

Synovialis folyadékból nyert extracellularis vesiculák proteomja és azok lehetséges funkciója befertőződött ízületi protézisekben

Sallai Imre dr.¹ ■ Turiák Lilla dr.² ■ Sugár Simon dr.²
Drahos László dr.² ■ Skaliczki Gábor dr.¹

¹Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Ortopédiai Klinika, Budapest

²Természettudományi Kutatóközpont, MS Proteomika Kutatócsoport, Budapest

Bevezetés: A periprotetikus infekciók ellátása jelentős kihívás elé állítja az operáló orvost, mind diagnosztikai, mind terápiás tekintetben. Az utóbbi években a mozgásszervi kutatások során egyre növekvő figyelmet kaptak az extracellularis vesiculák. Az extracellularis vesiculák által szállított fehérjék tömegspektrometrián alapuló azonosítása fontos lépés, mely segíthet megérteni a védekezési folyamatban betöltött biológiai funkcióikat.

Célkitűzés: Vizsgálatunk célja volt az akut és a krónikus fertőzött mintákból izolált extracellularis vesiculák fehérjetartalmának megismerése, azonosságok és különbségek keresése – az „egy legjobb biomarker” megtalálása helyett a lehető legtöbb, detektálható mennyiségben jelen lévő extracellularis vesiculába zárt fehérje vizsgálata és biológiai folyamatokba illesztése.

Módszer: Prospektív, monocentrikus vizsgálatot végeztünk, a beválasztási kritériumok a 2018-as MSIS-kritériumokon alapultak. A vizsgálatba 13 (n = 13) beteget vontunk be, minden beteg periprotetikus infekció miatt került műtétre. 6 (n = 6) betegnél akut purulens (akut csoport) folyamatot, míg 7 (n = 7) betegnél 'low-grade' infekciót (krónikus csoport) igazoltunk. Az extracellularis vesiculák izolálása minden esetben a protézist körülvevő synovialis folyadékból történt. A tömegspektrometriai vizsgálattal azonosított fehérjék funkcionális alapú klaszterezésére a STRING, KEGG, Gene Ontology adatbázisokat használtuk. A végleges vizualizáció Cytoscape 3.9.1. szoftverrel történt.

Eredmények: Az extracellularis vesiculák feltárása után 222 db fehérjét azonosítottunk, melyek vagy az akut, vagy a krónikus minták valamelyikének több mint felében fordultak elő. Csak az akut minták több mint felében 50 db fehérjét; csak a krónikus minták több mint felében 33 db fehérjét; egyszerre mindkét csoport több mint felében 86 db fehérjét azonosítottunk. Ezek alapján készültek a funkcionális klaszterek.

Megbeszélés: A protézisfertőzések diagnosztikájában régóta megvan a törekvés, hogy megtalálják az „egy legjobb biomarkert”, amely biztosan különbséget tud tenni fertőzött és nem fertőzött protézislazulás között.

Következtetés: Vizsgálatunk célja nem egy újabb biomarker kiválasztása volt, hanem az extracellularis vesiculákban szállított fehérjék biológiai folyamatokban betöltött szerepének ábrázolása, leírása, amellyel jobban betekinthetünk a periprotetikus infekció során zajló folyamatokba.

Orv Hetil. 2024; 165(3): 98–109.

Kulcsszavak: periprotetikus infekció, extracellularis vesicula

Proteome of extracellular vesicles from synovial fluid and their possible function in periprosthetic infections

Introduction: The management of periprosthetic infections is a major challenge for the operating surgeon, both diagnostically and therapeutically. In recent years, extracellular vesicles have received increasing attention in musculoskeletal research. Mass spectrometry-based identification of proteins transported by extracellular vesicles is an important step towards understanding their biological functions in the defence process.

Objective: The aim of our study was to investigate the protein content of extracellular vesicles isolated from acute and chronic infected samples, to search for identities and differences – instead of finding “the single best biomarker”, to investigate the proteins encapsulated in extracellular vesicles present in as many detectable amounts as possible and to integrate them into biological processes.

Method: Prospective monocentric study was performed, inclusion criteria were based on the 2018 MSIS criteria. 13 (n = 13) patients were included in the study, all patients underwent surgery for periprosthetic infection. 6 (n = 6)

patients were confirmed to have an acute purulent (acute group) process, while 7 (n = 7) patients were confirmed to have a low-grade infection (chronic group). Extracellular vesicles were isolated from the synovial fluid surrounding the prosthesis in all cases. STRING, KEGG, Gene Ontology databases were used for function-based clustering of proteins identified by mass spectrometry analysis. Final visualization was performed using Cytoscape 3.9.1 software. **Results:** 222 proteins were identified after extracellular vesicles were detected and were present in more than half of the acute or chronic samples. In more than half of the acute samples alone, 50 proteins were identified; in more than half of the chronic samples alone, 33 proteins were identified; in more than half of both groups simultaneously, 86 proteins were identified. These were used to construct functional clusters.

Discussion: There has been a long-standing effort in the diagnostics of prosthetic infection to find “the single best biomarker” that can distinguish with certainty between infected and non-infected prosthetic loosening.

Conclusion: The aim of our study was not to select a new biomarker, but to describe the role of proteins transported in extracellular vesicles in biological processes, which will give us a better insight into the processes involved in periprosthetic infection.

Keywords: periprosthetic joint infection, extracellular vesicle

Sallai I, Turiák L, Sugár S, Drahos L, Skaliczki G. [Proteome of extracellular vesicles from synovial fluid and their possible function in periprosthetic infections]. *Orv Hetil.* 2024; 165(3): 98–109.

(Beérkezett: 2023. július 12.; elfogadva: 2023. november 1.)

Rövidítések

ABP = (annexin-binding buffer) annexinkötő puffer; ACD-A = (anticoagulant citrate dextrose solution, solution A) savas citrát-dextróz antikoaguláns oldat; ADP = (adenosine diphosphate) adenosin-difoszfát; ATP = (adenosine triphosphate) adenosin-trifoszfát; C = (complement) komplement; CFB = (complement factor B) komplementfaktor-B; CFH = (complement factor H) komplementfaktor-H; CRP = C-reaktív protein; DAMP = (damage-associated molecular pattern) károsodáshoz kapcsolódó molekuláris minta; DNS = dezoxiribonukleinsav; ESCRT = (endosomal sorting complexes required for transport) a szállításhoz szükséges endoszomális szortírozó komplexek; HLA-DRA = humán leukocyaantigén, DR-alfa; HPLC-MS = (high-performance liquid chromatography-mass spectrometry) nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia-tömegspektrometria; HSP90 = hő sokkprotein-90; KEGG = (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Gének és genomok kiotói enciklopédiája; LC-MS = (liquid chromatography-mass spectrometry) folyadékkromatográfia-tömegspektrometria; MAC = (membrane attack complex) membránkárosító komplex; MHC = (major histocompatibility complex) fő hisztokompatibilitási komplex; miRNS = mikro-ribonukleinsav; MISEV = (minimal information for studies of extracellular vesicles) minimális információ az extracellularis vesiculák tanulmányozásához; mRNS = (messenger) hírvivő ribonukleinsav; PBS = (phosphate-buffered saline) foszfát-pufferelt sóoldat; PKM = (pyruvate kinase, muscle) piruvát-kináz, izom; RCF = (relative centrifugal force) relatív centrifugális erő; SE TUKEB = Semmelweis Egyetem, Tudományos és Kutatásügyi Bizottság

A mozgásszervi sebészet egyik kiemelkedő sikerű beavatkozása a nagyízületi endoprotézis-beültetés. Jelentős fájdalomcsökkenést, az önellátási képesség fokozódását, ebből adódóan életminőség-javulást eredményez. A beültetett térd- és csípőprotézisek revíziós műtéteinek

egyik vezető indoka a protézis infekciója [1, 2]. A sikertelen térdprotézisek 25%-a, a sikertelen csípőprotézisek 15%-a periprotetikus infekcióra vezethető vissza [3, 4]. Ennek ellátása jelentős kihívás elé állítja az operáló orvost, mind diagnosztikai, mind terápiás tekintetben [5]. Ezenfelül jelentős gazdasági terhet jelent az egészségügyi ellátórendszernek az ismételt műtét(ek), az elnyújtott antibiotikus kezelés, az elhúzódó kórházi tartózkodás és az évente növekvő számú primer protézisbeültetés kapcsán növekvő betegszám miatt [6, 7].

A műtét után visszamaradó panaszok, fájdalmak esetén a legfontosabb elkülöníteni, hogy a panaszok fertőzésre vagy más, mechanikai indokra vezethetők-e vissza. Jelenleg a kivizsgálás része (a képalkotó és fizikális vizsgálaton túl) a vérszérum [8] és a synovialis folyadék [9] széles körű, kombinált biomarker-vizsgálata.

Az utóbbi években egyre több arra utaló bizonyíték került napvilágra, hogy a periprotetikus fertőzésben szenvedő betegek ízületében lokálisan primitív, de specifikus veleszületett immunválasz indul el a kiváltó kórokozóval szemben, mely felelős a szisztémás immunválasz és a védekező útvonalak kaszkádjainak elindításáért [10–12]. Ez ’microarray’ technikával génexpressziós szinten [10], valamint proteomikai eszközökkel a synovialis folyadék fehérjéinek elemzésével is megfigyelhető volt [13].

Az eddigi kutatások a legtöbb esetben az egyetlen, legpontosabb és legspecifikusabb marker kutatására koncentráltak, közülük egy-egy biomarker be is került a diagnosztikai protokollba (alfa-defenzin, leukocya-észteráz, szérum-CRP, -D-dimer stb.). Kevés kutatás fókuszált azonban a teljes védekező útvonal feltérképezésére és annak végigkövetésére.

Az utóbbi években a mozgásszervi kutatások során egyre növekvő figyelmet kapott az extracellularis vesicu-

lák [14] diagnosztikus, valamint terápiás felhasználási lehetősége [15]. Biogenezisük és méretük alapján többféle vesiculatípust különböztetünk meg. Eleinte biogenezisük alapján három csoport különült el: a legkisebb, 150 nm-nél kisebb mérettartományba tartoznak az exosomák, melyek az intracelluláris térben multivesicularis testekben találhatóak, és exocytosisal kerülnek az extracelluláris térbe [16]. A 150–1000 nm közötti méretű, a plazmamembránról lefüződésel képződő vesiculákat extracelluláris vesiculáknak nevezzük [17]. A harmadik csoportot a sejtek apoptózisa során keletkező, 1000–5000 nm mérettartományba eső vesiculák képezik [18]. Később, ahogy alakult a nómenklatúra, az elnevezésük is tisztult: méretük alapján kis, közepes és nagy méretű extracelluláris vesiculákat különböztetünk meg a 2018. évi MISEV-ajánlás szerint [19]. Az extracelluláris vesiculák kettős foszfolipidmembránnal körülvett partikulumok, melyek ha a plazmamembránról fűződnek le, öröklik a kiindulási sejtmembrán tulajdonságait (sejtfelszíni markereit), belsejükben pedig fehérjéket (főként enzimeket és ESCRT-komponenseket), valamint nukleinsavakat (például mRNS, miRNS) szállítanak [20, 21].

A biológiai folyamatokra specifikus extracelluláris vesiculák sejtfelszíni tulajdonságaival kapcsolatos információk és az általuk szállított fehérjék listája folyamatosan bővül, s ebből funkciójukra is egyre pontosabban tudunk következtetni [22]. Megjelenésüket és membrántulajdonságaikat nagyízületi protézisek körül kialakult infekcióban már vizsgálták [23], az általuk szállított fehérjékről azonban kevés információ áll rendelkezésünkre. A synovialis folyadékban lévő fehérvérsejtek (neutrophil granulocyták) által felszabadított extracelluláris vesiculákban található fehérjék tömegspektrometrián alapuló azonosítása fontos lépés, mely segíthet megérteni a védekezési folyamatban betöltött biológiai funkcióikat.

Jelen közleményünkben bemutatjuk kutatócsoportunk munkáját, az igazoltan fertőzött (akut és krónikus fertőzés) protézis körüli synovialis folyadékból izolált extracelluláris vesiculák által szállított anyagon elvégzett, kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriai vizsgálatunk eredményeit. Az extracelluláris vesiculák feltárása után azonosított fehérjeprofil klaszterezésére, leíró jellemzésére, génontológia szerinti csoportosítására, azok biológiai funkciójának, valamint a későbbiekben biomarkerként való potenciális felhasználási lehetőségének feltérképezésére is törekedtünk. Vizsgálatunk során arra voltunk kíváncsiak, hogy az akut és a krónikus fertőzött mintákból izolált extracelluláris vesiculák fehérjetartalma milyen azonosságokat és milyen különbségeket mutat. Az „egy legjobb biomarker” megtalálása helyett a lehető legtöbb, detektálható mennyiségben jelen lévő extracelluláris vesiculába zárt fehérjét vizsgáltuk, és azokat biológiai folyamatokba illesztettük. A jelen közlemény alapján információt kapunk a periprotetikus infekció diagnosztikájában felmerülő extracelluláris vesiculákba zárt biomarkerek listájáról.

Módszer

Prospektív, monocentrikus vizsgálatunkat a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikáján végeztük 2016 és 2020 között. A vizsgálat a Helsinki Deklaráció elveit követve, a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével (engedélyszám: SE TUKEB: 4/2015) zajlott. Minden vizsgálatba bevont beteg a betegtájékoztató elolvasása után beleegyező nyilatkozatot töltött ki. A minták gyűjtése a 2018. évi MISEV-kritériumrendszer szerint történt; periprotetikus fertőzés diagnózisának felállításakor a 2018. évi Musculoskeletal Infection Society and International Consensus Meeting során megfogalmazott elveket követtük. A betegnél major és minor kritérium alapján történt a diagnózis felállítása [24]. Akut fertőzésnek minősült az, amikor a tünetek megjelenése és az ellátás között 30 napnál nem telt el több idő. Krónikus fertőzésnek számított az az eset, amikor a panaszok és az ellátás között 30 napnál több idő telt el.

A vizsgálatba 13 (n = 13) beteget vontunk be, akik periprotetikus infekció miatt műtetre kerültek. Közülük 6 (n = 6) betegnél akut purulens (akut csoport) folyamatot, míg 7 (n = 7) betegnél 'low-grade' infekciót (krónikus csoport) igazoltunk a fenti kritériumrendszer szerint. Az akut csoportba 6 nőbeteget (átlagéletkoruk 72,3 ± 5,9 év), míg a krónikus csoportba 5 férfi és 2 nőbeteget (átlagéletkoruk 75,3 ± 12,5 év) vontunk be. Az akut csoportban 2 csípő- és 4 térdprotézis, míg a krónikus csoportban 5 csípő- és 2 térdprotézis vizsgálata és kezelése történt. A mintavétel előtt a betegek nem kaptak antibiotikus kezelést. Az akut mintákból mikrobiológiai vizsgálat során két alkalommal meticillinérzékeny *Staphylococcus aureus* és egy-egy alkalommal *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Massilia varians*, *Staphylococcus hominis* volt izolálható. A krónikus mintákból két esetben meticillinérzékeny *Staphylococcus epidermidis* és egy-egy esetben *Escherichia coli*, *Pantoea* sp., *Staphylococcus warneri*, *Streptococcus agalactiae* volt izolálható, egy eset pedig tenyésztésnegatív volt.

Az extracelluláris vesiculák izolálása minden esetben a protézist körülvevő synovialis folyadékból történt. A revíziós műtét feltárása során az ízületi tok kipreparálását követően, de még annak megnyitása előtt 18 gauge méretű tűvel történt a mintavétel. Az extracelluláris vesiculák izolálása munkacsoportunk által a fertőzött és aszeptikus mintákon is használható protokoll szerint történt. Közvetlenül az aspiráció után az ízületi folyadékot ACD-A laboratóriumi mintagyűjtő csőbe helyeztük. A mintát 15 percig centrifugáltuk (BOECO Centrifuge C-28A 2500 RCF segítségével; Wuppertal, Németország) a makroszkopikus elemek leülepedése érdekében, majd a felülszót vékony (18-as) tűvel leszívtuk a további elemzéshez. Az erősen viszkózus mintát 1500 U/ml hialuronidáz enzimmel (Merck, Hyaluronidase from sheep testes, type II, liofilizált por, ≥300 egység/mg; Darmstadt, Németország) emésztettük 30 percig szoba-

hőmérsékleten. Ezt követően a mintát kétszeresére hígítottuk PBS-sel (0,2 µm-es fecskendőszűrővel előszűrtük Merck Puradisc fecskendőszűrővel), majd 8 percig 2500 g-n centrifugáltuk. Ezt követően két különböző méretű fecskendőszűrővel végeztük a szűrést, először egy 1,2 µm-es, majd egy 0,8 µm-es szűrővel (Merck Puradisc fecskendőszűrő). Különös gondot fordítottunk arra, hogy kizárólag gravitációs szűrést alkalmazzunk, mivel bármilyen extra nyomás károsíthatja volna a célvesiculáinkat. A szűrt mintákból az extracelluláris vesiculákat 12 500 g-n 60 percig szobahőmérsékleten pelletáltuk. A felülúszót vékony tűvel (18 gauge) eltávolítottuk, a pelletet 150 µl annexinkötő pufferben (ABP) újra szuszpendáltuk [25]. Az izolált extracelluláris vesiculák tárolása felhasználásig –30 °C-on történt.

Az extracelluláris vesiculák fehérjetartalmát egymást követő fagyasztás-olvasztás ciklusok alkalmazásával nyertük ki [26]. Tíz µg fehérjének megfelelő mintamennyiséget emésztettünk oldatban tripszin enzim segítségével [27]. Az enzim alkalmazása előtt a mintákat redukáltuk, majd a ciszteinhidak visszaalakulásának megelőzése céljából alkiláltuk jódcetamid reagenssel. Az így kapott peptideket szilárd fázisú extrakció segítségével sómentesítettük, majd 500 ng emésztett anyagot injektáltunk a HPLC–MS-rendszerbe []. A nyers mérési adatokat a Compass DataAnalysis szoftverrel (Bruker, Bréma, Németország) dolgoztuk fel. A fehérjék azonosítását és jelölésmentes mennyiségi meghatározását a MaxQuant szoftverrel (1.6.17.0 verzió) végeztük egy szűkített fehérje-adatbázison. A szűkített adatbázist a mintákban található fehérjék Byonic szoftverrel (v3.6.0, Protein Metrics Inc, San Carlos, CA, USA) történő azonosítását követően készítettük. A Byonic-keresés során humánadatbázist és a következő keresési feltételeket alkalmaztuk: 20 ppm prekursorion tömegtolerancia, 40 ppm fragmension tömegtolerancia, hasítási hely lizin és arginin aminosavak C-terminálisán, maximum 2 kihagyott hasítási hely peptidenként és 1% hamis találati arány. A peptideken a következő módosulásokat engedjük meg: karbamidometil /+57.021464 @ C | fix módosulásként, míg oxidáció /+15.994915 @ M | és Glu->pyro-Glu/-18.010565 @ NTerm E | variábilis módosulásként.

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

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

A STRING adatbázis által azonosított interakciók a következő értékekkel jellemezhetők: a fehérjék száma az adott, ismert tagszámú hálózatban (count in network, például 10/100), amelyben az első szám a mintánkban azonosított fehérjék számát, a másik az adott hálózathoz az adatbázisban hozzárendelt összes fehérje számát jelenti. A (Strength) dúsulás mértéke a tízes alapú logaritmus az azonosított és az adatbázisban már ismert fehérjeszámok hányadosának. Az úgynevezett hamis találati arány (false discovery rate) azt mutatja meg, hogy mekkora eséllyel jelenik meg az adott interakció véletlenszerűen kiválasztott fehérjék esetén. Továbbá feltüntetjük azt is, hogy a mintákból azonosított fehérjék hány százaléka (%) vesz részt az adott interakcióban.

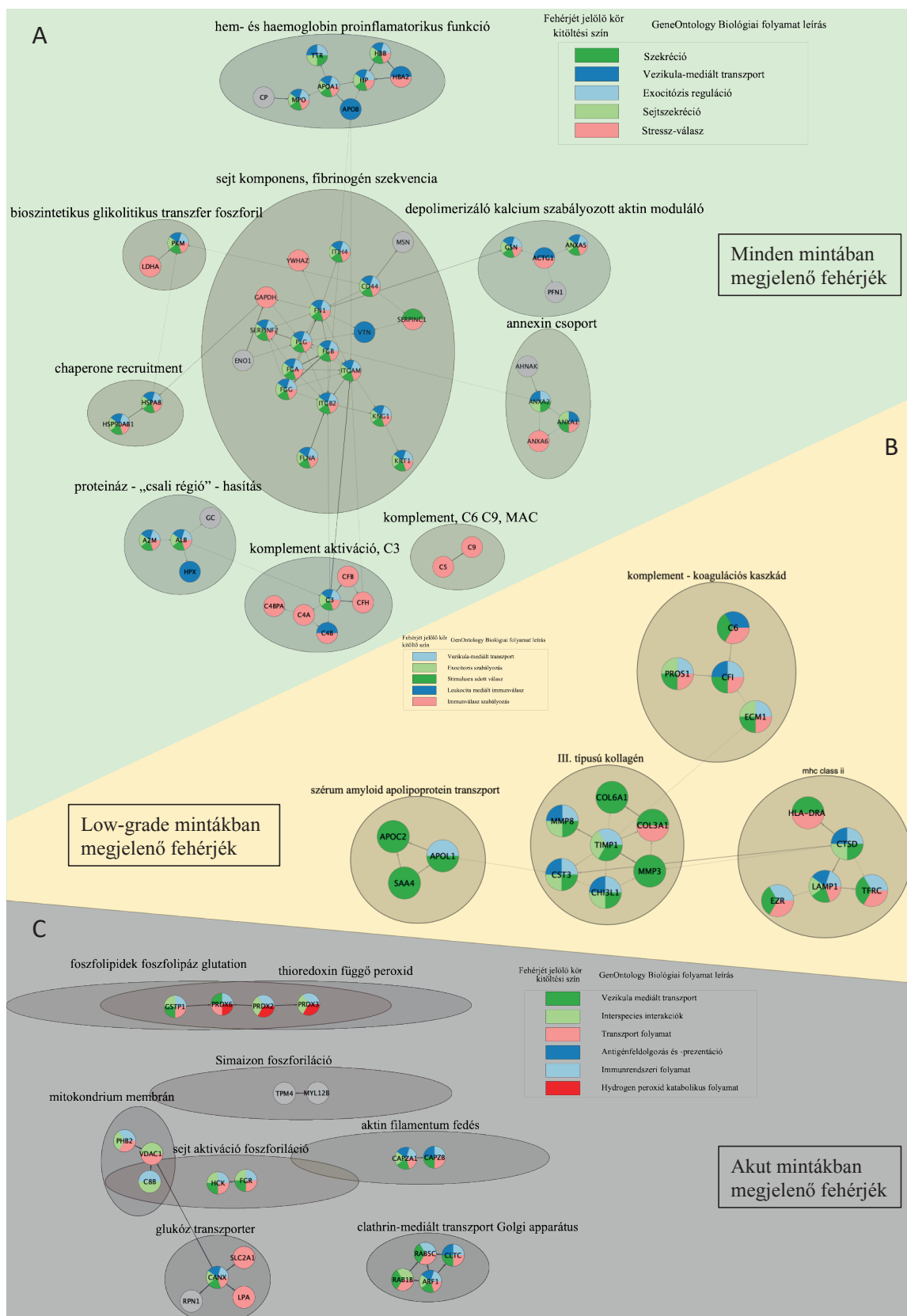
Miután a fehérjéket funkcionális csoportokba soroltuk, fontos ezeknek a csoportoknak az információval való annotálása. A fehérjék annotálása során funkcionális címkékkel látjuk el őket, ami kulcsfontosságú a fehérjék biológiai szerepének megértéséhez. A funkcionális alapú annotáció során egy fehérje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

Az általunk extracelluláris vesiculákból izolált fehérjéket korábbi közleményből ismert synovialisfolyadék-mintákból LC–MS-módszerrel azonosított, szabadon (nem extracelluláris vesiculákban) lévő fehérjék listájához [29], valamint a Vesiclepedia adatbázisból [30, 31] ismert, extracelluláris vesicula vizsgálatok során a leggyakrabban izolált (TOP100) fehérjékhez hasonlítottuk. Megnéztük az egyezéseket és az eltéréseket. A további statisztikai ábrázolás és számítás GraphPad, Perseus (1.6.15.0) és FunRich (3.1.4) szoftverrel történt. Kétféle mintás *t*-tesztet végeztünk $p < 0,05$ szignifikanciaszint mellett.

Eredmények

Az eredményeket 2 táblázatban összegeztük, melyeket készséggel az érdeklődők rendelkezésére bocsátunk.

Azonosított fehérjéinket a következő csoportokra osztottuk: „akut” – csak az akut mintáknak legalább a felében, de a krónikus mintáknak kevesebb mint a felében azonosított (50 db fehérje); „krónikus” – csak a krónikus mintáknak legalább a felében, de az akut mintáknak kevesebb mint a felében azonosított (33 db fehérje); „mind” – minden akut és minden krónikus mintában, azaz az összes 13 mintában azonosítható volt (86 db fehérje) (1. táblázat).



1. ábra

A tömegspektrometriai mérés során azonosított fehérjék klaszter szerinti ábrázolása. Az ábrázolás során három csoportot különítettünk el: a „minden mintában”, a „low-grade mintákban”, valamint az „akut mintákban” jellemzően megjelenő fehérjéket. A három csoportban az azonosított fehérjéket különböző színű és méretű körökkel jelölt klaszterekbe csoportosítottuk, valamint az azokban ábrázolt fehérjéket különböző színekkel jelöltük annak alapján, hogy a Gene Ontology leírása szerint melyik biológiai folyamatban vesz részt

MAC = membránkárosító komplex

Minden akut és krónikus mintában azonosított fehérjét (sorok) és a felsorolt biológiai folyamatokat/jelátviteli utakat (oszlopok) „+” jellel jelöltünk, így látható, hogy melyik fehérje melyik biológiai folyamatban/jelátviteli útban vesz részt.

Külön csoportosítottuk azokat a fehérjéket is, amelyeket mind az akut, mind a krónikus mintáknak több mint a felében azonosítottunk (222 db fehérje). A STRING adatbázis által azonosított interakciók értékeit a 2. táblázat mutatja be.

Itt látható az összes mintában, a jellemzően az akut és a krónikus mintákban megjelenő fehérjék száma az adott ismert számú hálózatban (count in network), a dúsulás mértéke, a hamis találati arány (false discovery rate), továbbá az, hogy a mintáinkból azonosított fehérjék hány százaléka (%) vesz részt az adott folyamatban.

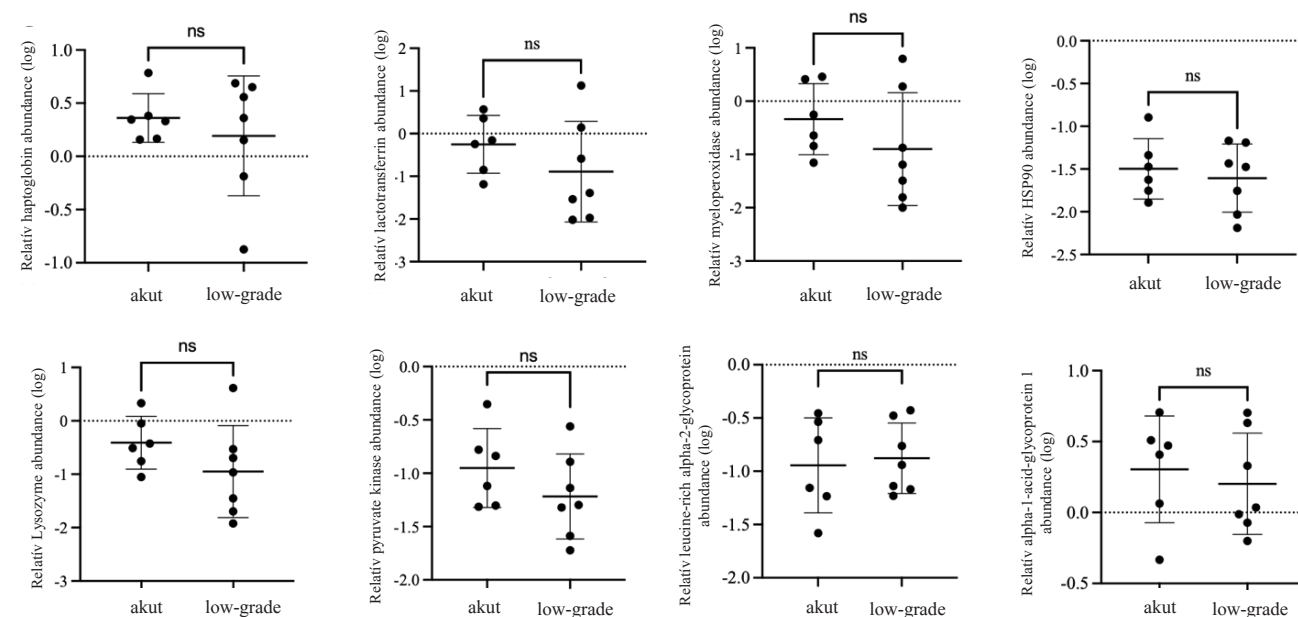
Az akut és a krónikus fertőzött mintákból izolált extracelluláris vesiculák fehérjéi közti azonosságok

Az extracelluláris vesiculák feltárása után a minták vizsgálata során 222 olyan fehérjét azonosítottunk, mely az akut és a krónikus csoportban legalább a minták felében megtalálható volt. Ezeket számos szempont szerint megvizsgáltuk. Először ezek közül azokat a fehérjéket elemeztük, amelyek az összes 13 vizsgált mintában detektálható mennyiségben jelen voltak. Ez alapján a mindkét csoportban (akut és krónikus fertőzés) azonosított fehérjék száma 86 db volt (1. ábra). Az 1/A ábrán nyilak mutatják a minden mintában azonosított fehérjék közti interakciókat, illetve látható az ezek alapján történő klaszterekbe sorolásuk. Az általunk alkalmazott beállítással kilenc klaszter került megkülönböztetésre. Ezek közül fontos kiemelni a hem- és hemoglobin proinflammatorikus funkcióval bíró csoportot, valamint a komplementkaskád két csoportját. Az ábrán színekkel jelöltük azokat a biológiai folyamatokat, amelyekben az azonosított fehérjék részt vesznek. Mintáinkban 20 db komplementkaskád-elemet azonosítottunk, melyek közül fontos kiemelni a CFH, CFB, C3, C5, C9, C4a és C4b fehérjéket: ezek a klasszikus és az alternatív komplementút aktivációjában vesznek részt.

A klasztertől függetlenül minden mintában azonosított, a *neutrophil degranuláció* és a *vesiculamediólt transzport* biológiai folyamatokra közösen jellemző fehérjék a következők voltak: haptoglobin, HSP90-béta, leucingazdag alfa-2-glikoprotein, laktotranszferrin, lizozim-C, mieloperoxidáz, alfa-1-savas glikoprotein-1, alfa-1-savas glikoprotein-2, piruvátkináz PKM, alfa-1-antitripszin, melyek esetében az akut és a 'low-grade' minták között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget (2. ábra). A felsorolt fehérjék relatív gyakorisága az akut és a krónikus fertőzésből származó mintákban nem mutatott szignifikáns eltérést ($p > 0,05$; ns).

Az akut és a krónikus fertőzött mintákból izolált extracelluláris vesiculák fehérjéi közti különbségek

Következő lépésként megnéztük, hogy melyek azok a fehérjék, amelyek vagy csak a krónikus, vagy csak az akut mintákban kerültek azonosításra. Ebben az esetben csak azokkal a proteinnel foglalkoztunk, amelyek az egyik csoportban legalább a minták felében detektálható mennyiségben megjelentek, és a másik csoportban keve-



2. ábra | A *vesiculamediólt transzportfolyamatra* és *neutrophil degranulációs folyamatra* jellemző fehérjék, melyek minden mintában azonosításra kerültek. Az azonosított fehérjék mennyisége tízes alapú logaritmusának ábrázolása történt. A felsorolt fehérjék esetében nem találtunk szignifikáns különbséget az akut és a krónikus fertőzött minták között

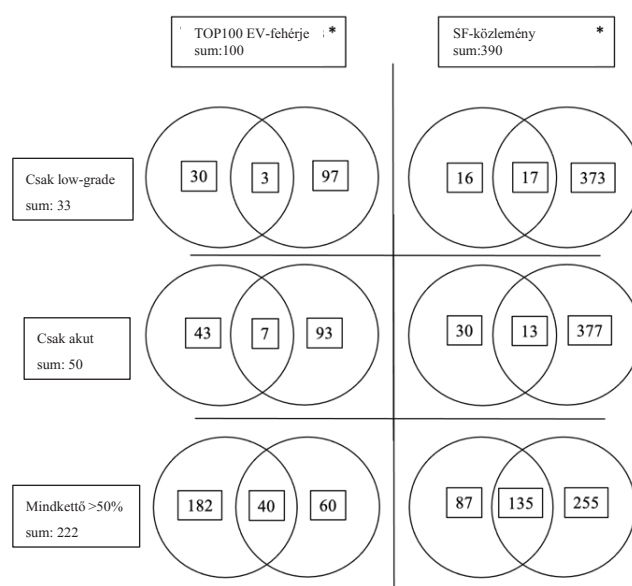
sebb mint a minták felében voltak azonosíthatók. Ez alapján 50 olyan fehérjét találtunk, amely jellemzően az akut mintákban, és 33 olyat, amely elsősorban a krónikus mintákban fordult elő. A két csoportban összesen 83 ilyen fehérjéről beszélhetünk.

A krónikus fertőzött mintákban előforduló fehérjék négy klaszterre oszthatók. A fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex – MHC, 'class' II) klaszterfehérjei az adaptív immunválaszban vesznek részt a krónikus bakteriális fertőzésekben. Ide tartozó fehérjék: HLA-DRA, katepszin-D, lizozimasszociált membránglikoprotein-1, transzferrinreceptorprotein-1, ezrin. Jelen volt még továbbá a szérum-amiloid-apolipoprotein transzportfehérjék klasztere: ebben szérum-amiloid-A4, apolipoprotein-CII és apolipoprotein-L1 volt elkülöníthető, melyek a bakteriális infekció során kialakult immunválasz modulálásában játszhatnak szerepet. Ezenfelül megjelennek a komplementkaskád további elemei is. A negyedik, nagy fehérjeelemszámmal rendelkező klaszter a III. típusú kollagénfehérjék klasztere volt, melyben mátrixmetalloproteináz-8, mátrixmetalloproteináz-3, valamint metalloproteináz-inhibitor, kollagén-alfa-lánc-1 (VI. és III.), illetve cisztatin-C fehérjék is jelen vannak. Ezek az implantátumasszociált krónikus fertőzésekben kialakult biofilm képződésében játszhatnak fontos szerepet.

Az akut fertőzött mintákban kisebb elemszámú klasztereket lehet elkülöníteni. Kiemelendő ezek közül a tioredoxinfüggő peroxid fehérjéklaszter, melynek elemei: peroxiredoxin-2, tioredoxinfüggőperoxid-reduktáz, valamint peroxiredoxin-6, amelyek antioxidáns fehérjecsald részzei, és az oxidatív stressztől védik meg a sejteket. Jelen van még a klatrinmediált transzportfehérjék klasztere és a mitokondrium-membránfehérjék klasztere is. A glükóztranszportfehérje-klaszter elemei: kalnexin, apolipoprotein(a), 'solute carrier family 2' (szállítófehérje-család), dolichil-difoszfooligoszacharid-protein glikoziltranszferáz, melyek az akut gyulladásos folyamatok során az immunsejtek fokozott cukorfelvételében játszanak szerepet.

Az akut és a krónikus fertőzött mintákból izolált extracellularis vesiculák fehérjéinek összehasonlítása ismert proteinlistákkal

A fent ismertetett csoportokba sorolt fehérjék listáját az ismert adatbázisok fehérjelistáihoz hasonlítottuk (3. ábra). Az akut csoportba 50 db fehérje tartozik, amelyek a TOP100 fehérjével 7 esetben mutattak egyezést – ez az általunk azonosított fehérjék 14%-a. A synovialis folyadékból izolált fehérjék listájával pedig 13 fehérje egyezett meg, ami az általunk azonosított fehérjék 26%-a. A krónikus csoportban 33 db fehérje került azonosításra: a TOP100 fehérjével 3 esetben mutattak egyezést (9%), a synovialis folyadékból izolált fehérjék listájával pedig 17 fehérje (52%) egyezett meg. A „mindkettő” csoportban 222 db fehérje azonosítható, amelyek a



3. ábra

A Venn-diagram a mintáinkban izolált fehérjéket a Vesiclepedia adatbázisban található TOP100 fehérjéhez, valamint korábbi közleményből ismert synovialis fehérjékhez hasonlítja. Az összehasonlítás a „csak akut”, „csak krónikus” és „mindkét csoport >50%”, vagyis legalább felében megjelenő fehérjékkel történt

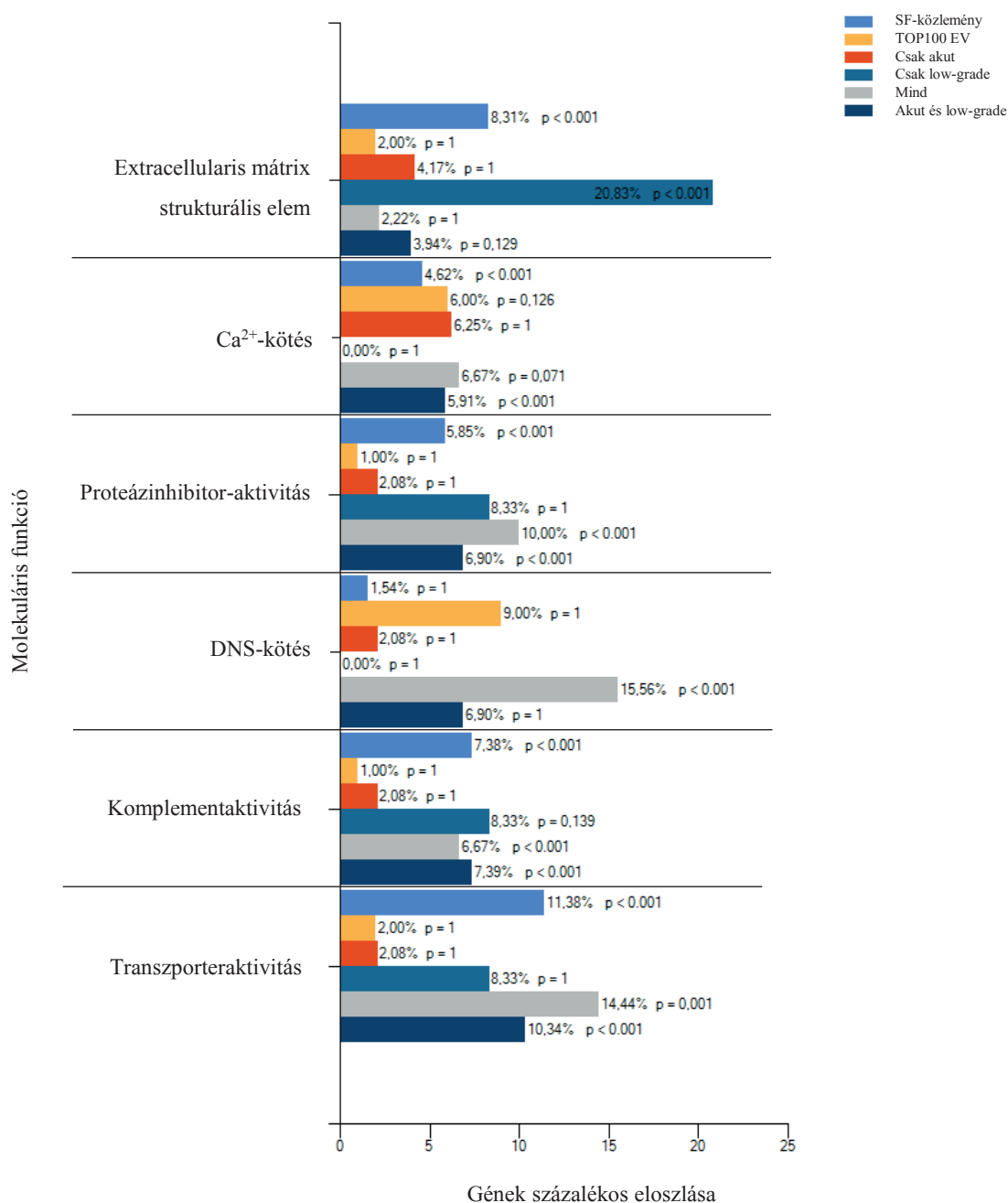
EV = extracellularis vesicula; SF = synovialis folyadék

TOP100 fehérjével 40 esetben (18%) mutattak egyezést, a synovialis folyadékból izolált fehérjék listájával pedig 135 fehérje (61%) egyezett meg.

A fenti csoportosítás szerint elemeztük a fehérjeprofil abból a szempontból is, hogy a csoportba tartozó fehérjék hány százaléka tartozik bizonyos molekuláris funkciókhoz (4. ábra). Jól látszik, hogy a „csak krónikus” mintákban előforduló fehérjék közül arányaiban több a komplementfolyamatokban részt vevő fehérje (8,33%), míg a „csak akut” mintákban előforduló fehérjék között ez az arány alacsonyabb (2,08%). Ugyanez az arány látható a proteázinhibitor-aktivitás esetében: „csak krónikus” 8,33%, „csak akut” 2,08%.

Megbeszélés

A periprotetikus infekció diagnosztikájának fejlesztésére jelentős energiát fordít számos kutatócsoport. Az utóbbi évtizedben újabb és újabb biomarkerek jelentek meg a köztudatban, amitől a diagnosztika egyszerűsödését és pontosabbá válását várták [32–34]. A jelenleg ismert biomarkerek nem alkalmazhatók egyedüli vizsgálatként a periprotetikus infekció diagnózisának felállításában, de kérdéses, hogy létezik-e olyan biomarker, amely egyedüli szereplőként biztos választ adhat erre a nehezen eldönthető kérdésre. Fröschén és mtsai közleményükben arra utalnak, hogy érdemes lehet gondolkodásmódot váltani és az „egy legjobb biomarker” kiválasztása helyett a gyulladásos folyamat megismerésére helyezni a fókuszot és abból meghatározni egy jellemző listát [35]. Ez a gondolkodás főként a krónikus, bizonytalan panaszokat okozó periprotetikus infekció esetében lehet fontos.



4. ábra

Összehasonlító ábra, mely az adatbázisokból ismert fehérjék (TOP100 EV és SF-közlemény) bizonyos molekuláris funkciókban való megjelenési gyakoriságát hasonlítja össze az általunk azonosított és különböző csoportokban (csak akut, csak krónikus, mind, akut és krónikus) vizsgált fehérjékkel

DNS = dezoxiribonukleinsav; EV = extracelluláris vesicula; SF = synovialis folyadék

Munkájukban a komplementkaszád szerepére hívják fel a figyelmet, melyet korábban krónikus protézisfertőzésekben nem vizsgáltak.

A nagyzületi protézisek körül kialakuló akut és krónikus bakteriális gyulladásos folyamatok komplex jelátviteli útvonalak hálózatán keresztül szabályozódnak a szervezetben, amelyek nyomon követése a jelátviteli utakban szerepet játszó fehérjék azonosítása alapján történhet. Vizsgálatunkban *Fröschen és mtsai* gondolatmenetét követve a potenciális, extracelluláris vesiculákban „utazó” biomarkerek feltérképezését végeztük. Ez a synovialis

folyadékból izolálható, főként aktivált neutrophil granulocytákból származó extracelluláris vesiculák szerepének megértését segíti.

Prospektív, összehasonlító vizsgálatunkban a 2018. évi Musculoskeletal Infection Society and International Consensus Meeting definíciója szerinti fertőzöttprotézis-komplikáció miatt revíziós műtétre kerülő betegeket vizsgáltunk; a fertőzés lefolyási ideje szerint akut és krónikus csoportra osztottuk a bevont betegeket. A synovialis folyadékból izolált extracelluláris vesiculák fehérjetartalmának proteomikai elemzését, majd annak leíró

jellemzését végeztük el. Az azonosított fehérjéket az alapján csoportosítottuk, hogy minden (akut és 'low-grade') vagy csak bizonyos (akut vagy 'low-grade') mintákban voltak-e azonosíthatók.

Minden mintából azonosított fehérjeklaszterek annotációja

A komplementrendszer a veleszületett immunrendszer egyik első védővonala [36]. A komplementrendszer és az extracelluláris vesiculák kapcsolatának korábbi vizsgálata alapján az extracelluláris vesiculáknak kettős funkciójuk van a komplementrendszer működése során [37, 38]. Egyrészt az extracelluláris vesiculák felületére kerülő komplementek vezetnek a komplementaktivációhoz, és így fokozzák a komplementválasz intenzitását. A rheumatoid arthritises betegek synovialis folyadékában a leukocytákból felszabaduló extracelluláris vesiculák felszínét C1q, C4 és C3 komponensek burkolták [37]. Az általunk vizsgált minden mintában azonosítható komplementalkotók az *1/A ábrában* láthatók. Kiemelve a fontosabb alkotókat: C3, C4a, C4b, C5, C6, C8, C9, valamint CFH és CFB. Az extracelluláris vesiculák másik fontos szerepe a saját sejtek védelme a komplementkaskád-aktiváció végeredményeként létrejövő membránkárosító komplex (MAC) saját sejteket károsító hatásával szemben a sejtek túlélése érdekében [39]. Az általunk vizsgált minden fertőzött mintában megjelentek a fenti komplementalkotók, ebből a szempontból nem volt különbség az akut és a krónikus fertőzés között.

A hem- és hemogloblin proinflammatorikus funkcióval bíró fehérjeklaszter elemei a veleszületett immunrendszer aktiválásában játszanak fontos szerepet. Haemolysis útján a vörösvértestekből felszabaduló, hemoglobinkárosodással összefüggő endogén molekulaként (damage-associated molecular pattern – DAMP) viselkedik, és képes aktiválni vagy módosítani a veleszületett immunválaszt. Hozzájárulhat endothelialis sejtek aktivációjához, neutrophilaktivációhoz, NET-formáció kialakulásához, makrofágaktivációhoz, kemotaxishoz, komplementaktivációhoz (MAC-formációhoz) [40]. A felsorolt DAMP-ok által kiváltott folyamatok egy részére utaló fehérjéket a saját mintáinkban is felfedeztünk, főként a neutrophil granulocyták aktivációja és az ehhez kapcsolható neutrophil védekezőmechanizmusok megjelenése szempontjából.

A periprotetikus infekció folyamatában az extracelluláris vesiculák szerepét eddig még kevésbé vizsgálták, funkciójukról keveset tudunk, az azonban ismert, hogy *in vitro* körülmények között a neutrophil granulocyták bakteriális stimulációra megnövelik az általuk kibocsátott extracelluláris vesiculák mennyiségét [41]. Munkánk során a synovialis folyadékból izolált extracelluláris vesiculák feltárásiából nyert fehérjék izolálását és azonosítását végeztük.

Minden mintában azonosítottunk *vesiculamediaált transzportfolyamatra* és *neutrophil degranulációs biológi-*

ai folyamatra jellemző fehérjéket, melyek szintén relevánsak lehetnek az ízületben zajló bakteriális fertőzés felismerésében. Ezeket klaszterektől függetlenül érdemes kiemelni: haptoglobin, laktotranszferrin, lizozim-C, mieloperoxidáz, alfa-1-savas glikoprotein-1, piruvátkináz, HSP90-béta, leucingazdag alfa-2-glikoprotein (*1. táblázat és 3. ábra*).

Ezek a fehérjék különböző funkciókkal bírnak. A haptoglobin hemoglobinkötő képességgel rendelkező alfa-2-savas glikoprotein, amely az ember és más emlősök legtöbb testfolyadékában jelen van. Pozitív akutfázis-fehérje, a vérplazmában a szintje megemelkedik gyulladás, fertőzések, trauma, egyéb szövetkárosodás és rosszindulatú szövetburjánzás esetén, mennyisége csökken haemolyticus állapotokban és súlyos hepatocellularis károsodás esetén [42]. Képes a hemoglobin megkötésére, továbbá antimikrobiális és antioxidáns hatással, valamint akutfázis-reakciót moduláló hatással is rendelkezik [43–45]; a korábban külön tárgyalt hem- és hemogloblin proinflammatorikus funkcióval bíró fehérjeklaszterhez sorolható. A laktotranszferrin, lizozim-C, mieloperoxidáz az aktivált neutrophil granulocyták által termelt antimikrobiális, baktericidális fehérjék, melyek a „host defense” rendszer részeként részt vesznek a szervezetbe jutott kórokozók elleni védekezésben [46, 47]. A piruvátkináz a glikolitikus fehérjék csoportjába tartozik, amelyek rendkívül gyakran azonosíthatók az extracelluláris vesiculák proteomjában [48]. Funkcióját tekintve a piruvátkináz katalizálja a foszfoenolpiruvát foszforcsoportjának transzferjét az ADP-re, amiből ATP keletkezik [49] – ez fontos szerepet játszik az extracelluláris energiaellátásban. Az alfa-1-savas glikoprotein-1 és a leucingazdag alfa-2-glikoprotein az akutfázis-fehérjék heterogén csoportjába tartoznak. Ezeket a fehérjéket vagy a máj vagy a makrofágok, endothelialis sejtek, adipocyták termelik, és mennyiségük vagy csökken, vagy növekszik a gyulladásos válasz kapcsán [50, 51]. A HSP90-béta a 'chaperon' fehérjék (dajkafehérjék) csoportjába tartozik [52]. Az új HSP-nómenklatúra iránymutatása szerint a HSP90-család – melybe öt fehérje tartozik – a HSPC-szuperfamilia alá tartozik [53]. A HSP-fehérjék biológiai katalizátorok a citoplazmában, az endoplazmás reticulumban és a mitokondriumokban is megtalálhatók [54]. A HSP90-fehérjék izoformáinak számos sejtbiológiai funkciója van, például 'chaperon' funkció, sejtszignál-, sejt-váz-, sejt-magfunkció, sejtciklus- és sejt-differenciáció [54]. További vizsgálatok azonban rámutattak arra is, hogy a HSP90-család fehérjei nemcsak sejten belül találhatóak meg, hanem bizonyos környezeti hatásokra (reaktívoxigén-gyök, hő, hypoxia, besugárzás és szöveti károsodás következtében felszabaduló citokinek) extracelluláris kiáramlásuk is megfigyelhető, melynek során immunológiai funkciókat láthatnak el [52, 55].

A felsorolt fehérjék relatív gyakoriságában nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az akut és a krónikus fertőzött minták között (*2. ábra*).

A krónikus fertőzött mintákból azonosított klaszterek annotációja

A krónikus fertőzött mintákban előforduló fehérjéket négy klaszterre tudtuk osztani. A II. osztályú MHC klaszterfehérjei az adaptív immunválaszban vesznek részt a krónikus bakteriális fertőzések során. Idetartozó fehérjék: HLA-DRA, katepszin-D, lizozimasszociált membránglikoprotein-1, transzferrinreceptorprotein-1, ezrin.

Jelen volt még továbbá a szérum-amiloid-apolipoprotein transzportfehérjék klasztere, amelyben szérum-amiloid-A4, apolipoprotein-CII és apolipoprotein-L1 volt elkülöníthető – ezek a bakteriális infekció során kialakult immunválasz modulálásában játszhatnak szerepet. Ezenfelül megjelennek a komplementkaszád további elemei is.

A negyedik, nagy fehérjeelemszámmal rendelkező klaszter a III. típusú kollagénfehérjék klasztere volt, melyben mátrixmetalloproteináz-8, mátrixmetalloproteináz-3, valamint metalloproteináz-inhibitor, kollagén-alfa-lánc-1 (VI. és III.), illetve cisztatin-C fehérjék is jelen vannak. Az implantátumasszociált krónikus fertőzésekben kialakult biofilm képződésében, az az elleni védekezésben játszhatnak fontos szerepet, de az e folyamatban betöltött szerepükre csak következtetni tudunk.

Az akut fertőzött mintákból azonosított klaszterek annotációja

Az akut fertőzött mintákban azonosított tioredoxinfüggő peroxid fehérjéklaszter (antioxidáns fehérjecsald részei) fontos szerepet játszik a sejtek oxidatív stressztől való védelmében [56]. Mintáinkban azonosított elemei: peroxiredoxin-2, tioredoxinfüggőperoxid-reduktáz, valamint peroxiredoxin-6. Mind az emlősök, mind a baktériumok rendelkeznek tiolfüggő antioxidáns rendszerrel [57, 58]. A tioredoxinfüggő fehérjék elsődleges feladata a reaktívoxigén-gyökök és peroxidok semlegesítése, amelyek a normál-sejtanyagcsere során és nagyobb oxidatív stressznek vagy környezeti hatásoknak, toxinoknak való kitettség miatt keletkeznek. A peroxidok és reaktív-oxigén-gyökök eltávolításával megakadályozzák a káros molekulák felhalmozódását, amelyek oxidatív károsodást okozhatnak a sejtkomponensekben, például a fehérjékben, a lipidekben és a DNS-ben. Ez a védőszerep különösen fontos olyan helyzetekben, amikor a sejtek nagy fokú oxidatív stressznek vannak kitéve, például gyulladás, öregedés vagy környezeti toxinoknak való kitettség során [56].

Jelen vannak még a kltrinmediált transzportfehérjék klaszterének elemei, melyek az endocytosis és a sejten belüli szállítás funkciójában játszanak szerepet mind fiziológiai, mind patológiai folyamatokban [59]. Látszólag ellentmondásba ütközhetünk, hiszen vizsgálatunkban a sejten kívüli vesiculákat vizsgáltuk, az endocytosis során pedig sejten belüli vesiculák jönnek létre. Az extra-

cellularis vesiculák azonban a sejt-sejt közti kommunikáció során az általuk szállított fehérjéket, miRNS-t és egyéb anyagokat bejuttatják a fogadó sejtbe. Erre számos mechanizmus létezik, melyeket két fő csoportra osztanak: phagocytosis és pinocytosis. A phagocytosis az endocytosis egy olyan típusa, amelynek során viszonylag nagy (>1 µm) részecskék felvétele történik, és jellemzően a specializálódott phagocyták végzik. A pinocytosis ezzel szemben minden sejtben előfordul, és általában kltrin-függő endocytosisra, kltrinfüggetlen endocytosisra és macropinocytosisra osztják [60, 61].

A glükóztranszportfehérje-klaszter elemei: kalnexin, apolipoprotein(a), 'solute carrier family 2', dolichil-difoszfooligoszacharid-protein glikoziltranszferáz, melyek az akut gyulladásos folyamatok során az immunsejtek fokozott cukorfelvételében játszanak szerepet.

A vizsgálatunkban azonosított fehérjeprofilt ismert adatbázisokhoz hasonlítottuk, hogy értékeljük a klinikai megjelenés szempontjából különböző akut és krónikus bakteriális gyulladásos folyamatokat. Ebben az esetben azt találtuk, hogy a „csak krónikus” mintákban azonosított fehérjék között arányaiban nagyobb volt a komplementfolyamatokhoz és a proteázinhibitor-aktivitási folyamathoz tartozó fehérjék mennyisége, mint a „csak akut” csoportban vagy a *Mahendran és mtsai* [29] által közölt, a synovialis folyadékban szabadon előforduló fehérjék csoportjában.

Vizsgálatunknak természetesen vannak limitációi. Relatív alacsony esetszámmal dolgoztunk a vizsgálat alapkutatósi jellege és komplexitása miatt, ami befolyásolhatja az eredményeket. A különböző csoportok fehérjetartalmának vizsgálatakor azokkal a fehérjékkel foglalkoztunk, amelyek legalább a minták felében jelen voltak. Elképzelhető, hogy ha ezt a határt nem 50%-nál határozzuk meg, más eredményt kaptunk volna. Ezenkívül kontrollcsoportként csak az irodalmi adatokra tudtunk hagyatkozni, biológiai minta a korábbi vizsgálatok miatt nem állt rendelkezésre mechanikai protézislazulásból származó esetekből.

Következtetés

Tudomásunk szerint ez az első közlemény, mely periprotetikus infekció során a synovialis folyadékból izolált, közepes méretű, többek között aktivált neutrophil granulocytákból is származó extracellularis vesiculák proteomját vizsgálja. Az ortopéd sebészetben a protézisfertőzések diagnosztikájában régóta megvan a törekvés, hogy megtalálják az „egy legjobb biomarkert”, amely biztosan különbséget tud tenni fertőzött és nem fertőzött protézislazulás között. Fontos, hogy vizsgálatunk célja nem egy újabb biomarker kiválasztása volt, hanem az extracellularis vesiculákban szállított fehérjék biológiai folyamatokban betöltött szerepének ábrázolása, leírása, amivel jobban betekinthetünk a periprotetikus infekció során zajló folyamatokba. Az extracellularis vesiculák sze-

repe a bakteriális gyulladási folyamatokban esszenciális lehet, megismerésükkel formálhatjuk a periprotetikus infekció diagnosztikájával kapcsolatos nézőpontunkat.

Megjegyzés: Az 1. és 2. táblázatot a szerzők készséggel megküldik az érdeklődőknek.

Anyagi támogatás: A kutatás költségei az ENDO-Verein e.V. kutatási kihelyezett keretből kerültek finanszírozásra.

Szerzői munkamegosztás: S. I., S. G.: Kutatási metodológia, mintagyűjtés, a statisztika kiértékelése, a kézirat elkészítése. T. L., S. S., D. L.: Tömegspektrometriai előkészítés, a mérés elvégzése, az adatok összesítése, a kézirat megírása. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Irodalom

- [1] Bozic KJ, Kurtz SM, Lau E, et al. The epidemiology of revision total hip arthroplasty in the United States. *J Bone Joint Surg Am.* 2009; 91: 128–133.
- [2] Bozic KJ, Kurtz SM, Lau E, et al. The epidemiology of revision total knee arthroplasty in the United States. *Clin Orthop Relat Res.* 2010; 468: 45–51.
- [3] Solarino G, Bizzoca D, Moretti L, et al. What's new in the diagnosis of periprosthetic joint infections: focus on synovial fluid biomarkers. *Trop Med Infect Dis.* 2022; 7: 355.
- [4] Vicenti G, Bizzoca D, Nappi V, et al. Serum biomarkers in the diagnosis of periprosthetic joint infection: consolidated evidence and recent developments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019; 23(2 Suppl): 43–50.
- [5] Yee DK, Chiu KY, Yan CH, et al. Review article: Joint aspiration for diagnosis of periprosthetic infection. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 2013; 21: 236–240.
- [6] Sousa A, Carvalho A, Pereira C, et al. Economic impact of prosthetic joint infection – an evaluation within the Portuguese National Health System. *J Bone Jt Infect.* 2018; 3: 197–202.
- [7] Garrido-Gómez J, Arrabal-Polo MA, Girón-Prieto MS, et al. Descriptive analysis of the economic costs of periprosthetic joint infection of the knee for the public health system of Andalusia. *J Arthroplasty* 2013; 28: 1057–1060.
- [8] Berbari E, Mabry T, Tsaras G, et al. Inflammatory blood laboratory levels as markers of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 2010; 92: 2102–2109.
- [9] Shahi A, Parvizi J. The role of biomarkers in the diagnosis of periprosthetic joint infection. *EFORT Open Rev.* 2016; 1: 275–278.
- [10] Deirmengian C, Lonner JH, Booth RE Jr. The Mark Coventry Award: white blood cell gene expression: a new approach toward the study and diagnosis of infection. *Clin Orthop Relat Res.* 2005; 440: 38–44.
- [11] Fessler MB, Malcolm KC, Duncan MW, et al. A genomic and proteomic analysis of activation of the human neutrophil by lipopolysaccharide and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2002; 277: 31291–31302.
- [12] Manger ID, Relman DA. How the host 'sees' pathogens: global gene expression responses to infection. *Curr Opin Immunol.* 2000; 12: 215–218.
- [13] Parvizi J, Jacovides C, Antoci V, et al. Diagnosis of periprosthetic joint infection: the utility of a simple yet unappreciated enzyme. *J Bone Joint Surg Am.* 2011; 93: 2242–2248.
- [14] György B, Szabó TG, Pásztói M, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68: 2667–2688.
- [15] Herrmann M, Diederichs S, Melnik S, et al. Extracellular vesicles in musculoskeletal pathologies and regeneration. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021; 8: 624096.
- [16] Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2: 569–579.
- [17] Whiteside TL. Extracellular vesicles isolation and their biomarker potential: are we ready for testing? *J Transl Med.* 2017; 5: 54.
- [18] Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep.* 2019; 39: BSR20180992.
- [19] Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018; 7: 1535750.
- [20] McKelvey KJ, Powell KL, Ashton AW, et al. Exosomes: mechanisms of uptake. *J Circ Biomark.* 2015; 4: 7.
- [21] Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.* 2015; 25: 364–372.
- [22] Cocozza F, Grisard E, Martin-Jaular L, et al. SnapShot: extracellular vesicles. *Cell* 2020; 182: 262.e1.
- [23] Rüdewald JM, Randau TM, Hilgers C, et al. Extracellular vesicle isolation and characterization from periprosthetic joint synovial fluid in revision total joint arthroplasty. *J Clin Med.* 2020; 9: 516.
- [24] Parvizi J, Tan TL, Goswami K, et al. The 2018 definition of periprosthetic hip and knee infection: an evidence-based and validated criteria. *J Arthroplasty* 2018; 33: 1309–1314. e2.
- [25] Sallai I, Marton N, Szatmári A, et al. Activated polymorphonuclear derived extracellular vesicles are potential biomarkers of periprosthetic joint infection. *PLoS ONE* 2022; 17: e0268076.
- [26] Turiák L, Misják P, Szabó TG, et al. Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *J Proteomics* 2011; 74: 2025–2033.
- [27] Turiák L, Ozohanics O, Marino F, et al. Digestion protocol for small protein amounts for nano-HPLC-MS(MS) analysis. *J Proteomics* 2011; 74: 942–947.
- [28] Lőrincz ÁM, Bartos B, Szombath D, et al. Role of Mac-1 integrin in generation of extracellular vesicles with antibacterial capacity from neutrophilic granulocytes. *J Extracell Vesicles* 2020; 9: 1698889.
- [29] Mahendran SM, Keystone EC, Krawetz RJ, et al. Elucidating the endogenous synovial fluid proteome and peptidome of inflammatory arthritis using label-free mass spectrometry. *Clin Proteomics* 2019; 16: 23.
- [30] Pathan M, Fonseka P, Chitti SV, et al. Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47: D516–D519.
- [31] Kalra H, Simpson RJ, Ji H, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* 2012; 10: e1001450.
- [32] Deirmengian C, Kardos K, Kilmartin P, et al. Diagnosing periprosthetic joint infection: has the era of the biomarker arrived? *Clin Orthop Relat Res.* 2014; 472: 3254–3262.
- [33] Achermann Y, Vogt M, Leunig M, et al. Improved diagnosis of periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonication fluid from removed implants. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 1208–1214.
- [34] Renz N, Yermak K, Perka C, et al. Alpha defensin lateral flow test for diagnosis of periprosthetic joint infection: not a screening but a confirmatory test. *J Bone Joint Surg Am.* 2018; 100: 742–750.

- [35] Fröschen FS, Schell S, Wimmer MD, et al. Synovial complement factors in patients with periprosthetic joint infection after undergoing revision arthroplasty of the hip or knee. *Joint Diagnostics* 2021; 11: 434.
- [36] Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 2010; 11: 785–797.
- [37] Biró É, Nieuwland R, Tak PP, et al. Activated complement components and complements activator molecules on the surface of cell-derived microparticles in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66: 1085–1092.
- [38] Karasu E, Eisenhardt SU, Harant J, et al. Extracellular vesicles: packages sent with complement. *Front Immunol.* 2018; 9: 721.
- [39] Unnewehr H, Rittirsch D, Sarma JV, et al. Changes and regulation of the C5a receptor on neutrophils during septic shock in humans. *J Immunol.* 2013; 190: 4215–4225.
- [40] Bozza MT, Jeney V. Pro-inflammatory actions of heme and other hemoglobin-derived DAMPs. *Front Immunol.* 2020; 11: 1323.
- [41] Timár CI, Lőrincz AM, Csépanyi-Kömi R, et al. Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood* 2013; 121: 510–518.
- [42] Dobryszczycka W. Biological functions of haptoglobin – new pieces to an old puzzle. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1997; 35: 647–654.
- [43] Eaton JW, Brandt P, Mahoney JR, et al. Haptoglobin: a natural bacteriostat. *Science* 1982; 215: 691–693.
- [44] Wassell J. Haptoglobin: function and polymorphism. *Clin Lab.* 2000; 46: 547–552.
- [45] Quaye IK. Haptoglobin, inflammation and disease. *Trans R. Soc Trop Med Hyg.* 2008; 102: 735–742.
- [46] Othman A, Sekheri M, Filep JG. Roles of neutrophil granule proteins in orchestrating inflammation and immunity. *FEBS J.* 2022; 289: 3932–3953.
- [47] Hong CW. Extracellular vesicles of neutrophils. *Immune Netw.* 2018; 18: e43.
- [48] Göran Ronquist K. Extracellular vesicles and energy metabolism. *Clin Chim Acta* 2019; 488: 116–121.
- [49] Dombrauckas JD, Santarsiero BD, Mesecar AD. Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis. *Biochemistry* 2005; 44: 9417–9429.
- [50] Markanday A. Acute phase reactants in infections: evidence-based review and a guide for clinicians. *Open Forum Infect Dis.* 2015; 2: ofv098.
- [51] Downton SB, Colten HR. Acute phase reactants in inflammation and infection. *Semin Hematol.* 1988; 25: 84–90.
- [52] Jackson SE. HSP90: structure and function. *Top Curr Chem.* 2013; 328: 155–240.
- [53] Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14: 105–111.
- [54] Hoter A, El-Sabban ME, Naim HY. The HSP90 family: structure, regulation, function, and implications in health and disease. *Int J Mol Sci.* 2018; 19: 2560.
- [55] Calderwood SK, Gong J, Murshid A. Extracellular HSPs: the complicated roles of extracellular HSPs in immunity. *Front Immunol.* 2016; 7: 159.
- [56] Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med.* 2014; 66: 75–87.
- [57] Mishra S, Imlay J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Arch Biochem Biophys.* 2012; 525: 145–160.
- [58] Holmgren A. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxid Redox Signal.* 2000; 2: 811–820.
- [59] Qin H, Diaz A, Blouin L, et al. Systematic identification of barriers to human iPSC generation. *Cell* 2014; 158: 449–461.
- [60] Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: 603–612.
- [61] Costa Verdera H, Gitz-Francois JJ, Schiffelers RM, et al. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *J Control Release* 2017; 266: 100–108.

(Sallai Imre dr.,
Budapest, Üllői út 78/b, 1082
e-mail: sallai01imre@gmail.com)

„Nincs az a rossz, amiből ne születne jó!”
(Voltaire)

A cikk a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) feltételei szerint publikált Open Access közlemény, melynek szellemében a cikk bármilyen médiumban szabadon felhasználható, megosztható és újraközölhető, feltéve, hogy az eredeti szerző és a közlés helye, illetve a CC License linkje és az esetlegesen végrehajtott módosítások feltüntetésre kerülnek. (SID_1)