

XXXI. OTDK Biológia Szekció

**VAN-E SZEREPE A TERMÉSZETES AUTOANTITESTEKNEK
ISZKÉMIÁS SZÍVBETEGSÉGBEN?**

PAP RAMÓNA

Biológus MSc II. Évfolyamos hallgató

Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológia Intézet

Témavezetők:

prof. Dr. Berki Tímea

Dr. Simon Diána

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Kézirat lezárása: Pécs, 2013. január 9.

TARTALOMJEGYZÉK

I. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3.
I./1. A természetes immunrendszer	4.
I./2. Természetes antitestek és természetes autoantitestek	4.
I./3. A természetes autoantitestek.....	5.
I./4. Citrát-szintáz	5.
I./5. A hősokkfehérjék	6.
I./6. A perikardiális folyadék	7.
II. CÉLKITŰZÉSEK.....	10.
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	11.
III/1. Betegek	11.
III/2. Szelekció	11.
III/3. Mintavétel	11.
III/4. ELISA	12.
IV. EREDMÉNYEK	15
V. EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE.....	20
VI. FELHASZNÁLT IRODALOM.....	21
VII. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	23
VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	24
IX. NYILATKOZAT.....	25

I. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A dolgozat célja a természetes autoantitestek kimutatása perikardiális folyadékban, illetve ezen természetes autoantitestek koncentrációjának összehasonlító vizsgálata vér szérumban és perikardiális folyadék mintákban különböző betegcsoportokban. A téma azért aktuális, mert a perikardiális folyadék elemzése egy új meghatározó módja lehet a szív patofiziológiájának tisztázásában.

Az immunrendszer a szervezet védekező mechanizmusa rendszere, amely megvédi a szervezeten belüli biológiai struktúrákat és folyamatokat egy adott antigén vagy fertőzés hatására kialakuló betegségektől. Elnevezése az „immunis” latin szóból ered, jelentése mentes valamitől.

Az immunrendszer egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy felismerő funkciója révén képes megkülönböztetni a szervezet normál saját illetve a nem saját (idegen), valamint a módosult saját struktúráit. Ez mind a veleszületett, mind a szerzett immunitás alapvető jellegzetessége, amely az egyedi integritást és a szerkezeti állandóságot biztosítja [2].

A veleszületett immunitás embrionális korban alakul ki, a szervezet patogének elleni védekezésnek első vonalában tölt be kulcsfontosságú szerepet. Az evolúció folyamán korai megjelenését bizonyítja, hogy a többsejtű élőlényekben (növényekben, illetve gerinces és gerinctelen állatokban egyaránt) nagyon hasonló molekuláris és celluláris funkciók formájában van jelen [9]. A veleszületett immunitás evolúciós szempontból ősi receptorokat, ún. mintázat felismerő receptorokat (PRR) használ. Ezek a receptorok képesek felismerni a patogénekhez társuló molekulák sokaságát anélkül, hogy a saját struktúrákat károsítanák.

Az adaptív immunrendszer csak később jelent meg az evolúció során, létrehozva a gerinces állatok antigén felismerő molekuláinak végtelen készletét (T- és B sejt receptorok formájában). Ez a repertoár lehetővé teszi az egyedek alkalmazkodását a patogének általi kihívásokhoz, ugyanakkor magában hordozza a saját struktúrák felismerésével járó kockázatot és ezzel együtt az autoimmunitás kialakulásának lehetőségét is. Ennek elkerülésére különféle szelekciós mechanizmusok alakultak ki, melyek az autoreaktív klónok inaktiválásával, és a hasznos klónok kiválasztásával járulnak hozzá a megfelelő immunológiai egyensúly fenntartásához. Mivel a T és B sejtek megfelelő aktivációjához nélkülözhetetlen kostimulációs molekulák az antigén prezentáló sejtek (APC-k) felszínén történő megjelenéséhez a veleszületett immunrendszer nagyban hozzájárul, ezért a két rendszer

szoros együttműködése nem vonható kétségbe. Kostimuláció hiányában ugyanis az aktivációs jel nem éri el az adaptív immunválasz aktiválódásához szükséges szintet. Számos további kísérlet bizonyította szintén a két immunrendszer kapcsolatát, azonban a fejlődéstörténeti háttér továbbra is tisztázatlan maradt. A szerzett immunválasz során az MHC molekulákon keresztül valósul meg az immunológiai felismerés első fázisa és az antigén bemutatása, ami ugyanúgy megtörténik a saját antigének esetében is, mint bármely más (nem saját) antigén esetében, a különbségtétel az immunválasz későbbi végrehajtó, azaz effektor fázisában következik be [2]. Míg a szervezetbe bejutó külső antigénekkal, vagy a mutálódott saját struktúrákkal szemben általában támadó jellegű immunválasz alakul ki, addig a normál saját antigéneket az immunrendszer tolerálja. Ez az immunválasz az effektor fázisban csak speciális – általában kóros - esetekben eredményez támadó típusú immunreakciót.

I/1. A természetes immunrendszer

A természetes immunrendszer hidat képez a veleszületett és az adaptív immunrendszer között. Egy újonnan megismert egysége az immunrendszernek, főleg szabályozó funkciót tölt be. A limfociták jellemző fenotípusú és specializált funkciójú meghatározott csoportjai – a T- és a B-sejtek egyaránt – részt vesznek ebben a rendszerben [2]. Ezek a sejtek korlátozott számú, szemi-invariáns, csiravonalban kódolt, autoreaktív antigén receptorokat hordoznak a felszínükön, közös fenotípusos sajátságokat mutatnak, valamint rendelkeznek a veleszületett és az adaptív rendszerekre jellemző tulajdonságokkal, ami egy átmeneti állapotra utal az immunrendszer evolúciója során.

A természetes immunrendszer eddig megismert legfontosabb sejtes elemei az invariáns természetes ölő T (iNKT) sejtek, a mukóza asszociált invariáns T (MAIT) sejtek, a $\gamma\delta$ T-sejtek és a B1 B-sejtek [16]. Ezen sejtek antigén felismerésének funkcionális jellemzői (valamint a B1 B-sejtek által termelt immunglobulinok tulajdonságai) közelebb állnak a mintázat felismerő receptorokhoz, mint a klasszikus adaptív típusú immunológiai felismeréshez. Ezek a felismerő receptorok azonban valódi T- és B-sejt receptorok.

I/2. Természetes antitestek és természetes autoantitestek

A természetes antitestek olyan immunglobulinok, amelyeket a B1 B-sejtek termelnek az antigénnel való előzetes immunizálás nélkül. Ezen antitestek genetikailag konzervált patogén szekvenciákat ismernek fel, így egy fertőzés során a védekezés első vonalában szerepelhetnek. A természetes autoantitestek viszont az evolúció során konzervált saját struktúrákat is felismernek és jelen vannak mind egészséges egyének, mind szisztémás

autoimmun betegségben szenvedők szérumában [4]. Az autoreaktív repertoárok már az ontogenezis korai szakaszában, a magzati életben kiválasztódnak. A természetes autoantitestek többségét csírvonalbeli gének közvetlenül kódolják, elsősorban IgM vagy IgG izotípusúak, polireaktívak és széles spektrumú affinitást mutatnak a felismert epitópokhoz. A polireaktivitás nem jelenti azonban a specifikusság hiányát, azaz minden polireaktív természetes autoantitest különböző epitópok csoportját ismeri fel és ilyen értelemben egyedi. Számos funkciót javasoltak már a természetes autoantitesteknek, pl. immunológiai repertoárok szelekciójában vehetnek részt, szerepet játszhatnak az elsődleges immunválasz felgyorsításában, apoptotikus sejtek eltakarításában segédkezhetnek, gyulladás gátló hatással rendelkezhetnek, valamint hozzájárulhatnak az immunológiai homeosztázis fenntartásához. A természetes antitestek megkülönböztetése a természetes autoantitestektől kissé mesterkéltnek tűnhet, mivel a természetes antitestek termelésének hátterében álló B1 immunglobulin gén készlet korlátozottsága, valamint a nagyszámú felismert antigén miatt valószínű, hogy jelen vannak saját és nem-saját keresztreakciót egyaránt mutató specificitások is.

I/3. A természetes autoantitestek

A természetes antitesteket (natural antibodies) B1 B sejtek termelik antigénnel való találkozás nélkül. A B1 B sejtek átmenetet képeznek a veleszületett és adaptív immunválasz között. Főként IgM izotípusúak immunglobulinok. Genetikailag konzervált patogén szekvenciákat ismernek fel, így részt vesznek a fertőzéskor a védekezés első vonalában. Az egészséges és szisztémás autoimmunbetegségekben szenvedők szérumában egyaránt megtalálhatók a természetes autoantitestek (natural autoantibodies), amelyek az evolúció során konzervált saját struktúrákat ismerik fel. A természetes autoantitestek többsége IgM vagy IgG izotípusú, polireaktív és széles tartományú affinitást mutat a felismert epitópokhoz [4]. Szerepet játszhatnak az elsődleges immunválasz felgyorsításában, gyulladásgátló hatásuk lehet, elősegíthetik az apoptotikus sejtek eltakarítását, részt vehetnek az immunológiai repertoárok szelekciójában, illetve hozzájárulhatnak az immunrendszer egyensúlyának fenntartásához. Jelentőségét bizonyították: és kimutatták állatkísérletekben és humán szérumban egyaránt, de PF-ban még nem vizsgálták eddig.

I/4. Citrát-szintáz

Endoszimbiotikus evolúciós eredetük miatt a mitokondriumban kompartmentalizálódott fehérjék egy érdekes átmenetet képeznek a prokarióta idegentől a nélkülözhetetlen saját molekulák felé. A mitokondriális összetevők szerkezeti és funkcionális konzerváltsága alkalmassá teszi azokat a veleszületett és az adaptív immunválasz közti evolúciós kapcsolatok részletes vizsgálatára. A belső membrán enzimek, különösen a citrát kör enzimek (közülük is a citrát-szintáz) megfelelő modellt jelentenek az előbbieknél vizsgálatára, mivel a sejtek fiziológiás körforgása során folyamatos kapcsolatba kerülnek a veleszületett és az adaptív komponensekkel egyaránt [4,5].

Irodalomból ismeretes, hogy a citrát szintáz enzim antigénjei a sejt szétesése során bekerülnek a keringésbe és kimutathatóak szérumból is. Intézetünkben is korábbi vizsgálatokkal kimutattunk citrát-szintáz ellenes autoantitesteket, mind egészséges egyéneknél, mind szisztémás autoimmun betegségben szenvedőknél ill. szívtranszplantált betegek szérumában is [5]. Így tehát, a magas fokban konzervált mitokondriális belső membrán enzimek közül a citrát-szintáz (CS) nemcsak fontos szerepet játszik a szívizom működése során, de annak sérülése esetén a szívizomfunkció egyik jelentős markere lehet.

Jól ismert, hogy a szérumban keringő alacsony affinitású IgM csoportba tartozó autoantitestek védenek a destruktív immunfolyamatok ellen. Súlyos szöveti sérülés, infekció vagy az immunreguláció malfunkciója során magas affinitású IgG és IgA csoportba tartozó autoantitestek jelennek meg a keringésben, amelyek további súlyos szöveti sérülést okoznak.

I/5. A hősokkfehérjék

A hősokkfehérjék a sejtek legfontosabb fehérjéi közé tartoznak, minden élő sejt működésében alapvető szerepet játszanak, normál körülmények között, és akkor is, amikor a sejteket vagy az egész szervezetet ártalom, stresszhatás éri. Struktúrájukat igen konzerváltan őrizték meg az evolúció során, a bakteriális és az emberi hősokkfehérjék között az 50 %-ot is meghaladja a szerkezeti egyezés. Azonban az evolúció során bekövetkezett változások nem hanyagolhatók el, és jelentős mértékben befolyásolják a hősokkfehérjék immunológiai sajátosságait is. Stresszhatásra fokozott mértékben expresszálódnak, így ősi veszélyjelző molekulaként is működhetnek [1]. A természetes immunitás sokrétű módon képes felismerni a hősokkfehérjéket. A specifikus felismerés és a konzerváltan megőrzött struktúra miatt a hősokkfehérjék immundomináns antigénként viselkednek a legtöbb bakteriális fertőzés során, ezzel megteremtik a lehetőségét a fertőzés által indukált autoimmun folyamatok elindulásának. Az emlősszervezetek az immunológiai homunculusban kódolt formában

megőrzik a hősokkfehérjék képét, s így a szabályozó autoimmunitás fenntartásával védekeznek a sajátot károsító folyamatok ellen. A hősokkfehérjék leggyakrabban használt felosztása molekulatömegük alapján történik, a legfontosabb családok a kisméretű hősokkfehérjék, a kb. 60 kilodalton molekulatömegű hősokkfehérjék (hsp60, a hsp70, a hsp90 és a hsp100). Az újabb vizsgálatok szerint mind a hsp70, mind a hsp60 jelentős mennyiségben megtalálható az egészséges személyek keringésében [11]. Ma még nem ismert a plazmában megtalálható szolúbilis hősokkfehérjék forrása, mert egyik sejtípus esetében sem találtak szabályozott hősokkfehérje szekrécióra utaló jeleket. Egyik lehetséges magyarázat, hogy bizonyos molekuláknak a sejtből való kikerülése, exocitózisa során a tekeredésüket szabályozó dajkafehérjék is passzív módon távoznak a sejtől. Egy másik szerint, szintén passzív hősokkfehérje felszabadulás történhet, mikor a nekrosis és kisebb mértékben a programozott sejthalál során elpusztult sejtek belsejéből fehérje molekulák szabadulnak fel. A hősokkfehérjék ellen antitestek és specifikus T-sejtek keletkeznek egészséges egyéneknél is, ezek mennyisége változhat (emelkedik, de néha csökken is) egyes betegségekhez vezető kóros folyamatok hatására. A kórokozó mikroorganizmusok jelentős mennyiségben jelenlévő alkotórészei a hősokkfehérjék. Amikor egy infekció bekövetkezik, a szervezet felismeri a hősokkfehérjéket, ez a folyamat elősegíti a később bekövetkező bakteriális fertőzések leküzdését. Az elmúlt években számtalan bizonyíték gyűlt össze arról, hogy az immunsejtek és egyéb sejtek, köztük az érfalakat bélelő endotél sejtek, receptor közvetítésével felismerik a hősokkfehérjéket, és így a hősokkfehérjék célsejteket aktiválhatnak [12,13]. A hsp60 fehérjék citokin szekrécióra kifejtett hatásain túl számos más szerepet is tulajdonítottak a vérbe kerülő hősokkfehérjéknek, mint például az endotél sejtek aktivációját, a csontfelszívódás beindítását, és az idegsejtek védelmét. A hősokkfehérjék számos baktérium immundomináns antigénjei, tehát velük a fertőzés során erős immunológiai reakciót adó antitestek és immunsejtek keletkeznek, amelyeknek jelentős szerepük van a későbbi bakteriális infekciók elleni védekezésben. A baktériumokból a keringésbe kerülő endotoxinok fő alkotórészei, a lipopoliszacharidok CD14-nek nevezett receptorai is részt vesznek a hsp60 molekulák sejtaktivációs folyamataiban. A komplement a vérplazmában jelenlévő enzimrendszerek egyike, amelynek igen fontos szerepe van a fertőzések elleni védekezésben [12]. A hősokkfehérjék komplementaktiváló hatásának eredményeképpen igen erős gyulladáskeltő fehérje fragmentumok keletkezhetnek, melyek jelentős szerepet játszhatnak egyes emberi megbetegedések, így például az érlemezsedés keletkezésében is. Irodalmilag bizonyított tény, hogy az anti-hsp60 autoantitestek vérszérum szintje független veleszületett kockázati tényező a felnőttkori atherosclerosisban [13].

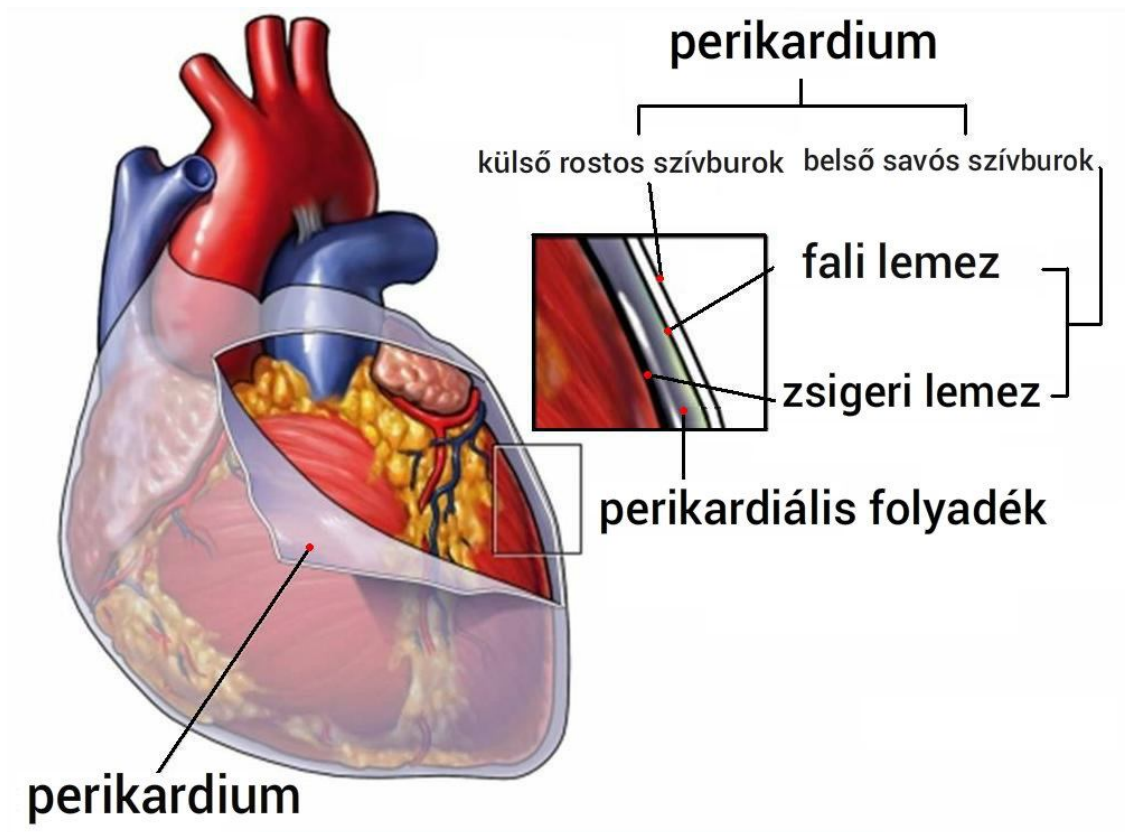
I/6. A perikardiális folyadék

A perikardiális folyadék a szívburokban található 5-10 ml mennyiségű szalmasárga folyadék, nem pusztán a plazma ultrafiltrátuma, hanem a szívizomsejtek interstíciumából származó exsudátum is. A fiziológias és különböző betegek perikardiális folyadékának összetételéről kevés információ áll rendelkezésre az irodalomban, különös tekintetben annak immunológiai aspektusaira, annak ellenére, hogy szívhez való anatómiai közelsége és a szisztémás rendszertől való elszigeteltsége révén kiváló vizsgálati anyaga a szívet érintő elváltozásoknak [7].

A szív nem csupán a neurohormonális aktiváció célja, hanem aktív endokrin és parakrin szerv. A szív szövetei sok fiziológiailag aktív anyagot termelnek, mint pl. a citokinek, növekedési faktorok és a szív hormonjai. A szekréció, és az egyes anyagok metabolizmusának pontos mechanizmusa nem teljesen tisztázott. A legtöbb anyag funkciója nem lokális, és bonyolult detektálni őket a vér szisztémás keringésében. Bekerülhetnek az intersticiális szövetekbe és átfolyhatnak a koszorúereken keresztül a kapillaris hálózatba [11, 15]. Sejtes elemeinek aránya kb. negyede a vérplazmáénak, melynek több mint 50%-át limfociták alkotják [3,14], dominánsan T-limfociták [6].

A korábbi elképzelések szerint a perikardiális folyadék fiziológias funkciója a mechanikus sűrűlódás csökkentése. Azonban egyre több adat igazolja, hogy számos biológiailag fontos anyagot tartalmaz. Ezek között megtalálhatók citokinek, növekedési faktorok és vazoaktív tulajdonságú anyagok (endothelinek, adenin nukleozidok, angiotenzinek, nátriuretikus peptidek, és prosztaglandin származékok) is [8]. Kimutatták, hogy ezen ágensek perikardiális szintjei sokszor és bizonyos szívbetegségek esetében magasabb a plazmában mért koncentrációnál, utalva arra, hogy a perikardiális folyadék endogén anyagai nagy részben szíveredetűek. Ez felveti a perikardiális tér regulátor anyagainak potenciális szerepét a szívműködés lokális szabályozásában.

Ennek megfelelően, amikor ezen anyagok fő forrása a szív, nemcsak koszorúér szinteket kell megvizsgálni, hanem a perikardiális folyadék szintekkel is kell foglalkozni, hogy lehetővé tegyünk az újonnan meghatározott anyagok potenciális szerepének tisztázását [11]. Ezért a perikardiális folyadék elemzése egy módja lehet a szív patofiziológiájának tisztázásában.



(1. ábra) A perikardiális folyadék elhelyezkedése a szívburokban és a szívburok részei

[<http://www.cardiachealth.org/> alapján, saját szerkesztés]

II. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk fő célkitűzése a természetes autoantitestek összehasonlító vizsgálata volt aorta billentyű műtött és iszkémiás szívbetegségekben szenvedők perikardiális folyadék- és vészérum mintáiban. Párhuzamosan elemeztük a perikardiális folyadék és a perifériás vérből származó szérum minták anti-hsp-60 és anti-CS autoantitest koncentrációit az alábbi szempontok szerint:

1. Anti-hsp60 és anti-CS AAT jelenlétének és koncentrációjának vizsgálata vérben és PF-ban.
2. Ezen természetes AAT-ek mennyiségének összevetése szérumban és PF-ban.
3. A hsp60 és a CS elleni AAT mérési eredmények összehasonlítása betegcsoportjainkban.

Betegcsoportok:

- aortabillentyű műtött csoport (A);
- szívkoszorúér áthidaló műtéten átesettek:
 - infarktusos csoport (I)
 - nem infarktusos csoport (N).

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III/1. Betegek

Jelen kutatásunkban 36 beteg adatait dolgoztuk fel, amelyet 2 fő csoportba soroltunk: aortabillentyű műtöttek csoportja, és az iszkémiás csoport, utóbbi csoportba szívkoszorúér műtöttek kerültek, tovább bontva infarktusos és nem infarktusos csoportra (1. táblázat). Csoportonként 12-12 beteggel.

	AORTABILLENYŰ	ISZKÉMIÁS CSOPORT	
		INFARKTUS	NEM INFARKTUS
N	12	12	12
Életkor	61,16	60,58	58,44
férfi:nő	8:4	10:2	9:3

1. táblázat: a vizsgált betegcsoportok felosztása: aortabillentyű műtöttek csoportja és iszkémiás csoport. N: elemszám

III/2. Szelekció

A betegek kiválasztása a következő kritériumok alapján történt: minden beteget kizártunk, akinek kórtörténetében az immunrendszert tartósan befolyásoló tényező szerepelt. Minden beteg góckutatáson esett át (urológiai-, nőgyógyászati-, fogászati-, fül-orr-gégészeti-, kivizsgálás, mellkasröntgen, hasi ultrahang).

Betegeink HIV- és hepatitis vírus AG negatívak.

Műtét előtti napon labor paraméterek ellenőrzése kerültek - gyulladásos paraméterek, fehérvérsejtek normál tartományban.

III/3. Mintavétel

A Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Szívgyógyászati Klinikán történt, szívburok megnyitásával járó szívműtétek során párhuzamosan PF és vér mintákat vettek, kizárólag nem kombinált, előre tervezett szívkoszorúér- vagy aortabillentyű műtétek során. Kizárólag tiszta, vérmentes PF került vizsgálatra.

Min 3 ml PF-et. + 10ml minta centrális vénás kanülből.

Mindkettő 10ml-es heparinos, rutin labordiagnostikában használt vákuumcsőbe került.

Heparin a véralvadást, koagulum kialakulását gátolja.

Centrifugálás: 2000 rpm, (fordulat/perc) 10 percig, 4 °C-on.

A szérum és PF minták felülúszóit -20°C-on tároltuk feldolgozásig.

Szérum: sejtmentes plazma, PF felülúszója.

Minden esetben törekedtünk a friss, intakt minták felhasználására a megbízható eredmények érdekében. Megjegyzendő azonban, hogy az immunglobulinok igen stabil szerkezettel rendelkeznek, így a többszöri felolvasztás ellenére is épen maradnak, tehát szükség esetén megismételhető a minták vizsgálata. A heparin nem befolyásolja az általunk alkalmazott mérési technikákat.

III/4. ELISA

A PF-szérum mintapárokban a hsp60 és CS elleni AAT koncentrációkat indirekt ELISA teszt segítségével állapítottuk meg.

Ez egy enzimhez kötött immunosorbent vizsgálat, azon a biokémiai módszeren alapszik, melyet elsősorban az immunológia használ, a jelzőenzimeket lehetséges úgy kapcsolni antitestekre vagy antigénekre, hogy a komplex mind immunológiai, mind enzimaktivitással is rendelkezzen.

A módszer előnye, hogy elkerüli a specifikus antitest biokémiai jelölését, amely antitest esetleg kis mennyiségben vagy csak nagy hígításban állhat rendelkezésre. Pontos és gyors, diagnosztika gyakran használja, összetett oldatokban is könnyen ki tudja mutatni a keresett molekulákat. Minél sötétebb a kapott szín, annál magasabb a reaktivitás.

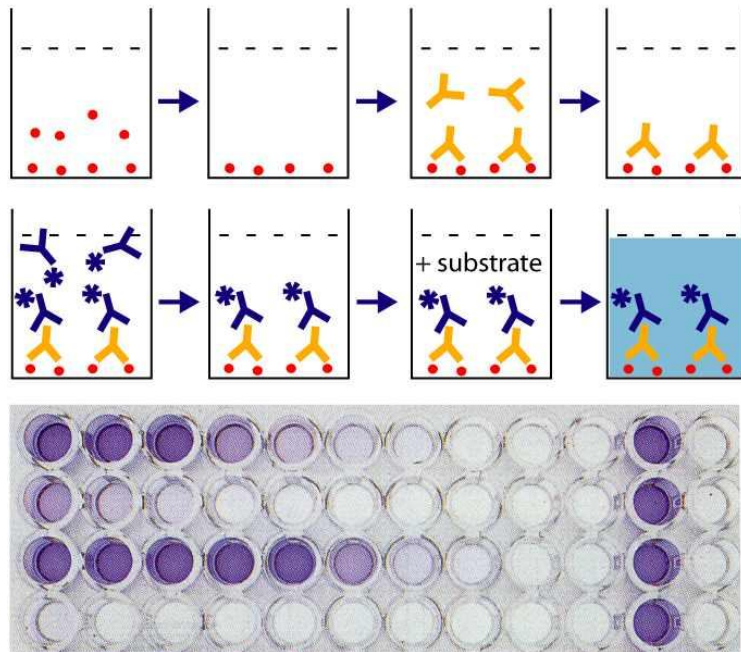
Citrát szintáz ELISA protokoll

1. Érzékenyítés: 4,5 µg/ml koncentrációjú citrát szintáz oldattal (CS 0,1 M-os, 9,6 os pH-jú bikarbonát pufferben van feloldva) 100 µl/well mennyiségű oldattal, 4 °C-on overnight inkubáljuk – 3x megmossuk a plate-et 300µl/well mennyiségű PBS mosó oldattal
2. Telítés: 0,5 %-os zselatinos telítővel 60 perc, 100 µl/well - 3x megmossuk a plate-et 300µl/well mennyiségű PBS mosó oldattal
3. Minták felvitele:

- a szérum minták 1:100, a PF minták 1:10 arányban kerülnek feloldásra 0,05%-os Tween 20 PBS pufferben (0,05% tween van PBS-ben feloldva) 100 µl/well
4. Másodlagos antitestek hozzáadása: anti-humán IgG 1:5000, anti-humán IgM 1:1000 arányban kerül feloldásra PBS 0,05% Tween 20 oldatban
 5. Előhívás-szubsztrát hozzáadása: a szubsztrát= 8 mg OPD + 10 ml ELISA szubsztrát + 10 µl H₂O₂
5 perc, fénytől védve
 6. stop: cc. H₂SO₄ 50 µl/well
 7. spektrofotométerben a koncentráció megállapítása 360 nm-en

Hsp60 ELISA protokoll

1. Érzékenyítés: 4,5 µg/ml koncentrációjú citrát szintáz oldattal (CS 0,1 M-os, 9,6 os pH-jú bikarbonát pufferben van feloldva) 100 µl/well mennyiségű oldattal, 4 °C-on overnight inkubáljuk – 3x megmossuk a plate-et 300µl/well mennyiségű PBS mosó oldattal
2. Telítés: 0,5 %-os zselatinos telítővel 60 perc, 100 µl/well - 3x megmossuk a plate-et 300µl/well mennyiségű PBS mosó oldattal
3. Minták felvitele:
a szérum minták 1:200, a PF minták 1:3 arányban kerülnek feloldásra 0,05%-os Tween 20 PBS pufferben (0,05% tween van PBS-ben feloldva) 100 µl/well
4. Másodlagos antitestek hozzáadása: anti-humán IgG 1:5000, anti-humán IgM 1:1000 arányban kerül feloldásra PBS 0,05% Tween 20 oldatban
5. Előhívás-szubsztrát hozzáadása: a szubsztrát= 8 mg OPD + 10 ml ELISA szubsztrát + 10 µl H₂O₂
5 perc, fénytől védve
6. stop: cc. H₂SO₄ 50 µl/well
7. spektrofotométerben a koncentráció megállapítása

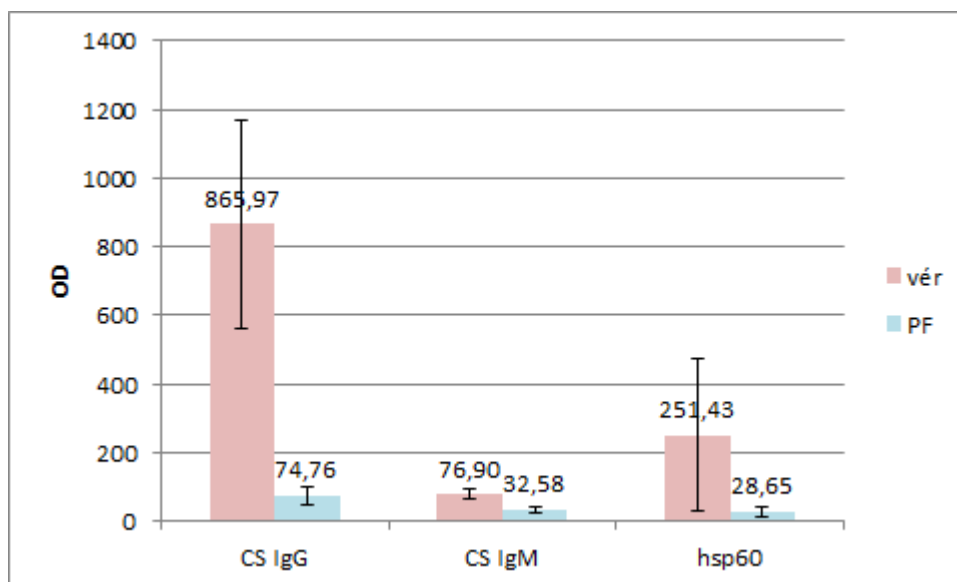


(2. ábra): ELISA plate és protokoll

[www.kenyaforensics.blogspot.in alapján]

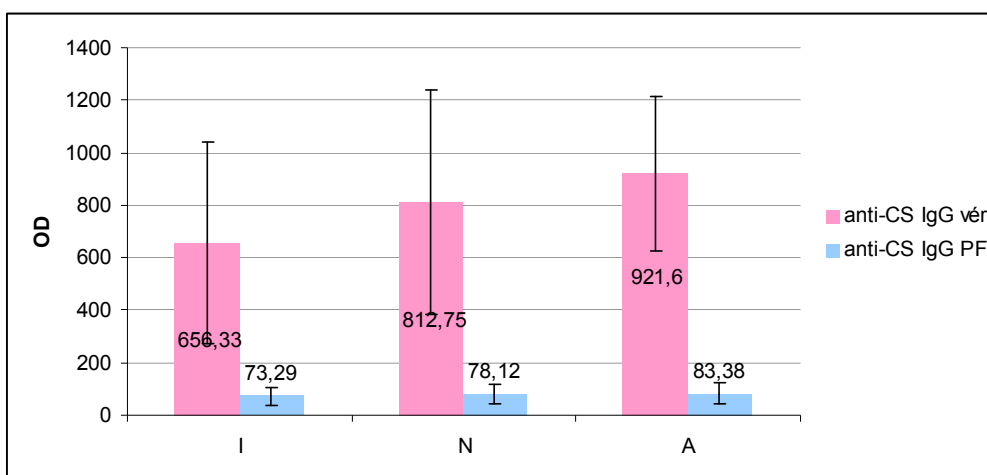
IV. EREDMÉNYEK

Elsőként mutattuk ki, hogy az általunk vizsgált természetes autoantitestek jelen vannak perikardiális folyadékban.



(3. ábra): Az általunk vizsgált AAT-ek koncentrációi az összes beteg eredményeit figyelembe véve vérben és PF-ban

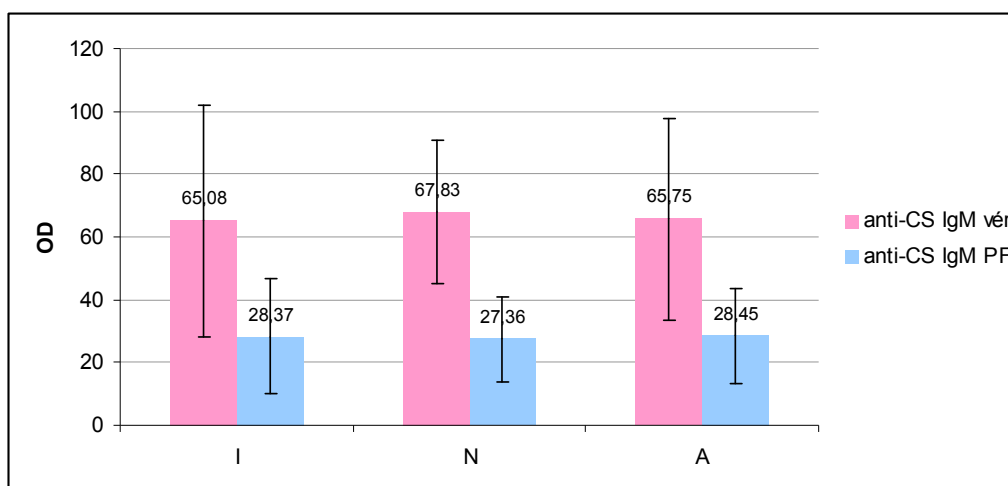
A vízszintes tengelyen az általunk mért AAT-ek átlaga látható vérben és PF-ban, az oszlopok tetején láthatóak a szórások, a függőleges tengelyen az ábrázolt számértékek az optikai denzitás átlagok. Az összes beteg adatait figyelembe véve látható (3. ábra), hogy a perikardiális folyadékban szignifikánsan alacsonyabb koncentrációban jelennek meg a kérdéses AAT-ek. Vérben és PF-ban is a CS elleni AAT-ek mennyisége éri el a legmagasabb szintet a többi vizsgált AAT-hez képest az összes beteg adatait tekintve.



(4. ábra): Az általunk vizsgált anti-CS AAT-ek koncentrációi vérben és PF összehasonlítva betegcsoportonként

A vízszintes tengelyen az IgG izotípusú CS elleni AAT-ek láthatóak betegcsoportonként vérben és PF-ban, az oszlopok tetején láthatóak a szórások, a függőleges tengelyen az ábrázolt számértékek az optikai denzitás átlagok. Látható (4.ábra), hogy az aortabillentyű műtöttek csoportjában a legnagyobb és az infarktusos csoportban a legalacsonyabb az anti-CS IgG izotípusú AAT-ek koncentrációja vérben és PF-ban is.

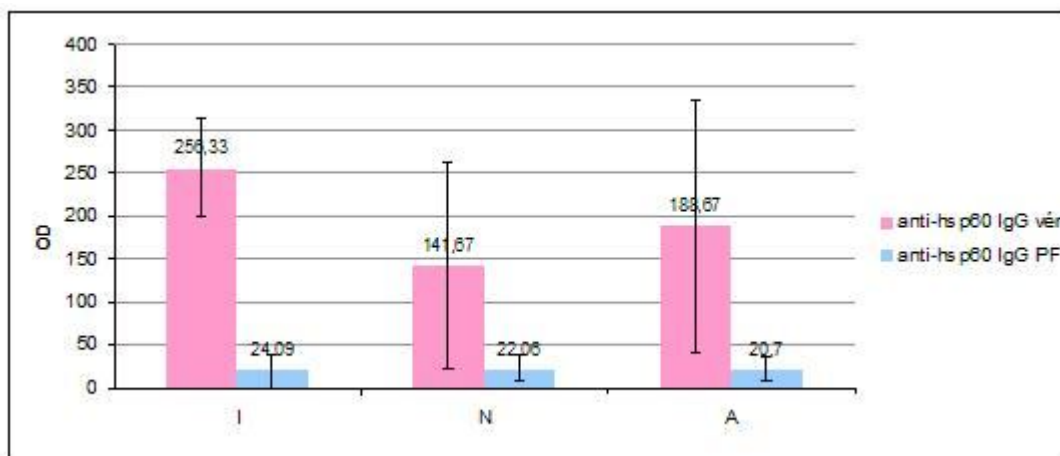
Az anti-CS IgG izotípusú AAT-ek koncentrációja magasabbnak mutatkozik a vérben, mint a perikardiális folyadékban az összes betegcsoportban. Megállapíthatjuk továbbá, hogy az infarktuson korábban átesett betegek vizsgált testfolyadékaiban mutatható ki a legkisebb mennyiségben a CS elleni IgG izotípusú AAT, míg szignifikánsabb magasabb a koncentrációja a nem infarktusos- és az aorta billentyű beteg csoportokban.



(5. ábra): A vizsgált anti-CS IgM izotípusú AAT-ek koncentrációi vérben és PF összehasonlítva betegcsoportonként

A vízszintes tengelyen az IgM izotípusú CS elleni AAT-ek láthatóak betegcsoportonként vérben és PF-ban, az oszlopok tetején láthatóak a szórások, a függőleges tengelyen az ábrázolt számértékek az optikai denzitás átlagok.

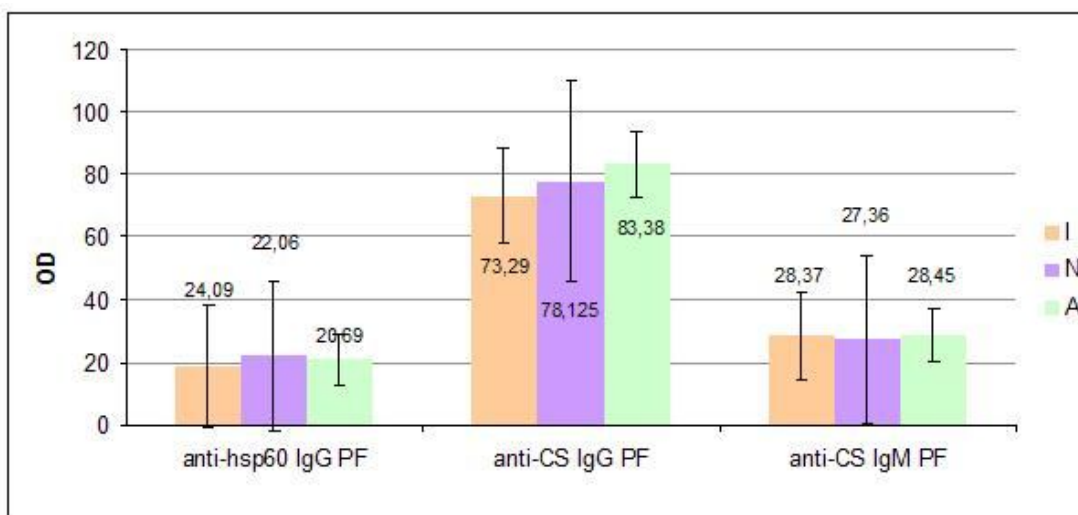
Az anti-CS IgM izotípusú AAT-ek koncentrációit összevetve a vizsgált betegcsoportokban nem mutatható ki szignifikáns különbség sem vérszérumban sem perikardiális folyadékban.



(6. ábra): A vizsgált anti-hsp60 AAT-ek koncentrációi vérben és PF összehasonlítva betegcsoportonként

A vízszintes tengelyen az anti-hsp AAT-ek láthatóak betegcsoportonként vérben és PF-ban, az oszlopok tetején láthatóak a szórások, a függőleges tengelyen az ábrázolt számértékek az optikai denzitás átlagok.

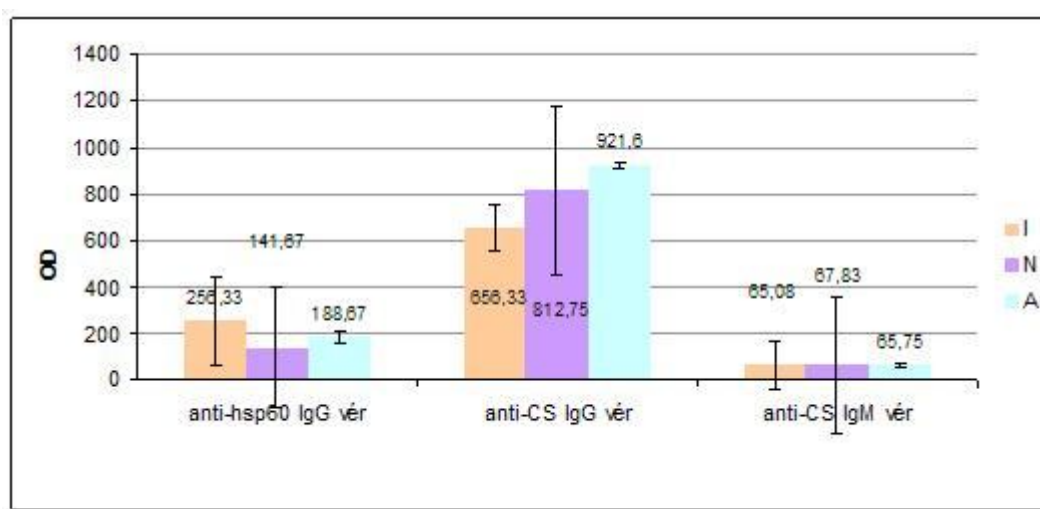
Az anti-hsp60 AAT-ek koncentrációjának értékei az infarktusos csoportban a legmagasabbak irodalmi adatokkal egybehangzóan (12,13) a vérben és a PF-ban egyaránt.



(7. ábra) AAT értékek a PF-ban a különböző betegcsoportokban (I,N,A)

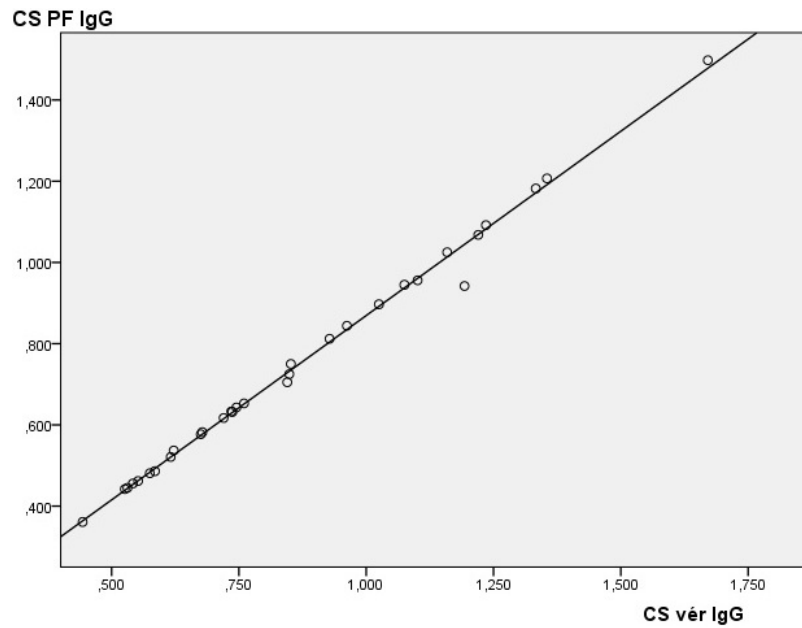
A vízszintes tengelyen az anti-hsp AAT-ek láthatóak betegcsoportonként PF-ban, az oszlopok tetején láthatóak a szórások, a számértékek az ábrázolt optikai denzitás átlagok.

A perikardiális folyadékban mért adatokat összevetve megállapíthatjuk, hogy az anti-CS IgG AAT igen magas, több mint kétszeres koncentrációban jelenik meg itt, mint a másik 2 vizsgált AAT. Kiemelendő továbbá, hogy az aorta csoportban jelenik meg a legnagyobb és szignifikánsabb magasabb koncentrációban, mint a többi csoportban. Megemlítendő továbbá az anti-hsp60 IgG AAT-ek esetében, hogy a nagy szórás értékek ellenére a nem infarktusos csoportban a legmagasabb ezen AAT koncentrációja.



(8. ábra): AAT értékek összehasonlítása vérben a különböző betegcsoportokban (I, N, A).

Perifériás vérben összevetve az adatokat anti-CS IgG és IgM AAT esetében hasonló a trend az egyes betegcsoportokat tekintve. Ellenben anti-hsp60 IgG AAT a nem-infarktusos csoport esetében éri el a legalacsonyabb koncentrációt.



(9.ábra) Vérben és PF-ban mért anti-CS IgG AAT koncentráció értékek regressziós vizsgálata
A függőleges tengelyen a PF-ban mért koncentráció értékeket, a vízszintesen a vérben mért anti-CS IgG AAT koncentrációkat ábrázoltunk egymás függvényében.

A vérben és a PF-ban mért CS elleni IgG típusú AAt-ek koncentrációja, megoszlása szoros összefüggést mutat a két különböző, általunk vizsgált térben.

V. EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE, ÖSSZEFOGLALÁS

Elsőként mutattuk ki, hogy az általunk vizsgált ellenanyagok jelen vannak a PF-ban, így szerepük lehet iszkémiás szívbetegségben. Elmondhatjuk, hogy a PF-ban a CS elleni IgG izotípusú AAT-ek vannak jelen a legnagyobb koncentrációban, ami ezen AT kiemelkedő szerepére utalhat a perikardiális térben. Feltételezhetjük fontos védő funkcióját. Ezen CS elleni IgG izotípusú AAT-ek konc-ja szoros összefüggést mutat egymással vérben és PF-ban. Vagyis dinamikai kapcsolatban vannak egymással, ami lehetővé teszi számunkra, hogy a szérumban mért mennyiségből a perikardiális tér állapotára következtethessünk, ami később esetleg a diagnosztikában jelentős szerephez juthat.

Hsp60 elleni IgG típusú AAT-ek esetében a krónikus iszkémiának kitett nem infarktusos betegcsoport esetében a legmagasabb a koncentráció a PF-ban, ellenben a vérben tapasztalt eredményekkel. Ez további érdekes kérdéseket vet fel, melyet feltétlenül tisztázi szeretnénk a jövőben. tervezzük továbbá az elemszám növelését és hsp60 esetén esetleg alcsoportok létrehozását.

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy a természetes AAT-eknek szerepe lehet az iszkémiás szívbetegségben. További kutatásaink során feltárhatunk egy esetleg predikciós faktort is hozzájárulva így a szívbetegséget komplex megértéséhez és erápiájához.

VI. FELHASZNÁLT IRODALOM

- [1] Csermely Péter: Stresszféhrék. *Vince, Budapest (2001)*
- [2] Gergely János, Erdei Anna Immunbiológia. *Medicina, Budapest (2006)*
- [3] Claudia Cappuzzell et al.: Increase of plasma IL-9 and decrease of plasma IL-5, IL-7, and IFN- γ in patients with chronic heart failure. *Journal of Translational Medicine (2011) 9, 28.*
- [4] Czömpöly Tamás et al.: Detailed analyses of antibodies recognizing mitochondrial antigens suggest similar or identical mechanism for production of natural antibodies and natural autoantibodies. *Autoimmunity Reviews. (2008) 7(6), 463-7.*
- [5] Czömpöly Tamás et al.: A possible new bridge between innate and adaptive immunity: Are the anti-mitochondrial citrate synthase autoantibodies components of the natural antibody network? *Molecular Immunology (2006) 43(11), 1761-8.*
- [6] Dagmar Riemann et al.: Immunophenotype of Lymphocytes in Pericardial Fluid from Patients with Different Forms of Heart Disease. *International Archives of Allergy and Immunology (1994) 104, 48-56.*
- [7] Gibson AT, Segal MB.: A study of the composition of pericardial fluid, with special reference to the probable mechanism of fluid formation. *The Journal of Physiology (1978) 277, 367-77.*
- [8] Jer-Young Liou et al.: Pericardial fluid and serum levels of vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with or without coronary artery *Disease J Formos Med Assoc. (2006) 105(5), 377-83.*
- [9] Jules A. Hoffmann et al. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science (1999) 284, 1313-1318.*
- [10] Laskarin Gordana et al.: Can we assess an acute myocardial infarction in patients with acute coronary syndrome according to diagnostic accuracy of heat shock proteins? *Medical Hypotheses (2012) 79(5), 592-4.*
- [11] Masatoshi Fujita et al.: Pericardial fluid as a new material for clinical heart research *International Journal of Cardiology (2001) 77, 113–118.*
- [12] Prohászka Zoltán et al.: Heat-shock protein 70 is a potent activator of the human complement system. *Cell Stress Chaperones (2002) 7(1), 17–22.*
- [13] Prohászka Zoltán et al.: Antibodies against human Hsp60 and mycobacterial Hsp65 differ in their antigen specificity and complement activating ability. *International Immunology. (1999) 11, 1363-1370.*

- [14] Shomron Ben-Horin et al.: The composition of normal pericardial fluid and its implications for diagnosing pericardial effusions
The American Journal and of Medicine (2005) 118, 636-640.
- [15] Staffan Svenmarker, Karl Gunnar Engström: The inflammatory response to recycled pericardial suction blood and the influence of cell-saving. *Scandinavian Cardiovascular Journal* 37(3), (2003) 158-64.
- [16] Vincenzo Cerundolo et al.: Synthetic iNKT cell-agonists as vaccine adjuvants —finding the balance *Current Opinion in immunology* 22(3), (2010) 417-24.

VII. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AAT	autoantitestek
APC	antigen presenting cell, antigén prezentáló sejt
CS	citrát szintáz
DM	diabetes mellitus, cukorbetegség
ELISA	enzyme-linked-immunosorbent-assay
hsp	heat shock proteins, hősokkfehérjék
iNKT sejtek	invariant natural killer T cells, invariáns természetes ölő T sejtek
MAIT sejtek	mucosal-associated invariant T cells, mukóza asszociált invariáns T sejtek
MHC	major histocompatibility complex, fő hisztokompatibilitási komplex
nAAb	natural autoantibody, természetes autoantitest
PF	pericardial fluid, perikardiális folyadék
PRR	pattern recognition receptor, mintázat felismerő receptor
OD	optikai denzitás

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kutatásainkat Pécsi Orvostudományi Egyetem Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben végeztük.

Szeretnék hálás köszönetet mondani témavezetőimnek Prof. Dr. Berki Tímeának és Dr. Simon Diánának. A bátorításaik, kritikáik, véleményük és a szakmai tanácsaik felbecsülhetetlenek.

Köszönetet kell mondanom a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Szívgyógyászati Klinikának a vizsgálati minták biztosításáért.

Dr. Prohászka Zoltán és csapatának a hsp60 mérési adatok biztosításáért.

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet minden kedves dolgozójának.

Köszönöm családomnak, akik mindig támogatnak és bátorítanak.

Köszönettel tartozom mindenkinek, akik lehetővé tették számomra, hogy ez a munka megszülethessen.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Pap Ramóna a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- kórelőzmény vizsgálat
- betegszelekció
- minták centrifugálása, előkészítése
- feldolgozás, indirekt ELISA tesztek
- kiértékelés

végeztem el.

Pap Ramóna

.....
aláírás

Pécs, 2013. január 09.