, Lebbink RJ, Patena W, Tanbun P, et al. Systematic identification of barriers to human iPSC generation. *Cell*. 2014;158(2):449-61.
163. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(8):603-12.
164. Verdera HC, Gitz-Francois JJ, Schiffelers RM, Vader P. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *Journal of Controlled Release*. 2017;266:100-8.

9. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

9.1. A tézis témájához kapcsolódó publikációk

Sallai, I., Marton, N., Szatmári, A., Kittel, Á., Nagy, G., Buzás, E. I., Skaliczki, G. (2022). Activated polymorphonuclear derived extracellular vesicles are potential biomarkers of periprosthetic joint infection. Plos one, 17(5), e0268076.

Sallai, I., Turiák, L., Sugár, S., Drahos, L., Skaliczki, G. (2024). Synovialis folyadékból nyert extracellularis vesiculák proteomja és azok lehetséges funkciója befertőződött ízületi protézisekben. Orvosi Hetilap, 165(3), 98-109.

9.2. A tézis témájához közvetlenül nem kapcsolódó publikációk

Skaliczki, G., Kovács, K., Antal, I., Sallai, I., Kovács, B., Nyógér, Z., Várnagy, A. (2024). Arthroscopic capsular release is more effective in pain relief than conservative treatment in patients with frozen shoulder. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 25(1), 145.

Krizsán, G., Sallai, I., Veres, D. S., Prinz, G., Kovács, M., Skaliczki, G. (2023). Investigation of the effect of rifampicin resistance and risk factors on recovery rates after DAIR procedure in patients with prosthetic joint infection. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 18(1), 611.

Krizsan, G., Sallai, I., Veres, D. S., Prinz, G., Szeker, D., Skaliczki, G. (2022). Rifampicin resistance and risk factors associated with significantly lower recovery rates after two-stage revision in patients with prosthetic joint infection. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 30, 231-236.

Sallai, Imre; A SARS-CoV-2 vírussal fertőzött betegek nem halasztható ortopédiai műtéti ellátásának aspektusai *Mozgásszervi Továbbképző Szemle: Interdiszciplináris Szakmai Lap* 4 : 2 p. 26 (2021)

Sallai, Imre ; Szalay, Krisztián ; Szatmári, Attila ; Lovas, Tímea ; Bagó, Attila ; Nagy, Gergő Dávid ; Bődör, Csaba ; Gállfy, Gabriella ; Antal, Imre ; Skaliczki, Gábor et al. Tüdőrák agyi áttéte miatt adott szteroid-kezelés következtében kialakult kétoldali combfej nekrozis: Esetbemutató *Medicina Thoracalis (Budapest)* 73: 5 pp. 334-339. , 6 p. (2020)

Sallai, I., Nagy, Á., Szatmári, A., Kocsis, G., Huszár, A., Kovács, D. T., Skaliczki, G. (2020). Kezdeti tapasztalataink az MR-artrográfiával. *Orvosi Hetilap*, 161(36), 1514-1521.

Skaliczki, G., Szatmári, A., Sallai, I., Antal, I., Kiss, B., Bejek, Z., Terebessy, T. (2020). A vértranszfúzió gyakorisága primer csípőprotézis-beültetés után. *Orvosi Hetilap*, 161(8), 290-294.

Somlyai, Gyöngyi ; Skaliczki, Gábor ; Antal, Imre ; Perlaky, Tamás ; Piroška, Nikolett ; Sallai, Imre; Prospektív életminőség vizsgálat csípőízület endoprotézis beültetése után
Nővér 33 : 6 pp. 27-32. , 6 p. (2020)

Sallai, I., Weidl, M., Szatmári, A., Antal, I., Skaliczki, G. (2019). Rotátorköpenyszakadás után kialakult zsíros degeneráció változása az ín rekonstrukcióját követően, 65 éves kor után. Orvosi Hetilap, 160(14), 533-539.Szaccikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Szatmári, A., Menyhárt, Á., Antal, I., Sallai, I., Holnapy, G., Bejek, Z., Skaliczki, G. (2019). A multimodális posztoperatív fájdalomcsillapítás szerepe primer csípőízületi arthroplasticában. Orvosi Hetilap, 160(52), 2054-2060.Szaccikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Szatmári, A., Benedek, B., Perlaky, T., Szalay, K., Sallai, I., Skaliczki, G., Antal, I. (2018). Degeneratív és onkológiai indikációk alapján beültetett reverz vállprotézisek funkcionális kimenetelének összehasonlítása. Orvosi Hetilap, 159(45), 1838-1843.

Sallai, I., Péterfy, N., Sanatkhani, M., Bejek, Z., Antal, I., Prinz, G., ... & Skaliczki, G. (2017). Rhodococcus equi által okozott nagyzületi endoprotézis körül kialakult fertőzés. Orvosi Hetilap, 158(27), 1071-1074.

Szatmári, A., Sallai, I., Mohos, P., Antal, I., & Skaliczki, G. (2017). Osteolysis artroszkópos Bankart műtét során használt felszívódó poly-L-laktát alapú implantátum környezetében Magyar Traumatológia Ortopédia Kézsebészet Plasztikai Sebészet, 60(1-2), 5-11.

16. Sallai, I., Kővári, E., Ádám, K., Kovács, B. K., Magyar, P., Futácsi, B., Skaliczki, G. (2014). Artroszkópos rotátorköpeny-rekonstrukció prospektív vizsgálata.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Jelen munkának nem csak az a különlegessége, hogy egy mindennapi klinikai problémára alapkutatási mélységig leásva keres megoldást. Az is, hogy ennek megoldására számos szakterület neves képviselői dolgoztak egy csapatban.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Buzás Editnek, Prof. Dr. Nagy Györgynek, akik a kutatás megkezdésétől egészen az első közlemény megírásáig fontos és hasznos tanácsokkal láttak el az extracelluláris vezikula kutatás területén és szakmai szempontból felügyelték, hogy a kutatásunk jó mederben haladjon.

Köszönöm Dr. Marton Nikolett segítségét, aki sok időt töltött azzal, hogy megtanítsa nekem, hogy mik is azok az extracelluláris vezikulák és hogyan kell őket kutatni.

Köszönöm Prof. Dr. Vásárhelyi Barnának, aki a Központi Laboratórium eszközeit rendelkezésünkre bocsájtotta és használatukat engedélyezte. Továbbá köszönöm Dr. Komlósi Zsolt segítségét, hogy megtanította a gépet használni és a megfelelő fluorochromok kiválasztásában segített.

Köszönöm Dr. Kittel Ágnes segítségét, aki a TEM elemzésben segített.

Köszönöm Dr. Veress Dániel segítségét, aki a statisztikai elemzésekben vállalt nélkülözhetetlen feladatot, valamint a koncentráció és méret elemzéseknél segített.

Köszönöm Dr. Drahos László, Dr. Turiák Lilla és Dr. Sugár Simon segítségét, akik a tömegspektrometriai mérések és elemzések elvégzésében voltak segítségünkre.

Köszönettel és hálával tartozom Prof. Dr. Szendrői Miklós nyugalmazott tanszékvezető egyetemi tanárnak és Prof. Dr. Szőke György jelenlegi tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy 2014-ben az egyetem elvégzését követően azonnal, egyöntetűen alkalmasnak találtak arra, hogy a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikáján kezdjem meg pályafutásomat. Az elmúlt tíz év alatt mindenben támogattak és teret engedtek a kutatás és szakmai érdeklődés kiteljesedésének.

Köszönettel tartozom Dr. Antal Imre Docens Úrnak, aki Osztályvezetőként közvetlen főnököm, tanárom és mentorom is volt az elmúlt időben. Segítségére minden nap számíthatok és megtisztelő bizalmát élvezhetem.

Abban a szerencsés helyzetben vagyok, hogy két mentor szárnyai alatt dolgozhattam azóta, mióta a klinikára kerültem. Köszönöm témavezetőm, mentorom, barátom, Dr. Skaliczki Gábor Tanár Úr, segítségét, támogatását és bizalmát, aki felvételemtől kezdve hitt bennem, segített, támogatott, lehetőséget adott arra, hogy megtanuljam tőle is a kutatás és a klinikum tudományát. Nehéz feladatot szánt nekem, de folyamatos segítségével, lendületével elvitt oda, hol azt mondhatjuk, hogy az általa 2015-ben megálmodott projekt megvalósult. Emlékszem arra a beszélgetésre, amikor még a Karolina úton a szobájában leültetett egy székre és elmondta a „színes szélesvásznú” tervét, ami nem könnyű, de nagyon jó cikket lehet majd belőle írni. Én pedig elhittem. Remélem még sok hasonló lehetetlennek tűnő dolgot szán még nekem.

Köszönöm a klinika szakdolgozóinak, akik szintén nagy segítségemre voltak.

Végül pedig szeretném megköszönni Családomnak. Édesanyámnak, Édesapámnak, akik elindítottak és támogattak minden pillanatban, amikor elbizonytalanodtam. Testvéremnek, aki minden sikeremnek szívből örül. Nagyon köszönöm Feleségem Janka türelmét és támogatását, azt, hogy most is Ő vezet én pedig tudom a kocsiban írni a szöveget, a gyermekeinknek Veronikának és Izabellának, hogy csendben nézik hátul a mesét.