

Extracelluláris vezikulák vizsgálata szeptikus és aszeptikus periprotetikus ízületi folyadékban

Doktori értekezés - Tézisfüzet

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

1. BEVEZETÉS

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. 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).

A mindennapi kezelés során vannak egyértelmű esetek és könnyen meghozható döntések. Ezek általában az elhúzódó sebváladékozás, akut (SSI), valamint a késői haematogen infekciók magas szeptikus labor gyulladási paraméterekkel, esetleg szeptikus 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 szeptikus esetet is szeptikusként kezeljük, vagyis „túl diagnosztizáljuk” azt. Továbbá a diagnosztikai nehézségeket az is okozza, hogy nem áll rendelkezésre egy olyan vizsgálat, ami teljes biztonsággal megerősítene, vagy kizárná a periprotetikus fertőzés lehetőségét.

Az elmúlt évtizedben ugrásszerűen felgyorsult a sejtekből felszabaduló membránnal körülhatárolt partikulumok – extracelluláris vezikulák kutatása. Minden eukarióta és prokarióta sejt képes a tőle távol eső sejtekkel kommunikálni extracelluláris vezikulák felszabadításával. 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, különböző méretűek lehetnek, melyek transzmembrán fehérjéket, citoszolból származó fehérjéket és RNS-t tartalmaznak. A neutrofil granulocitákból származó extracelluláris vezikulák antibakteriális hatásával több tanulmány is foglalkozik. 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 opsonizáció után antibakteriális tulajdonságú extracelluláris vezikulákat szabadítanak fel.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálatunk során a nagyzületi protetika legrettegettebb szövődményével, a protézis körül kialakult fertőzés újfajta diagnosztikai lehetőségével foglalkoztunk. 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 gyulladásozó 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 tudunk felvetíteni a periprotetikus infekciósozó 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 protokoll 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 sejt felszíni 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 TUKEB: 4/2015) zajlott. Minden vizsgálatba bevont beteg a betegtájékoztató elolvasása után beleegyező nyilatkozatot töltött ki. A minták gyűjtése a MISEV ajánlása szerint történt.

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 folyadéokra 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.

1. 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 percután 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

A punkciót követően a levett mintát azonnal ACD-A (citrátos vérvételi cső) vákuumcsőbe tettük az *in vitro* vezikulatio elkerülése érdekében. 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. A minta előkészítés további lépéseit a disszertációban részletesen ismertetem.

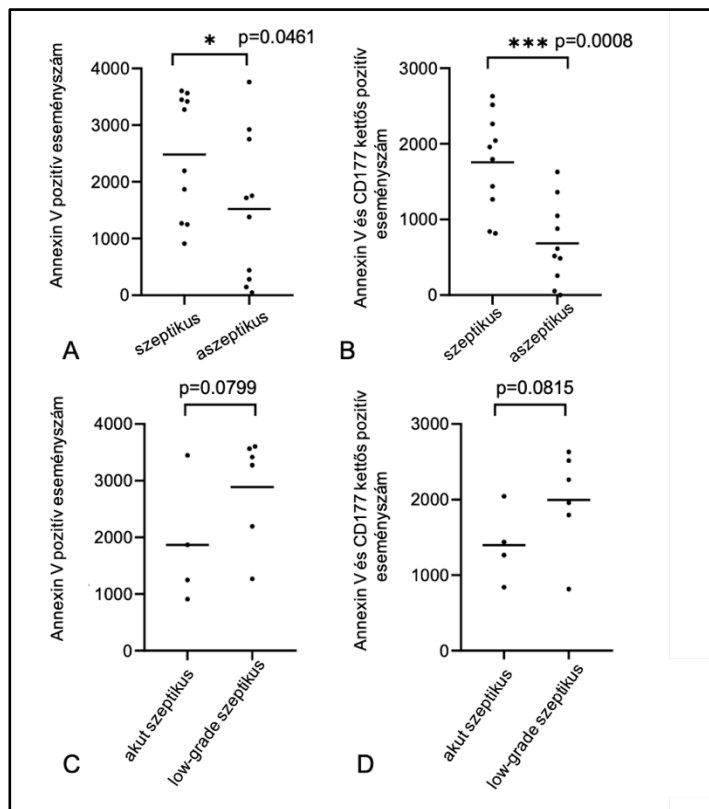
3.3. Az izolált extracelluláris vezikulákon elvégzett vizsgálatok

Az izolált mintákon a következő méréseket végeztük: áramlási citometria, tömegspektrometria (LC-MS analízis), nanoparticle tracking analysis (NTA), elektronmikroszkópos vizsgálat (transmission electron microscopy - TEM), Mikrobiológiai vizsgálat. 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 (1 ábra A).

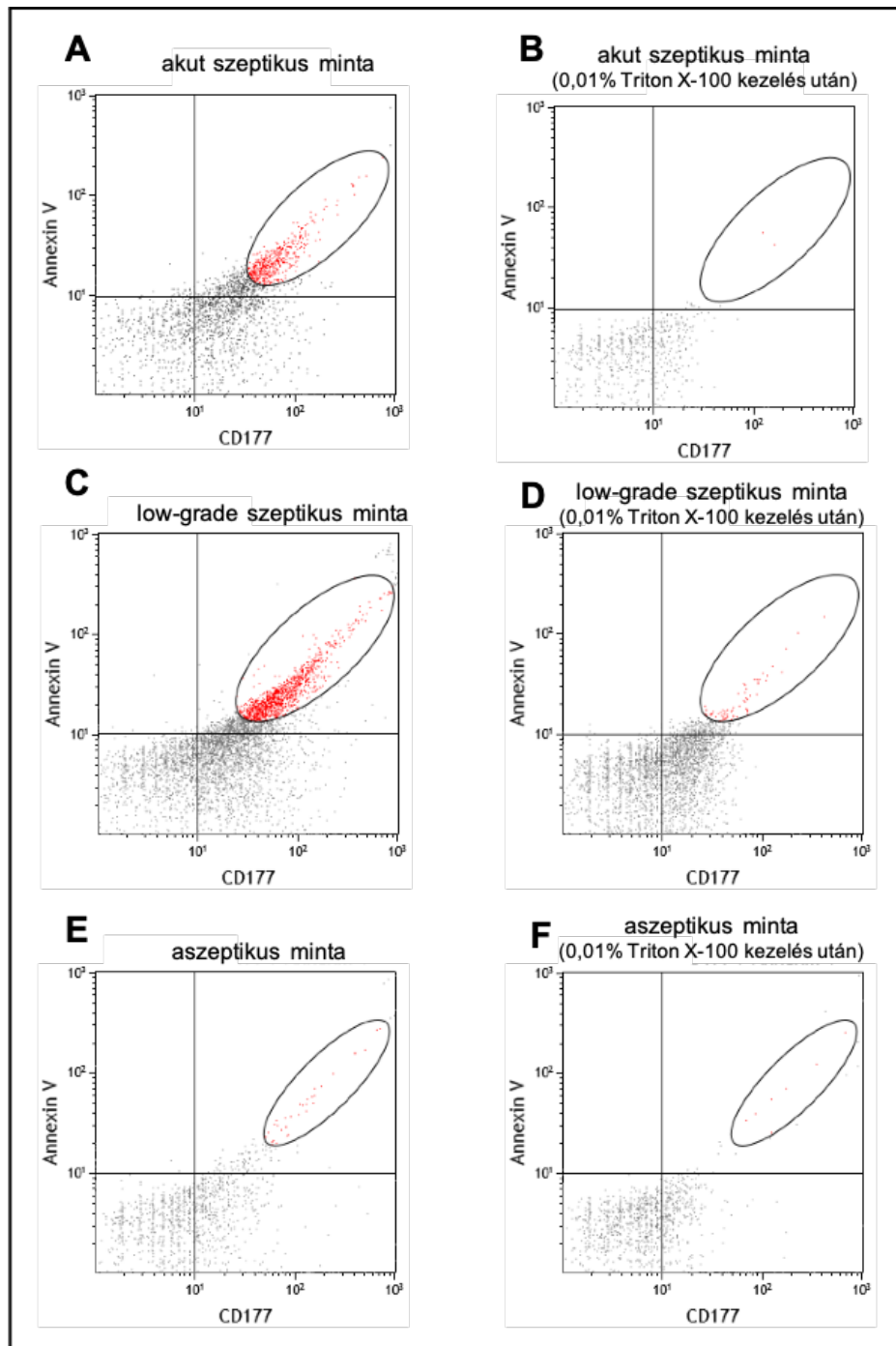


1. ábra; Annexin V jelölt eseményszám szignifikánsan magasabb volt a szeptikus csoportban ($p=0,046$, t-teszt), mint az aszeptikus csoportban. A CD177 és Annexin V dupla jelölés szignifikánsan magasabb volt a szeptikus csoportban ($p = 0.000809$, t-teszt), mint az aszeptikus csoportban (A,B). Az akut 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), (1. ábra C, D). Kettős jelölést, FITC konjugált Annexin V és PE konjugált anti-human CD177 antitesttel végeztük (1. 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 (2. 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.

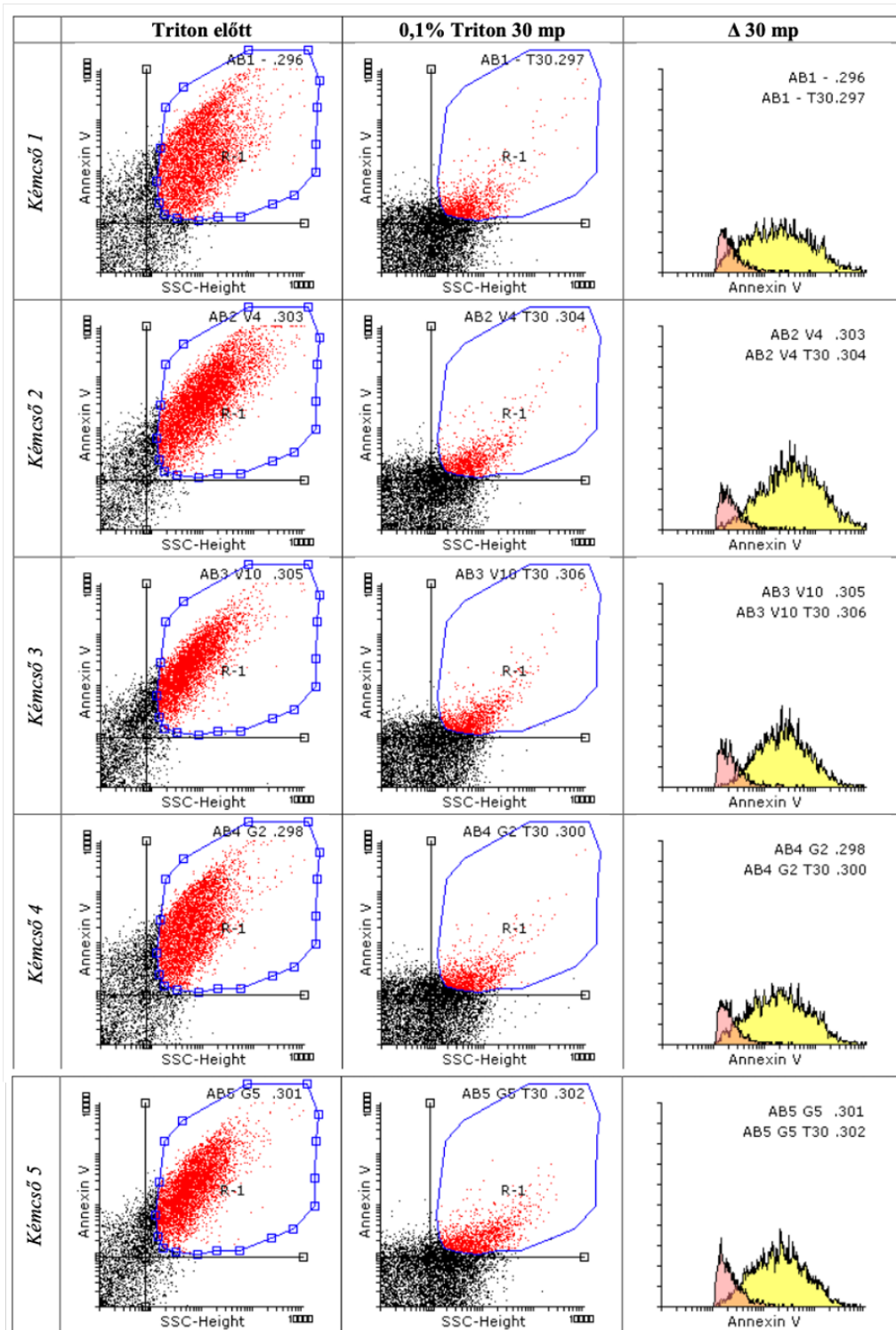


2. ábra; A dot plot ábrák mutatják az akut szeptikus (A), low-grade szeptikus (C) és aszeptikus (E) mintákat, melyeket annexin V és CD177 sejtfelszíni markerekkel jelöltünk. Miután 0,01%-os Triton X-100 detergensenel kezeltük a mintákat (B,D,F) a valódi extracelluláris vezikulák által keltett jelek eltűntek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

Az antibiotikus kezelés után a mintákból mért extracelluláris vezikulák által keltett események száma (2. táblázat, 3. ábra) nem különbözött szignifikáns (t-teszt, $p=0,2469$) mértékben az antibiotikus kezelés nélküli méréshez hasonlítva. A 3. 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.

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

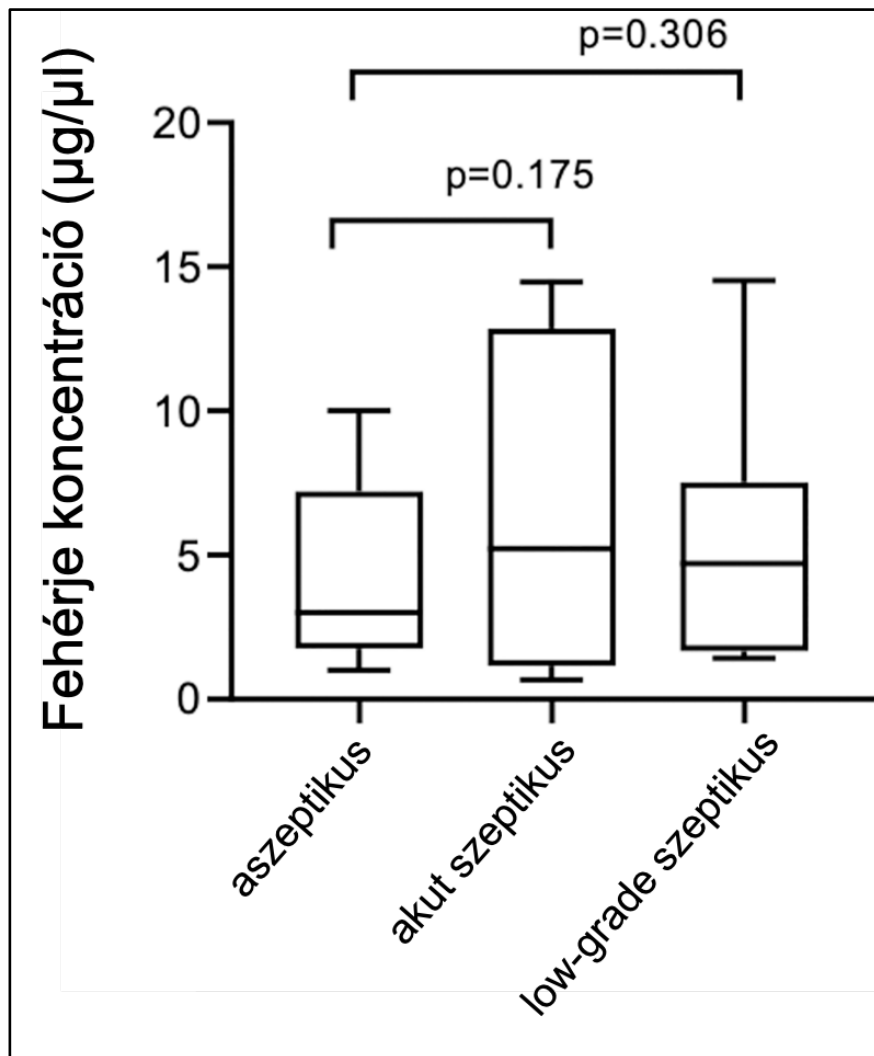
($p=0,2469$)	minta 1	minta 2	minta 3	minta 4	minta 5
detergens (triton) előtt	4694	5920	4400	4720	4630
0,1% Triton 30 mp	1085	1080	1130	1060	1389
különbség	3609	4840	3270	3660	3241



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

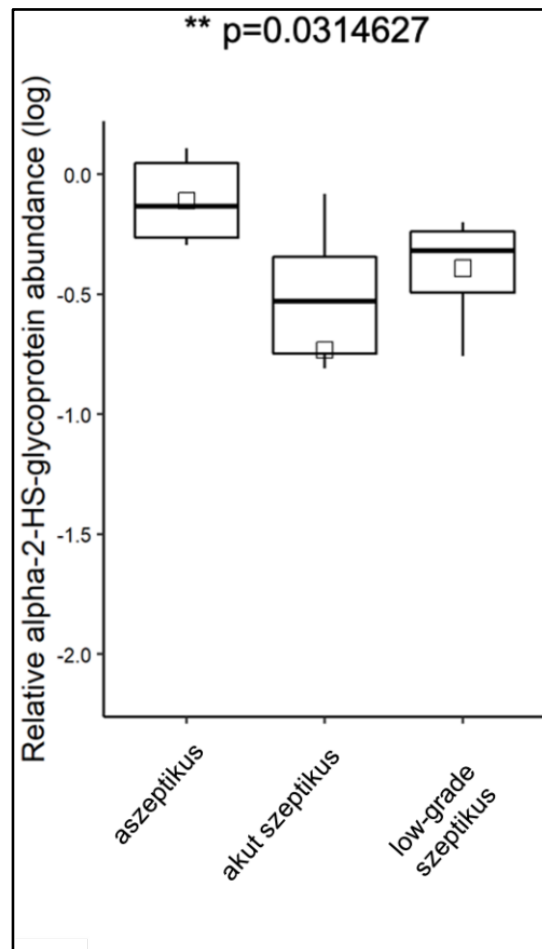
4.2. Tömegspektrometriai elemzés (LC-MS analízis)

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 (4. 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.

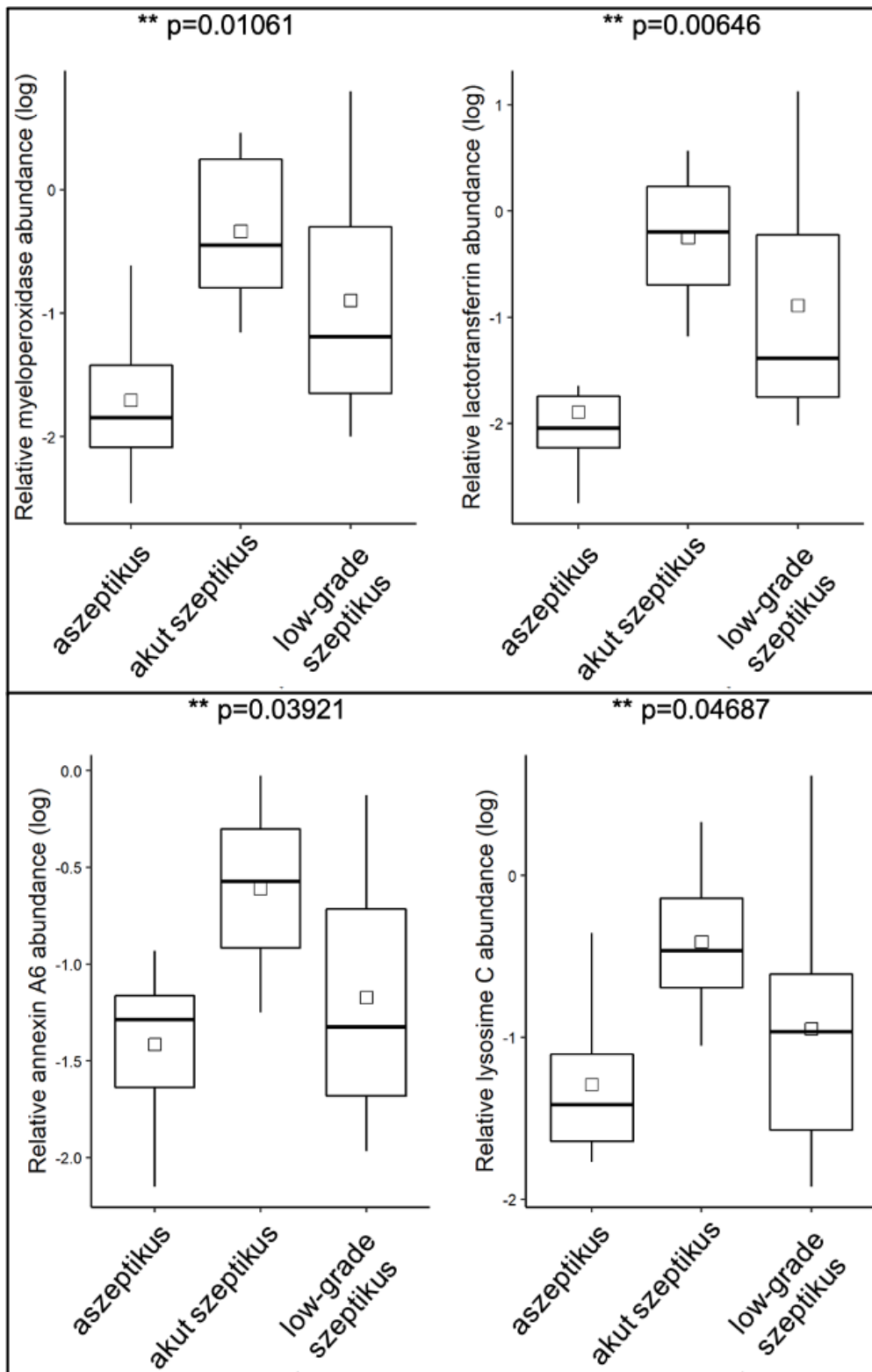


4. ábra; A tömegspektrométerrel vizsgált minták kumulált fehérje koncentrációja (ug/ul). Az akut szeptikus csoportban volt a legmagasabb, ezt a low-grade szeptikus minták követték, a legalacsonyabb az aszeptikus mintákban volt. A különbségek nem voltak szignifikánsak ($p = 0.175$ és $p = 0.306$).

A vizsgált fehérjék közül az alpha-2-HS-glycoprotein-nek (5. 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 lactotransferinnak, myeloperoxidase-nak, lysosyme C-nek és annexin A6-nak (6. 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.



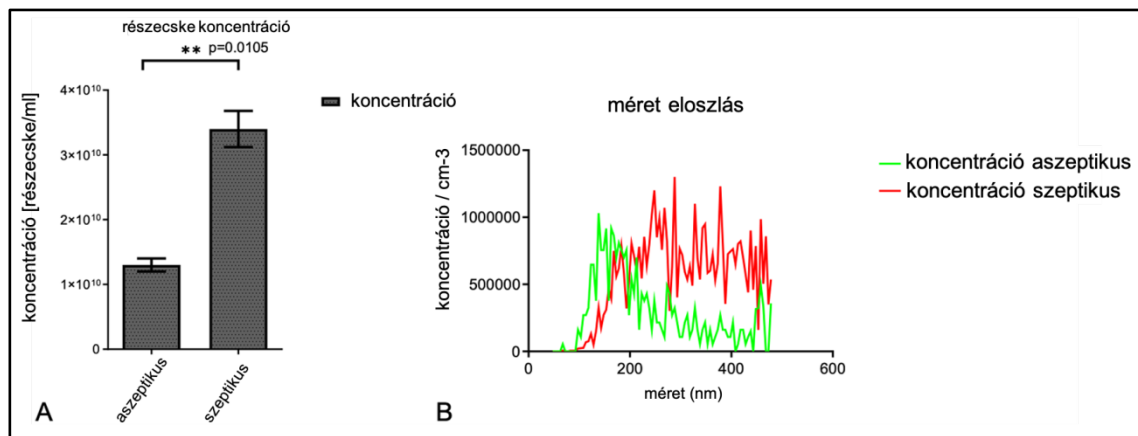
5. ábra; Az alpha-2-HS-glycoprotein mennyisége szignifikánsan magasabb volt az aszeptikus mintákban ($p=0,0314627$) mint az akut szeptikus mintákban.



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

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) (7. 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 (7. ábra B).



7. 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

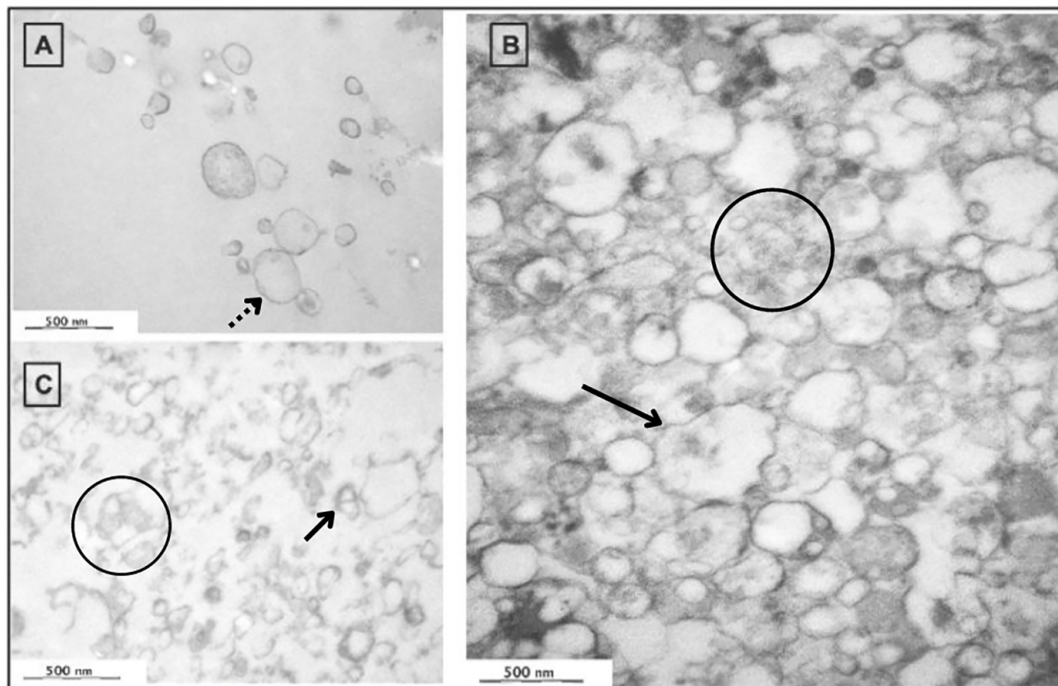
Előkészítés és fixálás után 2 aszeptikus, 2 low-grade szeptikus és 2 akut szeptikus minta morfológiai vizsgálatát végeztük TEM segítségével. Minden mintában találtunk extracelluláris vezikulaként azonosítható struktúrákat, azonban jelentős számbeli és morfológiai különbségeket figyeltünk meg a három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

Az aszeptikus mintáinkban (8. ábra A) kevesebb és kisebb méretű extracelluláris vezikulát észleltünk, a szeptikus mintákhoz hasonlítva. A mérettartomány 150-200 nm volt. Az

aszéptikus mintákból izolált extracelluláris vezikulákat körülvevő membrán vékony és szabályos volt, valamint a belsejében kevés magasabb denzitású „szállítmány” figyeltünk meg.

A legmagasabb extracelluláris vezikula koncentrációt az akut széptikus mintáinkban (8. ábra B) találtuk. Mérettartományuk főként 350-400 nm között volt, vastagabb, kissé szabálytalanabb membránnal körülveve és nagyobb mennyiségű magasabb denzitású „szállítmány” tartalmaztak, valamint ugyanez a struktúra körülöttük szabadon is megfigyelhető volt.

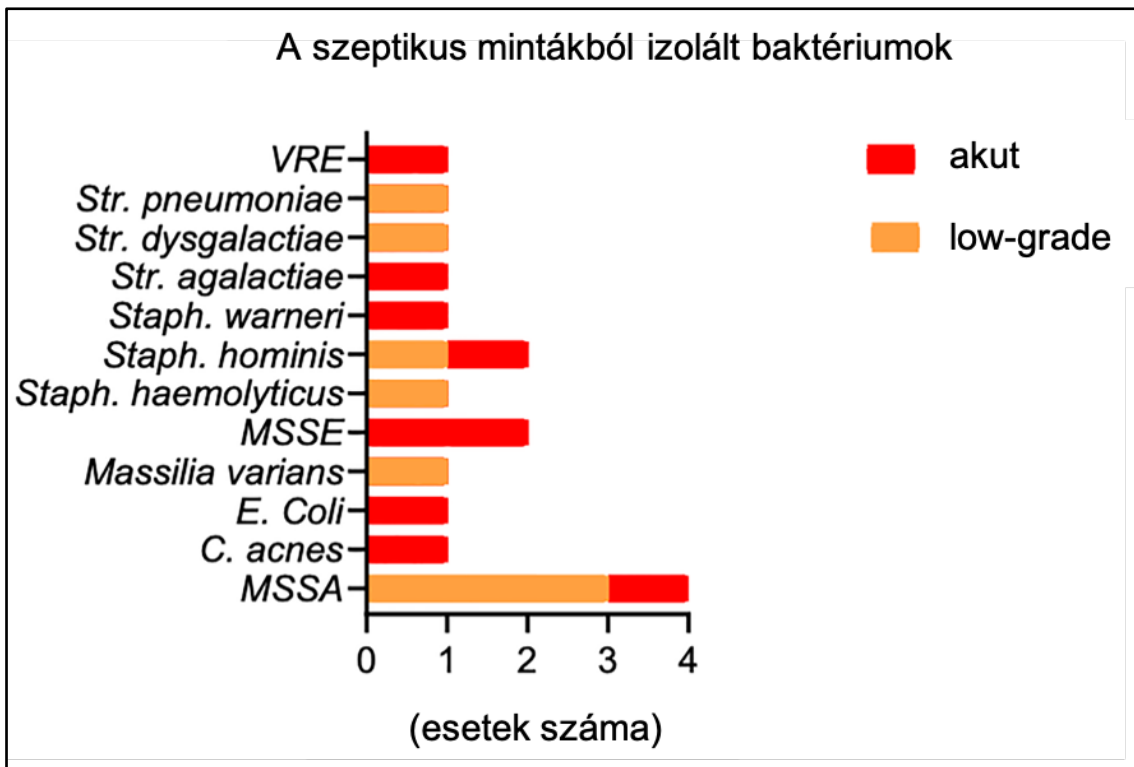
A low-grade mintákban (8. ábra C) az előbb említett két tulajdonság keverékét tapasztaltuk. Mérettartományban 150-300 nm között voltak észlelhetőek, az extracelluláris vezikulák kevésbé voltak szabályosak, mint az aszeptikus mintákban, és a fentebb említett magasabb denzitású „szállítmány” inkább a vezikulák körül volt észlelhető.



8. ábra; Aszeptikus mintáinkból izolált extracelluláris vezikulák (A), vékony membránnal rendelkeznek (szaggatott nyíl). Az akut széptikus mintákból izolált extracelluláris vezikulák (B) vastagabb, szabálytalanabb membránnal rendelkeznek (folyamatos nyíl), bennük és körülöttük magasabb denzitású „szállítmány” látható (kör). A low-grade széptikus 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: (9. ábra) négy (n=4) esetben találtunk methicillin érzékeny *Staphylococcus aureust* (MSSA), két (n=2) esetben methicillin érzékeny *Staphylococcus epidermidist* (MSSE), két (n=2) esetben *Staphylococcus hominist*, 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.



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

5. 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 folyadékából 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 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.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. 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 befertőzött ízületi protézisekben. *Orvosi Hetilap*, 165(3), 98-109.

6.2. A tézis témájához közvetlenül nem kapcsolódó publikációk

Skaliczki, G., Kovács, K., Antal, I., Sallai, I., Kovács, B., Nyóger, 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 ; Bödör, 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 ; Pirooska, 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). Rotátorköpeny-szakadás 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 nagyízületi 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.

ΣIF: 17,06