

**Limfociták és kardiovaszkuláris betegségek szempontjából jelentős citokinek,
faktorok vizsgálata intraoperatív perikardiális folyadék mintákban**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Gilicze Orsolya



Témavezetők:

Prof. Dr. Berki Tímea egyetemi tanár

PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Dr. Lénárd László egyetemi adjunktus

PTE KK Szívgyógyászati Klinika

P é c s, 2019

ÖSSZEFOGLALÁS

A perikardiális folyadékot (PF) csak kivételes esetekben vizsgálják annak ellenére, hogy a PF-ot nyitott szív műtétek során mindig eltávolítják. A PF elemzése olyan immunológiai folyamatokba engedhet betekintést, melyek központi szerepet játszhatnak a szívinfarktus (MI), az érelmeszesedés (AS) és aorta billentyű sztenózis (CAS) kialakulásában.

Munkánk során aorta billentyű- illetve koronária bypass (CABG) műtéten átesett betegek PF-ában limfocita csoportokat, valamint, immunaktivációs markereket, citokineket határoztunk meg. Ugyanezen betegekből megvizsgáltuk a természetes citrát-szintáz (CS)-ellenes IgG/IgM autoantitestek mennyiségét és ezek kapcsolatát szív- és érrendszeri betegségekben jelentős baktériumokkal.

A PF a vérnél szignifikánsan nagyobb arányban tartalmazott aktivált limfocitákat ($CD3^+HLA^+$ -, $CD8^+HLA^+$ sejtek) és memória T-sejteket (T_{memo}). Koszorúér betegekből a $CD4^+$ helper T (T_H) és a $CD4^+$ regulatórikus T-sejt (T_{reg}) aránya emelkedett volt a billentyű betegekhöz képest PF-ban és vérben egyaránt. A regulatórikus limfociták közül kizárólag az iNKT populáció ért el magasabb mennyiséget a PF-ban, mint vérben. A CABG-s páciensek vérében az MCP1 szintje emelkedett volt a billentyűs csoporthoz képest.

A teljes Ig szint legalább 4-szer magasabb volt a plazmában, mint a PF-ban, de a PF-ban a természetes anti-CS IgM relatív emelkedése volt megfigyelhető. A *Mycoplasma pneumoniae* ellenes antitest pozitív betegeknél szignifikáns mértékben magasabb volt az anti-CS IgG szintje. Koszorúér betegekből az anti-CS IgG szintje korrelált *M. Pneumoniae*-, *Chlamydia pneumoniae*-, és *Borrelia burgdorferi* ellenes antitestek titerével.

Reméljük, hogy eredményeink hozzájárulnak olyan jövőbeli kutatásokhoz, melyek megváltoztatják és szélesítik a PF tudományos és klinikai jelentőségét.

BEVEZETÉS

A PF vizsgálata releváns módszer kardiovaszkuláris betegségek feltérképezéséhez

A szívburok visceralis és parietalis lemeze által határolt tér normális körülmények között 15-50 ml áttetsző, szalmasárga perikardiális folyadékot tartalmaz. PF nem csupán plazma ultrafiltrátum, hanem a szív interstíciumából származó transzszudátum, illetve miokardiális nyirokfolyadék keveréke is, így a benne lévő anyagok, molekulák analízise révén információt nyerhetünk a miokardiális interstícium állapotáról. A PF a szív mechanikai védelmén túl szerepet játszik neuroendokrín és immunológiai folyamatokban egyaránt. A PF nem része a rutin klinikai diagnosztikának, annak ellenére, hogy a fent említett tényezők, továbbá a szív anatómiai közelsége és a tér elzártasága erre alkalmassá teszi.

Egyre több kutatás mutat rá, hogy a PF igen stabil folyadék, alacsony a clearance-e és különböző szív- és szívizom eredetű faktorok halmozónak fel benne. A PF összetétele hatással lehet akár a szív-műtétet követő gyógyulási folyamatokra, valamint alkalmas közeg mesenchimális őssejtek beültetésére is. Immunmoduláló kezelések a jövőben csökkenthetik a szívizom infarktus kiterjedését és elősegíthetik a miokardium regenerációját. A PF diagnosztikus, prognosztikus és terápiás lehetőségeinek feltérképezése a jelenleginél több figyelmet érdemelne.

Koronária bypass – (CABG) és aorta billentyű műtétek indikációs területeiről röviden

Koronária bypass műtét során a szűkülettel rendelkező koszorúsér vagy erek áthidalása történik, helyreállítva így a miokardium oxigénellátását. A beteg tünetei széles skálán mozoghatnak a tünetmentességtől az instabil angináig. Operáció javasolt a főtörzs szignifikáns szűkülete, vagy főtörzs ekvivalens (proximális LAD + proximalis CX) szűkület, háromér-betegség (LAD, Cx, RCA), továbbá egy- vagy két-ér betegségben, ha a proximális LAD is érintett, vagy LVEF<50% - terheléses vizsgálattal igazolt iszkémia mellett. Az operáció alapfeltétele a koronarográfiával

igazolt organikus szignifikáns szűkület (70%-os vagy annál nagyobb, ill. főtörzs esetében 50%-nál nagyobb mértékű), megfelelő kifolyópálya, továbbá életképes szívizom terület.

Degeneratív-kalcifikáció, reumás láz vagy veleszületett anomália (pl. bikuszipidális aorta billentyű) vezethet aorta billentyű szűkülethez, melyet szignifikáns sztenózis esetén (orificium area $<1,0 \text{ cm}^2$), legtöbbször műbillentyű beültetéssel lehetséges csak gyógyítani. Aorta billentyű elégtelenség leggyakoribb oka veleszületett eltérés, meszes degeneráció, infektív endokarditisz, Marfan-szindróma, ritkábban autoimmun betegségek. Sebészi beavatkozás szükséges NYHAIII-IV. stádiumban, NYHA II. tünetekhez társuló progrediáló bal kamra tárgulat/csökkenő bal kamra funkció fennállásakor, illetve csökkent bal kamrai ejekciós frakció mellett. Billentyű csere vagy plasztika jön szóba szignifikáns aorta regurgitációnál.

Az immunrendszeréről

A szervezetbe bekerülő patogénnel elsőként a veleszületett immunrendszer elemei (pl. makrofágok, dendritikus sejtek) kerülnek kapcsolatba bekebelezve, majd feldolgozva az antigént, ill. elindítják a nagy fajlagosságot mutató és immunológiai memóriát biztosító adaptív immunválaszt a limfociták (B- és T-sejtek) megfelelő klónjainak aktiválása révén.

A perifériás vérben keringő limfociták 3 fő csoportját a közös limfoid őssejtből származó B-, T-, valamint NK-sejtek alkotják. Vérben nagyrészt nyugvó állapotban keringenek, ha a nekik megfelelő antigénnel (AG) találkoznak, aktiválódnak és effektor sejtté differenciálódnak, illetve memória sejtek keletkeznek belőlük, melyek évekig (akár egész életen át) megmaradhatnak.

Keringő limfociták kb. 5-15%-a konvencionális (CD19+) B-sejt, mely antigén inger hatására ellenanyagot (immunglobulint) termel. Az antitestek (AT) vagy immunglobulinok (Ig) olyan vérben megtalálható fehérjék, amik akkor termelődnek, amikor a szervezet az immunrendszer számára idegen anyaggal, másnéven antigénnel találkozik. A memória B-sejtek az izotípus váltásnak köszönhetően IgA, IgE vagy IgG izotípusú membrán kötött Ig-nal rendelkezhetnek. Ezzel ellentétben a naiv B sejtek IgM vagy IgD típusú Ig-t expresszálnak. A (CD5+)

B1-sejtek (összes B-sejt 5%-a), főleg pleurális és peritoneális üregben találhatóak, nyirokcsomókban pedig egyáltalán nincsenek normális körülmények között. A B1 B-sejtek által termelt természetes (auto)antitestek olyan immunglobulinok, amelyek genetikailag konzervált patogén szekvenciákat ismernek fel, így egy fertőzés során a védekezés első vonalában szerepelhetnek, illetve az evolúció során konzervált saját struktúrákat is felismernek és jelen vannak mind egészséges egyének, mind szisztémás autoimmun betegségben szenvedők szérumában

A (CD3+) T-sejtek hozzák létre a legnagyobb csoportot. Ezen limfociták nem termelnek ellenanyagot és kizárólag antigén prezentáló sejt felszínén megkötött peptid természetű AG-nel képesek reagálni.

A természetes immunrendszer sejtjei közös fenotípusos sajátosságokat mutatnak, és mind a veleszületett-, mind a szerzett immunrendszer tulajdonságait hordozzák.

A citokinek átmeneti génaktiváció hatására alacsony koncentrációban termelődő, kis molekulatömegű glikoproteinek, melyek nagy affinitással kötődnek receptoraikhoz és a sejtek közti kommunikációt és az immunválasz irányát szabályozzák.

Immunrendszer szerepe kardiovaszkuláris betegségekben és a PF-ban

A miokardiális infarktus (MI) steril gyulladást okoz, amit a veleszületett- és adaptív immunrendszer sejtjeinek aktivációja jellemez. A T-sejtek központi szerepet játszanak különböző szívbetegségek patogenezisében, vagy direkt citotoxicitás- (más immunsejtek gyulladásozó funkciójának indukciója), vagy B-sejtek patogén AT termelésének elősegítése révén. CD4⁺ helper T (T_H) -, regulatórikus T- (Treg), natural killer T (NKT) sejtek, γ/δ T és iNKT sejt populációk bizonyítottan nagyban hozzájárulnak olyan kardiovaszkuláris betegségek lefolyásában, mint az akut koronária szindróma (ACS) és az AMI. Miokardiális infarktus (MI) az epikardium sejtjeiben az embrionális program reaktivációját indítja el – egyes feltételezések szerint a PF-ban található parakrín faktorok befolyásolják az epikardiális sejteket. Mindennek ellenére jelenleg elenyésző számban találunk PF-kal foglalkozó tudományos cikkeket ezzel összefüggésben.

Irodalmi adatok szerint az aorta sztenózis (CAS) aktívan szabályozott folyamat és olyan gyulladásos elemek jellemzik, mint az aorta billentyűt infiltráló CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtek, valamint memória T-sejtek aktivációja. Elmeszesedett aorta billentyűk immunhisztológiai vizsgálata során CD8⁺ T limfocitákat mutattak ki.

Szívizom iszkémia esetén számos biomarker kimutatható PF-ban, mielőtt még mérhető koncentrációt érné el a vérkeringésben. Számos szívet érintő kórfolyamat során megváltozik a véráramban található olyan markerek, citokinek koncentrációja, mint a szolúbilis CD40 ligand (sCD40L), szöveti plazminogén aktivátor (tPA), monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), és szolúbilis P-szelektin (sPsel).

Korábbi kutatások eddig nem foglalkoztak a természetes immunrendszer elemeinek jelenlétével és szerepével a PF-ban. A mitokondrium belső membrán egyik evolúciósan magasan konzervált enzime, a citrát-szintáz (CS) megfelelő modellt jelent az előbbieket vizsgálatára, mivel a sejtek fiziológiás körforgása során folyamatos kapcsolatba kerülnek a veleszületett és az adaptív komponensekkel egyaránt. Intézetünkben korábbi vizsgálatokkal kimutattuk CS ellenes IgM autoantitestek folyamatos jelenlétét egészséges egyének keringésében, továbbá anti-CS IgG szintjének emelkedését szisztémás autoimmun betegeknél és szívtranszplantáción átesetteknél. De a PF anti-CS autoantitest tartalmát eddig nem vizsgálták. Az emberi szervezetben a szívizom sejtek tartalmazzák a legnagyobb számban mitokondriumokat, továbbá számos szívet érintő kórállapot jár mitokondriális enzimek felszabadulásával. Reaktív oxigén származékok felszaporodása mitokondrium diszfunkcióval jár pl. az érelmeszesedés, iszkémia-reperfúziós károsodás, cukorbetegség, szívelégtelenség, stb esetén.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkákat arra a feltételezésre alapoztuk, hogy a PF saját immunológiai környezettel rendelkezik, a perikardiális térre jellemző limfocita pool-lal, mely a szívet érintő behatásokra érzékenyen reagál.

1. CABG (A) illetve aorta billentyű (B) műtéten átesett betegek, perikardiális folyadék és vér mintáiban a limfocita csoportok, illetve azok arányainak meghatározása.
2. Az előző pontban említett betegek perikardiális folyadék és vérplazma mintáiban kardiovaszkuláris betegségek szempontjából jelentős citokinek, markerek mennyiségi meghatározása.
3. CS-ellenes természetes autoantitestek, valamint érelmeszesedésben szerepet játszó baktérium ellenes antitestek kimutatása szívbetegek keringésében és PF-ában.
4. Anti-CS autoantitestek és antibakteriális AT-ek Ig alosztályokkal való kapcsolatának vizsgálata vérplazmában és PF-ban aorta billentyű műtéten átesettek esetében, illetve korábbi infarktuson (MI) átesett CABG-s betegekben és olyan koronária betegekben, akiknek nem volt infarktusuk.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Betegek

Kizárólag elektív szív műtétre érkező betegeket vontunk be a kutatásba 2009 és 2013 között. Kizártuk azon pácienseket, akiknek anamnézisében I. típusú cukorbetegség, neoplázia, hepatitis vírusfertőzés, HIV, autoimmun eltérés, bármely plazmaferézissel kezelt kórállapot, vagy kombinált szív műtét indikációja szerepelt. A beavatkozást megelőző napon a laboratóriumi paraméterek normál tartományban voltak. CABG operáltak csoportját (A, n=24) az aorta billentyű betegekkel (B, n=12) hasonlítottuk össze. A természetes autoantitestek vizsgálatához a koszorúér betegeket tovább osztályoztuk korábbi infarktus kórelőzmény alapján.

Mintavétel

Körültekintő, vértelenül preparált szívburok nyíláson át vettünk legalább 3 ml PF-ot, mindig ugyanazon meghatározott feltételek mellett. Ezzel párhuzamosan vénás kanülből 10 ml-t vért vettünk szintén steril vákuumcsőbe, még a heparin beadása előtt. A mintákat feldolgozásig jégen tároltuk.

Sejtek előkészítése áramlási citometrirához

A limfocita csoportokat vérben és PF-ban sejfelszíni markerekhez specifikusan kötődő immunfluoreszcens festés alapján áramlási citometriával azonosítottuk. 50 µl vér- és 100 µl PF pellettet jelöltünk 2×10^5 sejt/100µl koncentrációjú PBS/BSA/azid pufferben való szuszpenziót követően. A sejteket 25 percig antitest koktélokkal jelöltük jégen. Majd 2ml lízis pufferrel 15 percig inkubáltuk a mintákat szobahőmérsékleten, így feloldva a vörösvértesteket. PBS/BSA/azid pufferes mosást és centrifugálást (1000 rpm, 5 perc) a felülúszókat leöntöttük és 300 µl FACS-FIX oldattal fixáltuk a sejteket. Mintákat 4 °C-on tároltuk a FACSCalibur™ Flow Cytometer-rel elvégzett mérésig. Végül a mérések során 10 ezer darab sejtet mértünk le limfocita kapunként, az egyes limfocita populációk arányát a teljes limfocita szám százalékaként írtuk le.

Multiplex microbead technika

Human Cardiovascular 6plex Kit-et használtunk sCD40L, IL-8, IL-6, MCP-1, sPsel és tPa koncentrációjának meghatározására. Sejtmentes PF és vérplazma mintákat -20 °C-on tároltuk. Felolvasztást követően a mintapárokat centrifugáltuk (16000 g, 5 perc), majd 50µl biotin-konjugált keverékkel (BKK) szobahőmérsékleten 2 órán át inkubáltuk. A citométer kalibrálásához Assay Bufferben hígított standard gyöngy keveréket 50µl BKK-kel inkubáltuk 2 órán át, szobahőn. 2 mosást követően 50 µl Streptavidin-PE-t adtunk a mintákhoz. Végül centrifugálás (200g, 2x5 perc) után 500 µl Assay Buffer-ben reszuszpendáltuk a gyöngyöket. Azonnal megkezdtük a mérést az áramlási citométerrel.

Immunglobulin izotípus meghatározás

Plazmában, illetve PF-ban MILLIPLEX MAP Human Isotyping Kit-et használtunk humán IgG alosztályok (IgG1, -2, -3, - 4), IgM, és IgA meghatározására (plazmát 1:16000, PF-ot 1:10 arányban hígítottuk). A mintákat Anti-Human Multi-Immunglobulin gyöngyökkel nedves Microtiter Filter lemezen szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk. 2 mosási lépés után anti-humán kappa vagy lambda könnyű lánc antitesteket adtunk a mintákhoz. A folyadék vákuumleszívását követően a gyöngyöket Sheath Fluid oldatban reszuszpendáltuk, majd a reakciót Luminex 100™ IS-tel olvastuk le.

Anti-CS antitestek meghatározása ELISA-val (enzyme-linked immunosorbent assay) Polisztrén ELISA lemezeket 0.1 M-os bikarbonát puffer-ben oldott 5 mg/ml koncentrációjú sertés szív CS-zal (pH 9.6), 48°C-on 1 éjszakán át inkubáltuk. Miután a nem-specifikus kötőhelyeket 0.5%-os zselatin - phosphate- buffered saline (PBS) oldattal (pH 7.3) blokkoltuk, a plazma (1:100 hígításban) és PF (1:10 hígításban) minta duplikátumokat mosó oldattal (PBS, 0.05% Tween 20) 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Végül a lemezeket tormaperoxidáz (HRP)-konjugált anti-humán IgG vagy IgM-specifikus másodlagos AT-tel 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A reakciót o-feniléndiaminnal hívtuk elő, majd 492 nm-en mértük az optikai denzitást.

Baktérium ellenes antitestek meghatározása diagnosztikus ELISA kittel

B. burgdorferi-specifikus IgG és IgM, anti-*H. pylori* IgA és IgG, anti-*Y. enterocolitica* IgA, IgM és IgG AT-ek anti-*C. Pneumoniae*, valamint anti-*M. pneumonia* IgA, IgG és IgM AT-ek koncentrációját indirekt ELISA teszttel határoztuk meg. 1:100 hígítású vérplazma, valamint 1:20 hígítású PF mintákat 1 órán át 37.8 C-on inkubáltuk. Azután az ELISA platet HRP-vel konjugált anti-humán IgA/IgG/IgM AT-ekkel 30 percig, 37.8C-on inkubáltuk. A reakciót 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinnel hívtuk elő, majd 492 nm-en mértük az optikai denzitást.

Statisztika

A csoportokat Kruskal–Wallis tesztet követően Spearman korrelációval vagy regresszió analízissel hasonlítottuk össze. Wilcoxon tesztet használtunk a vér és PF összehasonlítására. Természetes autoantitestek vizsgálata során a 3 csoport összehasonlítását Spearman korrelációval vagy Mann–Whitney U-teszttel végeztük a normalitástól függően. A 0.05 alatti p érték esetén az eredményeket szignifikánsnak tekintettük.

EREDMÉNYEK

1. **Sejtes összetétel:** A PF domináns fehérvérsejt csoportját a limfociták alkotják (61.94%). A PF-ban a granulociták aránya szignifikánsan alacsonyabb, míg a monociták és eozinofil granulociták aránya jelentősen magasabb volt, mint vérben. A PF-ban mindegyik vizsgált limfocita populáció előfordul, de a vérben megszokottól eltérő arányban. Spearman korreláció alapján a következő sejtek vér és PF szintjei mutattak összefüggést: ($r \geq 0.4$; $p \leq 0.009$) T_c , T_{reg} , T_{naiv} , T_{memo} , $\gamma/\delta T$.
2. **Alap limfocita populációk:** $CD8^+T_c$ és az NK sejtek száma szignifikánsan magasabbnak adódott PF-ban a vérhez képest, míg a $CD4^+T_H$ limfociták épp ellenkezőleg viselkedtek. A B1 és B2 típusú sejtek alacsonyabb mennyiségben fordultak elő PF-ban a vérhez képest ($P < 0.001$; $P < 0.002$), de a B1 sejtek aránya a $CD19^+ B$ populáción belül szignifikánsan magasabb volt a PF-ban, ami magyarázhatja az anti- CS autoantitestek emelkedett szintjét a perikardiumban, a vérhez képest.
3. **Aktivált és naiv/memória limfocita csoportok:** A meghatározó T-populációban az $CD45RO^+$ aktivált sejtek aránya legalább 50% volt PF-ban és vérben egyaránt. A vér legalább kétszer annyi $CD45RA^+$ naiv T-sejtet tartalmazott, mint a PF. Az aktivált T-sejt csoportokon belül $CD3^+HLADR^+$ és $CD8^+HLADR^+ T_c$ sejtek aránya szignifikánsan magasabb volt PF-ban, mint vérben, míg a $CD4^+CD25^+ T_H$ csoport aránya PF-ban volt jelentősen alacsonyabb. A $CD4^+CD25^+$ aktivált T_H limfociták szignifikánsan nagyobb arányban fordultak elő CABG-s betegek vérében és PF-ában egyaránt a billentyű betegekkal összehasonlítva.
4. **Minor (regulatórikus) limfociták:** Mindkét betegcsoportban a PF legalább 3.1-szer több iNKT sejtet tartalmazott, mint a vér. A koronária betegek vérében és PF-ában egyaránt magasabb arányban találhatóak T_{reg} sejtek, mint az aorta billentyű betegek mintapárjaiban.
5. **IgA, IgG, és IgM alcsoportok:** Megállapítottuk, hogy IgA, IgG1-4 és IgM immunglobulinok jelen vannak a PF-ban. Mindegyik vizsgált Ig plazma szintje legalább 3.5x magasabb, mint a PF-ban, de a plazma/PF arányok eltérőek.
6. **Gyulladásos citokinek:** IL6 és MCP1 szignifikánsan magasabb koncentrációban volt kimutatható PF-ban, mint vérben, az IL8 szintek épp

ellenkezőleg viselkedtek. Az MCP1 CABG csoport PF-ában mért szintje jelentősen emelkedett volt az AVR operáción átesettek PF-ához képest.

7. **Prokoagulációs markerek:** SCD40L, tPA és sP-sel a PF-ban kimutathatók voltak, de a plazmában magasabb koncentrációt értek el. A sCD40L szintje vérplazmában 133.93-szor magasabb volt, mint PF-ban. Mindkét mintában az sP-sel volt a domináns marker.
8. **Anti-CS természetes autoAT-ek:** Az anti-CS IgG szintje átlagosan 11-szer, az anti-CS IgM koncentráció csak 2-szer volt magasabb plazmában, mint PF-ban ($P < 0.001$). Ebből kitűnik anti-CS IgM autoAT-ek relatív magasabb aránya PF-ban. Mind az anti-CS IgM és IgG AT-ek plazmában és PF-ban mért koncentrációja erős statisztikai korrelációt mutatott ($P < 0.001$) (IgM: $r^2 = 0.880$; IgG: $r^2 = 0.997$).
9. **Baktérium ellenes AT-ek:** Minden betegben legalább egy antibakteriális AT (IgG és/vagy IgA) kimutatható volt a vérmintákban. A PF esetében kevesebb pozitív mintát találtunk, annak ellenére, hogy ugyanazon egyén plazmája AT pozitivitást mutatott. A vérplazmában legnagyobb arányban *M. pneumoniae* - (74.2%) és *H. pylori* (74.2%) ellenes AT-ek voltak, míg PF-ban *H. pylori* (37.0%), *M. pneumoniae* (14.8%) és *Chlamydia pneumoniae* ellenes AT-ek (14.8%) domináltak. IgM AT sem vérben, sem PF-ban nem volt jelen kimutatható koncentrációban, ami egy zajló, korai fertőzés hiányára utal. *M. pneumoniae* ellenes AT pozitív betegek vérében szignifikánsan emelkedett volt az anti-CS autoAT szint ($P = 0.031$), ugyanezen betegek PF-a hasonló tendenciát mutatott ($P = 0.076$). Infraktuson át nem esett CABG betegek anti-CS IgG szintje korrelált az anti-*M. pneumoniae* AT titerrel. A korábban MI-on átesett koronária betegek *C. Pneumoniae*- és *B. burgdorferi* ellenes AT-jei szignifikáns korrelációt mutattak az anti-CS IgG koncentrációjával.

MEGBESZÉLÉS

A CD25⁺ aktivált CD4⁺T_H sejtek szignifikánsan magasabb százaléka a CABG csoport PF-ában, az AVR csoporthoz képest megerősíti a korábbi állatkísérletes megfigyeléseket, melyek szerint a szívizom iszkémia a CD4⁺ T

limfociták aktivációját okozza, szív eredetű autoantigének felismerése révén. Ezen folyamatok a miokardium regenerációját segítik elő.

Korábbi kutatások bizonyították, hogy a Treg sejtek gátolják a proatherogén effektor T limfocitákat érlelmeszesedés esetén. A keringő Treg sejtek száma klinikai kísérletek során ACS-ban alacsonyabb volt, mint a SA-s betegekben. Saját eredményeink szintén arra utalnak, hogy a krónikus szívizom iszkémia (a mi CABG csoportunk) a Treg sejtek számának emelkedését okozza, nemcsak a vérben, hanem PF-ban egyaránt (AVR betegek mintával összehasonlítva).

Az iNKT populáció aktivációjához vezethetnek endogén és exogén lipidtermészetű proatherogén AG-ek. Az iNKT sejtek minden esetben magasabb PF szintje arra utal, hogy a perikardiális tér saját iNKT pool-lal rendelkezik. A korrelációs adatok alapján elmondható, hogy a keringő iNKT sejtek befolyásolhatják a többi keringő és PF-ban lévő limfocita megoszlását.

Tmemo sejtek általában a külső AG-kel szembeni védekezésben vesznek részt. Ugyanakkor, egerekben kimutatták, hogy perifériás szövetekben az iNKT sejtek érett, naiv CD8⁺ T sejtekben veleszületett immunrendszerre jellemző viselkedést képesek kiváltani, IL4 segítségével. Ezutóbbi interakció magyarázhatja az iNKT és T_C populáció magas perikardiális előfordulását.

Irodalmi adatok szerint a B1 sejtek érlelmeszesedés ellen védő hatást fejtenek ki természetes IgM AT-ek termelésén keresztül, melyek megkötik az oxidált LDL-t és apoptotikus sejteket. B2 sejtek proatherogén hatásúak. AMI-t követően egerekben a B2 limfociták fehérvérsejtek mobilizációja révén monocitákat vonzanak a szívizomba, így súlyosbítva a miokardium sérülést és rontva a szívfunkciót. Saját kutatásaink során a PF-ban a B2 sejtek aránya koszorúér betegekben 1.88-szor magasabb volt, mint az AVR csoportban. Ezzel ellentétben a vérben keringő B2 szubpopuláció ilyen eltérést nem mutatott –ez szintén arra utalhat, hogy a B2 sejteknek szerepe lehet a CAD következtében fellépő szívizom iszkémia kialakulásában.

Elsőként vizsgáltuk szívbetegek PF-ának Ig tartalmát. A PF-ban az Ig-ok megoszlása hasonló a vérre jellemzőhöz, ám az IgA, IgG1-4 és IgM

koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb. Ismert, hogy a miokardium iszkémia reperfúziós károsodását követően komplement aktiváció hatására saját AG-ekkel reagáló természetes IgM AT-ek kötődnek a posztiszkémiás szövethez.

A PF-ban az immunaktivációt jelző citokinek koncentrációja és aránya jelentősen eltért a vérplazmában mért értékektől. Mindez a PF-ban lokális szabályozó faktorok jelenlétére utal. Egyik vizsgált citokin molekula tömege sem haladja meg a 40 kDa-t, ami lehetővé teszi számukra a membrándiffúziót. Az sP-sel 68 kDa-os, és felezési ideje is hosszabb (100 perc). Mindez magyarázhatja, hogy miért ez az egyetlen marker, melynek vér és PF koncentrációja szoros korrelációt mutatott. MCP1, tPA, sCD40L és IL8 felezési ideje maximum 20 perc a keringésben, az IL6-é maximum 6 óra.

Kutatásunk során a perikardiális MCP1 és IL6 szintek szoros korrelációja, valamint a tény, hogy csak ezen a markerek koncentrációja volt magasabb PF-ben, a vérrel összehasonlítva kiemeli ezen citokinek helyi fontosságát a PF-ban. Az általunk mért emelkedett MCP1 vérplazma koncentrációja CABG csoportban, összhangban van Yu és mtsai. korábbi adataival, akik a megváltozott nyíróerők (endotél aktiváció – az ateroszklerózis kezdeti lépése) MCP1 szekréciót fokozó hatását írták le humán köldökvéna endotélben. Korrelációs eredményeink rámutattak, hogy a keringő MCP1 fontos kapocs lehet a PF és plazma limfocitái között.

Annak ellenére, hogy a keringő gyulladásos citokinek nem feltétlenül tükrözik az egyes szövetekben jellemző koncentrációkat korábbi vizsgálatok perifériás vénából, vagy koronáriából nyert vért analizáltak. Ráadásul több plakkk destabilizációban és MI-ban jelentős anyag nem-koszorúsér forrásból (pl. szív interstícium) származik. Mindez és saját vizsgálataink is aláhúzzák a PF jövőbeni analízisének fontosságát.

. A PF magasabb anti-CS IgM szintjét magyarázhatja a B1 populáció relatív emelkedése a perikardiumban a vérhez képest. B1 sejtek képesek ugyanis természetes AT-ek termelésére. Vizsgálataink szerint a PF és a perikardiális tér is a természetes immunrendszer védelme alatt áll. Feltételezhetően, nem a CS az egyetlen molekula, amit a természetes immunrendszer eliminál, a többi

sejttörmelékekkel együtt, megelőzve így az apoptotikus elemek akkumulációját és az autoimmun folyamatokat, melyek kardiotoxikusak lehetnek. Humán klinikai vizsgálatok SLE-s betegekben a természetes IgM eredetű AT-ek karotisz AS-t gátló hatását írták le.

Az anti-CS IgG plazma és vér szintje közti szoros korreláció, arra utalhat, hogy ezen AT nem kizárólag a PF-ban termelődik, hanem a vérből, vagy a nyirokkeringésből is ide juthat transzcitózissal. Ezzel ellentétben a PF-ban az anti-CS IgM-B1 korreláció ezen AT helyi termelődésére utal.

Minden beteg esetén legalább egy vizsgált antibakteriális AT (*M. pneumoniae*-, *Y. enterocolitica*-, *C. pneumoniae*-, *H. pylori*-, és *B. burgdorferi*) kimutatható volt, de nem minden PF minta mutatott baktérium ellenes AT pozitivitást. Ami azt jelentheti, hogy a PF antibakteriális AT szintje alacsonyabb a plazmáénál, valamint a perikardium immunológiailag elzárt tere kisebb valószínűséggel kerül kapcsolatba kórokozókcal, így ezen AT szintek detektálható tartomány alatt mozognak.

M. pneumoniae-t nem csak ateroszklerotikus plakkokban és AS-os egyének PF-ában, hanem egészséges artériákban és vénákban is kimutatták már. *H. Pylori*-t és *C. Pneumoniae*-t AS-us plakkokban azonosították. Vizsgálataink során tapasztalt magas antibakteriális AT pozitívítás szívűtetre kerülő betegek esetében szintén a fent említett kórokozók potenciális szerepére utalhat AS-ban és CAD-ben.

Feltételezhetjük, hogy a természetes- és antibakteriális AT-ek kapcsolatban állnak egymással. Erre utal a *M. Pneumoniae* ellenes AT pozitív esetekben tapasztalt magasabb anti-CS IgM szint PF-ben és vérben egyaránt. Erre utal még a CABG csoportban az anti-CS IgG és az anti-*M. Pneumoniae*-, anti-*C. Pneumoniae*-valamint az anti-*B. Burgdorferi* AT koncentrációk korrelációja. Mindezen eredményeinkből következik, hogy a PF a természetes és adaptív immunrendszer humorális komponenseinek felügyelete alatt áll, amik megvédik a perikardiális teret a toxikus anyagoktól és különböző patogénektől.

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A tézis alapját képező közlemények

Gilicze, O., Simon, D., Farkas, N., Lantos, M., Jancso, G., Berki, T., & Lenard, L. (2019). Characterization of lymphocyte subpopulations and cardiovascular markers in pericardial fluid of cardiac surgery patients. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 1–12. <https://doi.org/10.3233/ch-190594>

Simon D, **Gilicze O**, Farkas N, Najbauer J, Németh P, Lénárd L, Berki T (2018) ‘Correlation of natural autoantibodies and cardiovascular disease-related anti-bacterial antibodies in pericardial fluid of cardiac surgery patients’, *Clinical & Experimental Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 193(1), pp. 55–63. doi: 10.1111/cei.13127.

Egyéb publikációk

Gilicze O., Lenard L., Kvell V., Farkas N., Szabados S., Czirjak L. S

(2012) ‘Autoantibody and cardiovascular marker quantification in pericardial fluid and blood samples - Plenary Lectures and Subspecialty Poster Sessions’, *European Journal of Clinical Investigation*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 42, pp. 1–11. doi: 10.1111/j.1365-2362.2012.02649.x.

Gilicze O, Simon D, Berki T, Czirják L, Szabados S, Lénárd L

(2012) ‘PP-093 Identification of lymphocyte populations and cardiovascular factors in pericardial fluid and blood samples among patients undergoing open heart surgery’, *International Journal of Cardiology*. Elsevier, 155, pp. S129–S130. doi: 10.1016/S0167-5273(12)70313-3.

Gilicze O, Lénárd L, Simon D, Berki T, Czirják L, Szabados S: Kardiovaszkuláris markerek eltérő koncentrációja infarktuson átesett betegek perikardiális folyadékában. *Cardiologia Hungarica* 2012, 42: K14

Gilicze O, Simon D, Donauer E, Hejmel L, Pinter Ö, Szabados S, Berki T, Hegyi A, Lénárd L: Limfocita csoportok és kardiovaszkuláris markerek vizsgálata perikardiális folyadék és vérmintákban szívűtetre kerülő betegcsoportokban. *Cardiologia Hungarica* 2011, 41: N5

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Lénárd Lászlónak és Prof. Dr. Berki Tímeának, hogy végig támogatták ennek az interdiszciplináris projektnek a létrejöttét. Hálával tartozom Dr. Simon Diánának, amiért megosztotta velem az immunológiai laborban szerzett gyakorlati ismereteit. Dr. Farkas Nelinek nem tudjuk elégszer megköszönni a statisztikában és csapat kommunikációban nyújtott segítségét. Köszönettel tartozom a PTE KK Szívgyógyászati Klinika szívsebészeinek és aneszteziológusainak, a mintavételekben való türelmes részvételért. Köszönöm a PTE KK Központi Laboratóriumának a vér és perikardiális folyadék mintákban a fehérvérsejt számok meghatározását, valamint a PTE ÁOK Farmakológiai Intézetének, hogy megosztották velünk a Luminex eszközüket. Ez a munka nem jöhetett volna létre Dr. Lantos Máté, Mészáros Viktória és a PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézetének diagnosztikus részlegének analitikusai nélkül. Hálás vagyok Jake-nek a sok türelméért, támogatásért és az angol nyelvi lektorálásért. Köszönöm a családomnak, hogy mindig hittek bennem.