

**A CRP és az extracelluláris vezikulák (EV-k)
köölcsönhatásának rendszerszemléletű
vizsgálata koszorúér-betegségben
(Medinprot-Szinergia III. pályázat)**



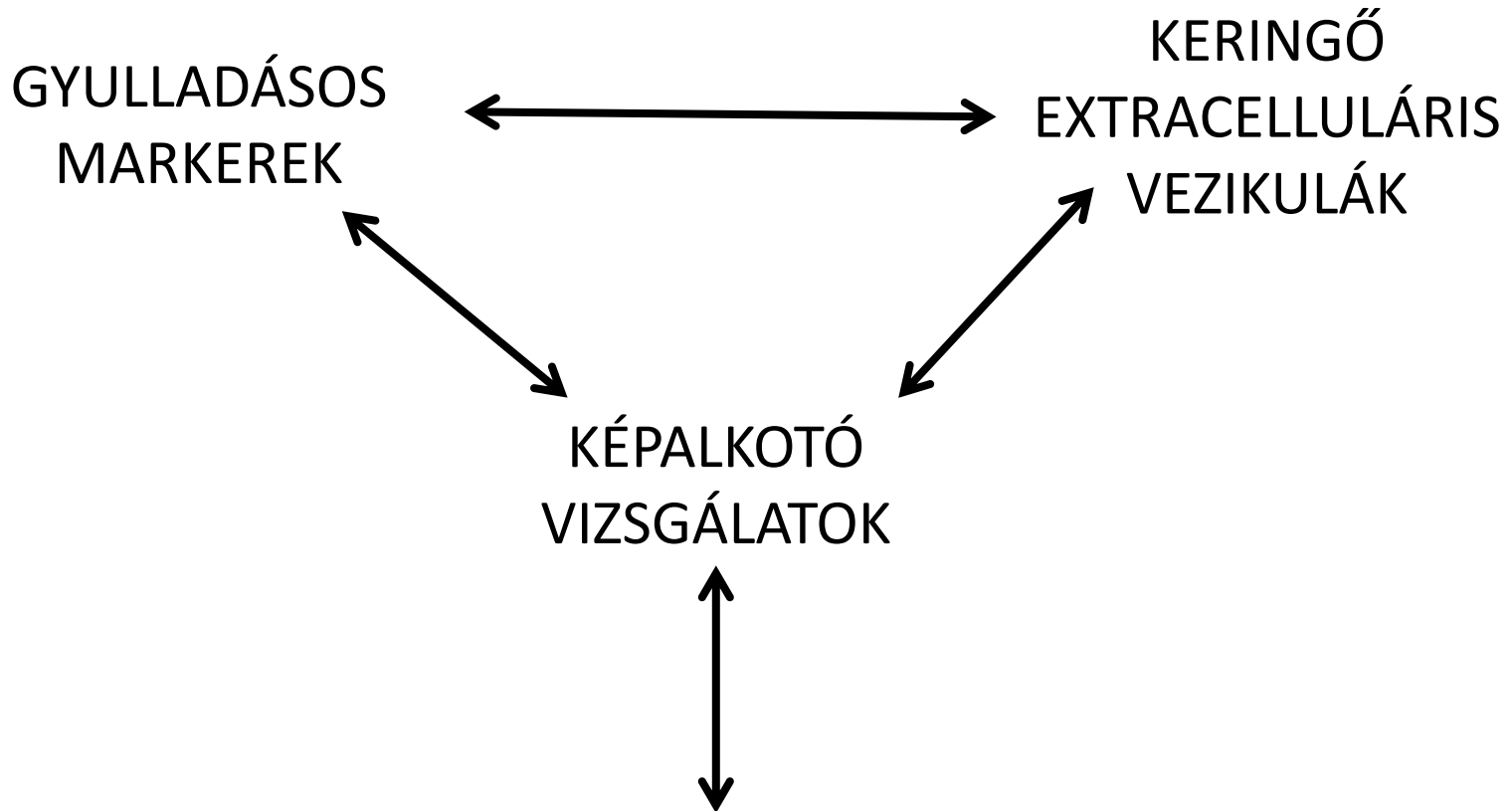
MEDINPROT



Célkitűzés

A keringő EV-k vizsgálatának beleillesztése a kardiovaszkuláris betegségek (CVD) jelenleg használt kockázat becslési rendszerébe.

Hipotézis

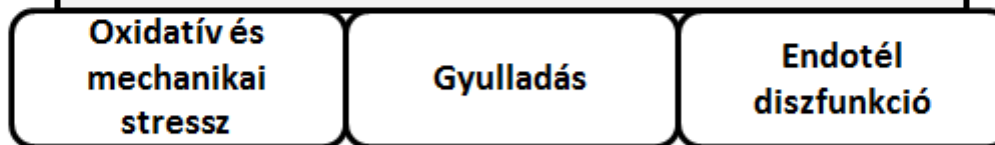


**a jelenleg alkalmazott kockázati
besorolásoknál nagyobb érzékenységű
módszer**

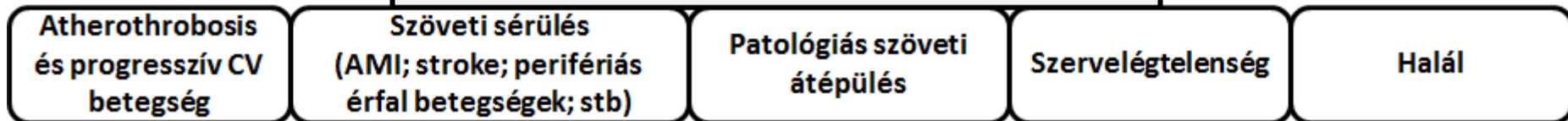
kardiovaszkuláris kontinuum



SZUBKLINIKAI BETEGSÉG



KLINIKAI MANIFESZTÁCIÓ



CVD rizikó

1. Lipid profil

1. Se totál koleszterin
2. Se triglicerid
3. LDL
4. HDL

2. Lp(a) (LDL-szerű lipoprotein patikulum, amelyben az ApoB-hez egy specifikus apolipoprotein(a) [apo(a)] kapcsolódik. Plazma koncentrációja genetikailag determinált: az apolipoprotein(a) gene [LPA] lokalizációja 6q26-27.)

3. Szénhidrát anyagcsere

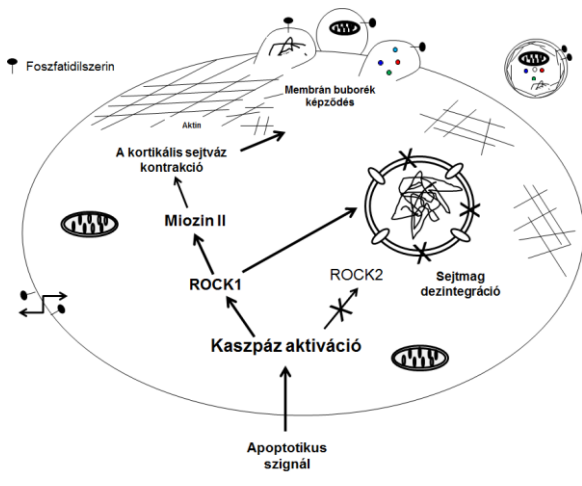
1. Se glükóz (vércukor)
2. Glikált hemoglobin (HgA1c) (A vörösvértesten belül a glikált hemoglobin a környezeti cukorkoncentrációval arányos mértékben keletkezik. A glikált hemoglobin érték az elmúlt időszak vércukor koncentrációinak súlyozott "mozgó" átlagértékeként szolgál, aminek az alakulására a legutóbbi cukorszintek nagyobb hatást gyakorolnak.)

4. Gyulladásos markerek

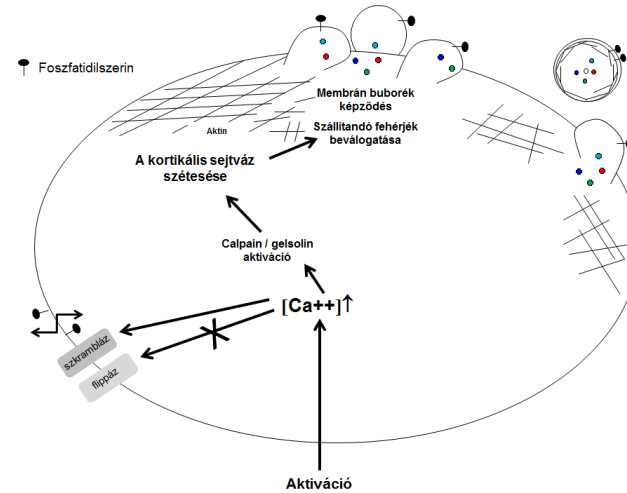
1. **hsCRP** (Azoknál, akiknél a hs-CRP értéke a normál tartomány felső határán van 1,5-4-szerese a szívroham kockázata, mint azoknál, akiknek a CRP értéke a normál tartomány alsó határán van.)

5. Képző eljárások

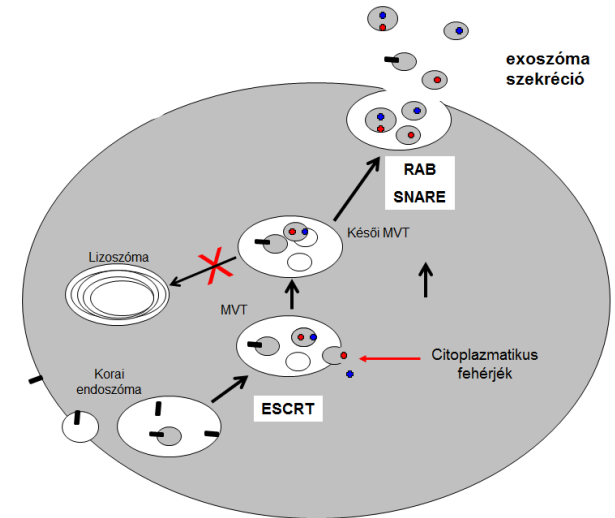
Extracelluláris vezikulák



apoptotikus
vezikulák

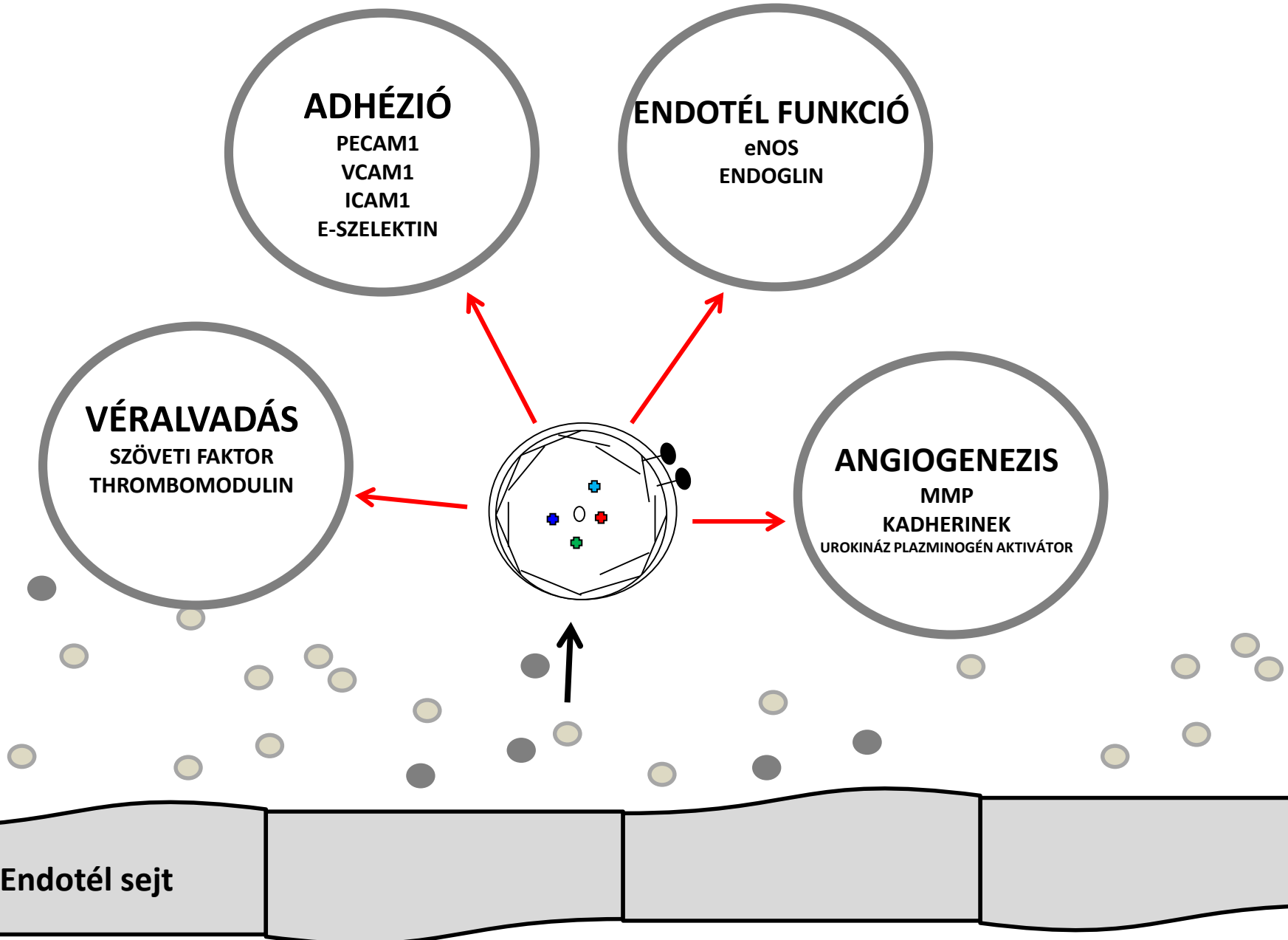


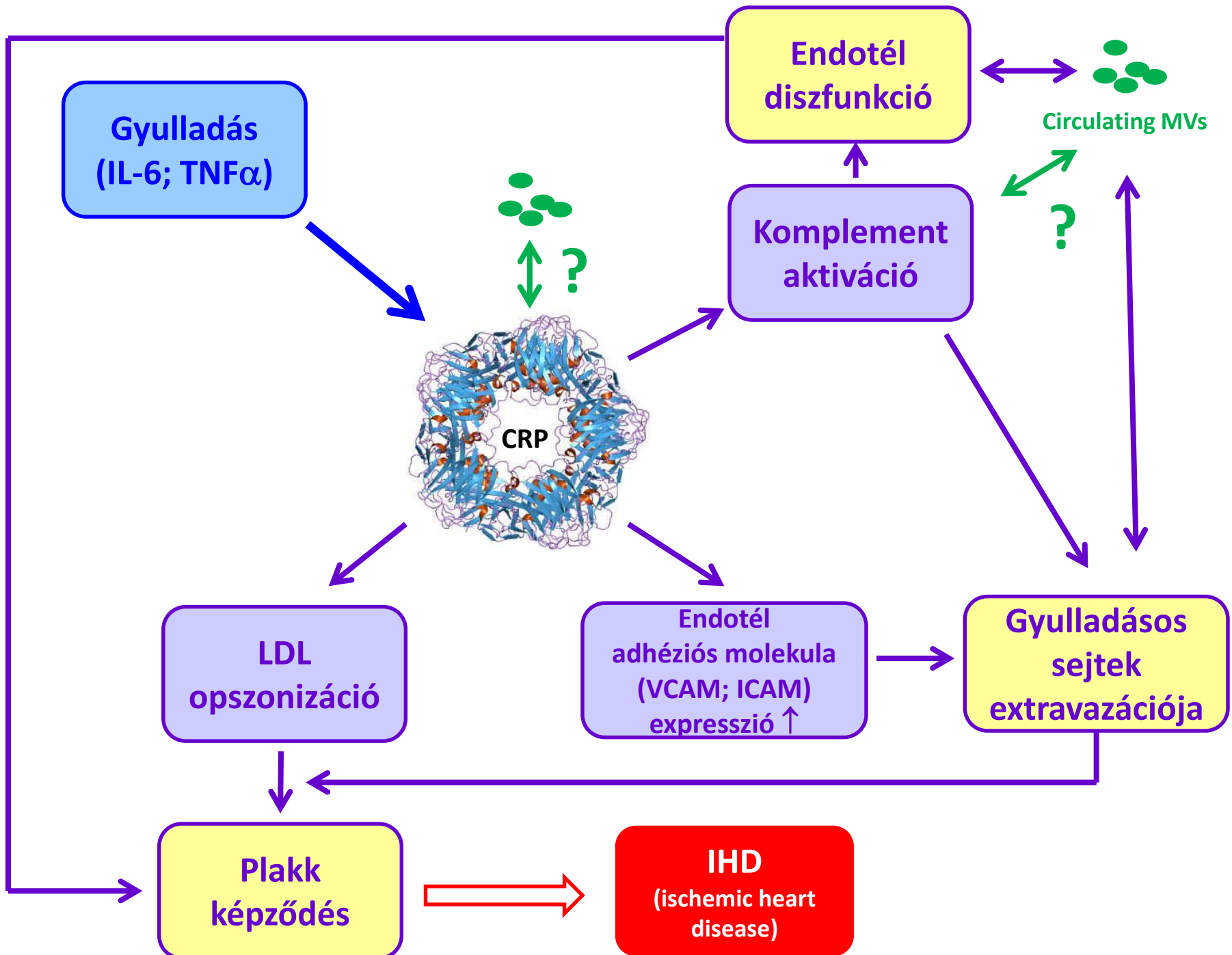
mikrovezikulák

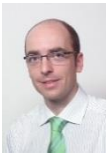


exoszómák

EV hatások CVD-ben







Elvégzett munka 2016. március végéig



1. **CVD-ben szenvedő betegek vizsgálata**
 - a) A betegek koszorúér CTA vizsgálata
 - b) A betegek laboratóriumi vizsgálatai
2. **Adatbázis létrehozása (klinikai paramétereket és a képkalkoló eljárások eredményeit tartalmazó adatbázis kidolgozása)**

1. **CVD-ben szenvedő betegek vizsgálata**
 - a) Keringő EV mintázatának jellemzése FACS módszerrel
2. ***In vitro* modell rendszer: EV – CRP kölcsönhatások vizsgálata**
 - a) Flow cytometriás komplement mediálta cytotoxicitás vizsgálati módszer (CDC) beállítása
 - b) EV-k CDC-re gyakorolt hatásának vizsgálata
 - c) CRP CDC-re gyakorolt hatásának vizsgálata
 - d) EV-k CRP kötésének vizsgálata
 - e) A CRP EV-k immunglobulin-kötő képességére gyakorolt hatásának vizsgálata
 - f) Hyperglycaemiás környezetben tartott sejtek felülúszójából izolált EV-k immunoglobulin kötő képességének vizsgálata CRP jelenlétében

Vizsgálati csoportok

A beteg beválasztás kritériumai

- 18-85 év közötti életkor
- Fehér, nem hispán, nem latin származás
- Betegtájékoztató megértése, valamint a beleegyező nyilatkozat elfogadása, aláírása
- Diagnosztikus értékű koronária CTA vizsgálat

A koszorúér betegség jelenléte CT alapján került diagnosztizálásra

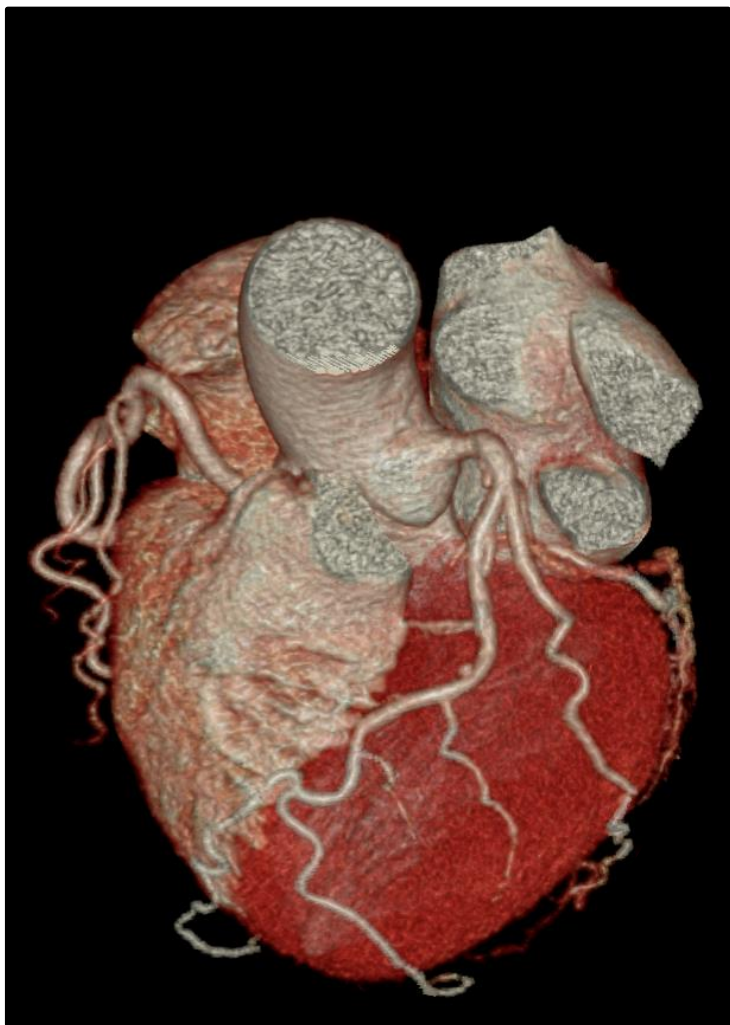
Koszorúér beteg csoport

25 fő

Egészséges csoport

12/20 fő

Koszorúér CT angiográfia



LAD



Segment Involvement Score

RCA



Segment Stenosis Score

Plakk terheltséget jellemző pontrendszerek

Segment Involvement Score (SIS)

Koszorúér plakkal érintett szegmentumok száma

Segment Stenosis Score (SSS)

Koszorúér szűkület mértéke

minimális = 1 pont
enyhe = 2 pont
közepes = 3 pont
súlyos = 4 pont

Coronaria CT

**Laboratóriumi
eredmények**
(40 paraméter)

Klinikai adatbázis

Életmód adatok
(10 paraméter)

Keringő EV mintázat jellemzése többszínű immunfenotipizálással

Módszerek:

AnnexinV FITC / CD41a Pe /CD61 PerCP / CD62P APC

GlycoA Pe

CD105 FITC / CD31 Pe / CD14 PerCP-Cy5.5

Anti-CRP FITC / SIRPA Pe

CD41a FITC / CD142 Pe (tissue factor) / CD14 PerCP-Cy5.5

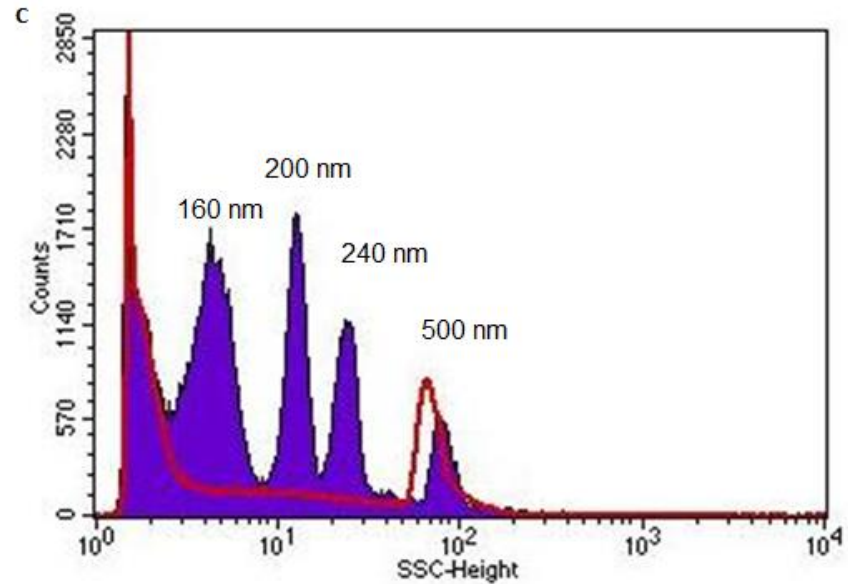
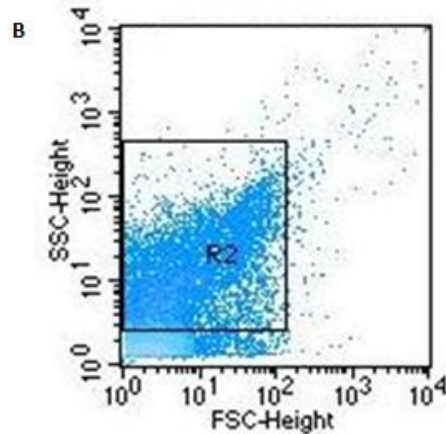
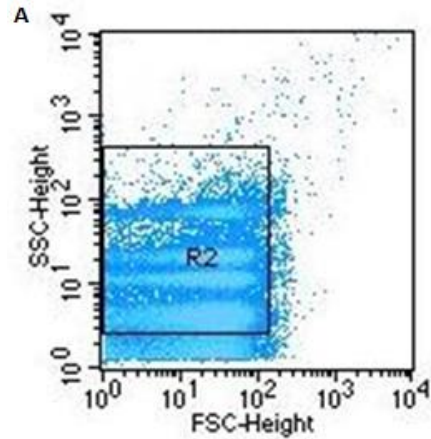
A méréseket hígított plazmából (thrombocytamentes plazma) végeztük.

Alvadásgátlás: ACD és Heparin

n= 15/25

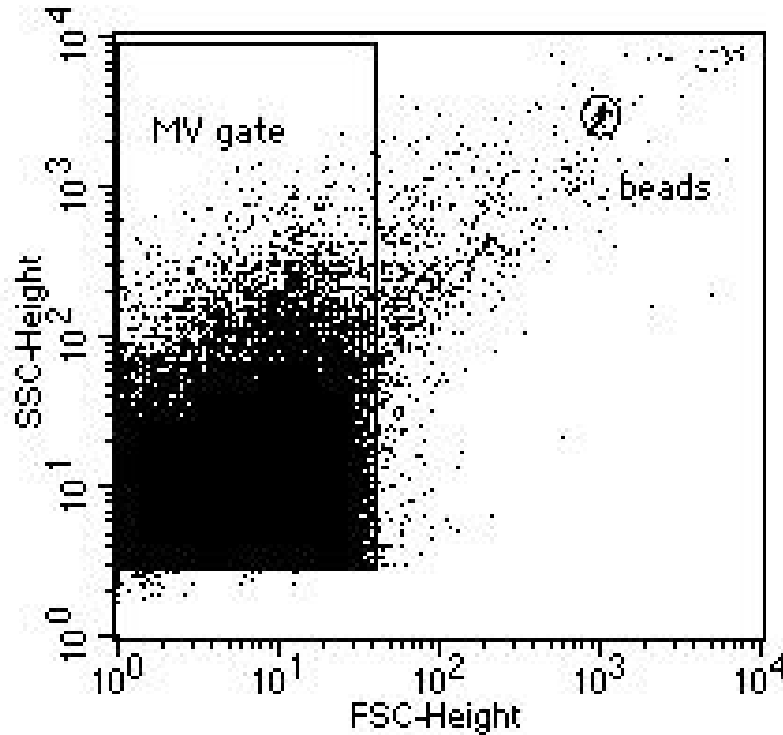
A készülék kalibrálása

FACSCalibur (Becton Dickinson San Jose California, USA)



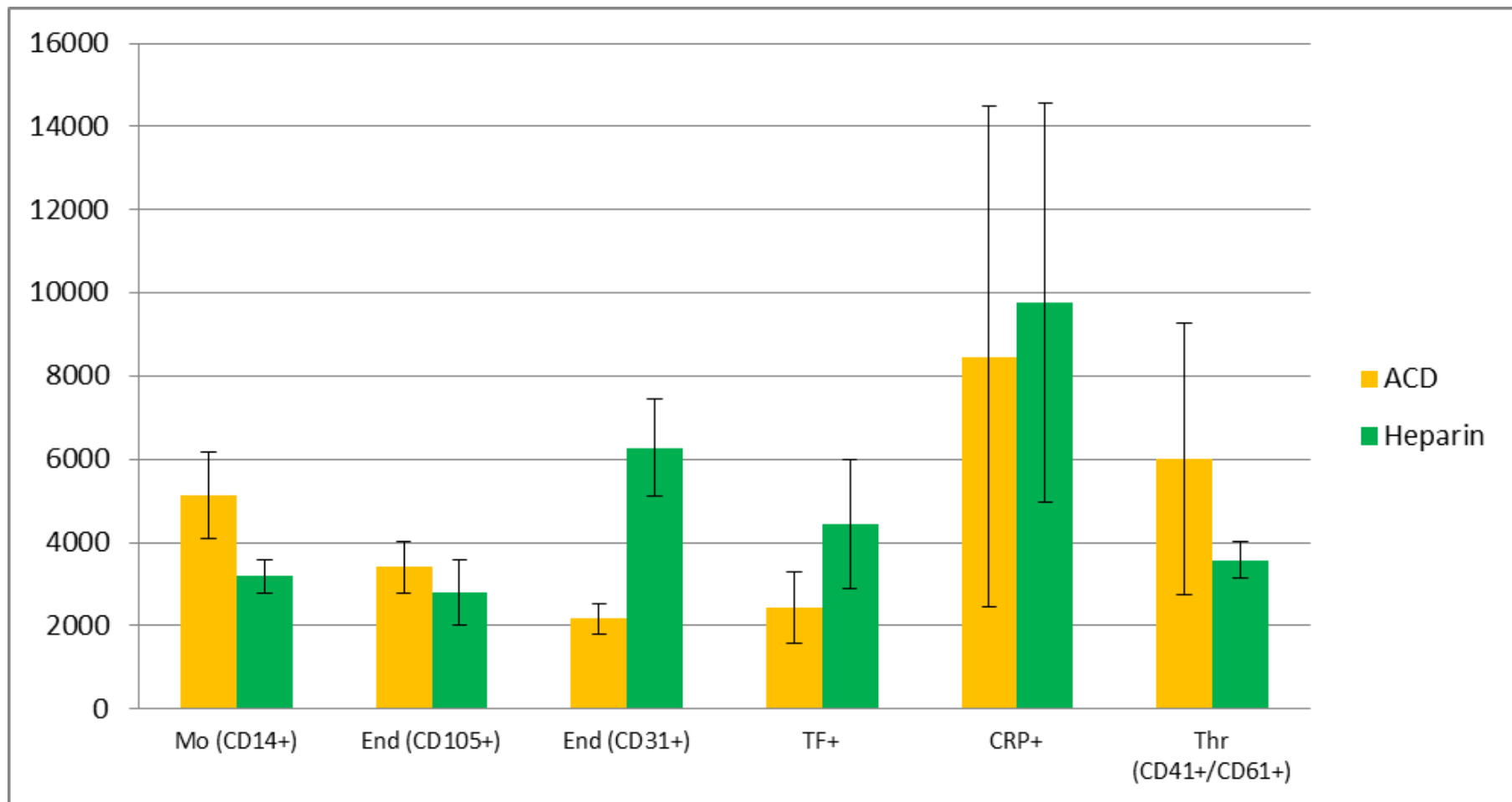
MEGAMIX BEADS
SILICA BEADS

Abszolút vezikula szám meghatározás polisztirén referencia gyönggyökkel

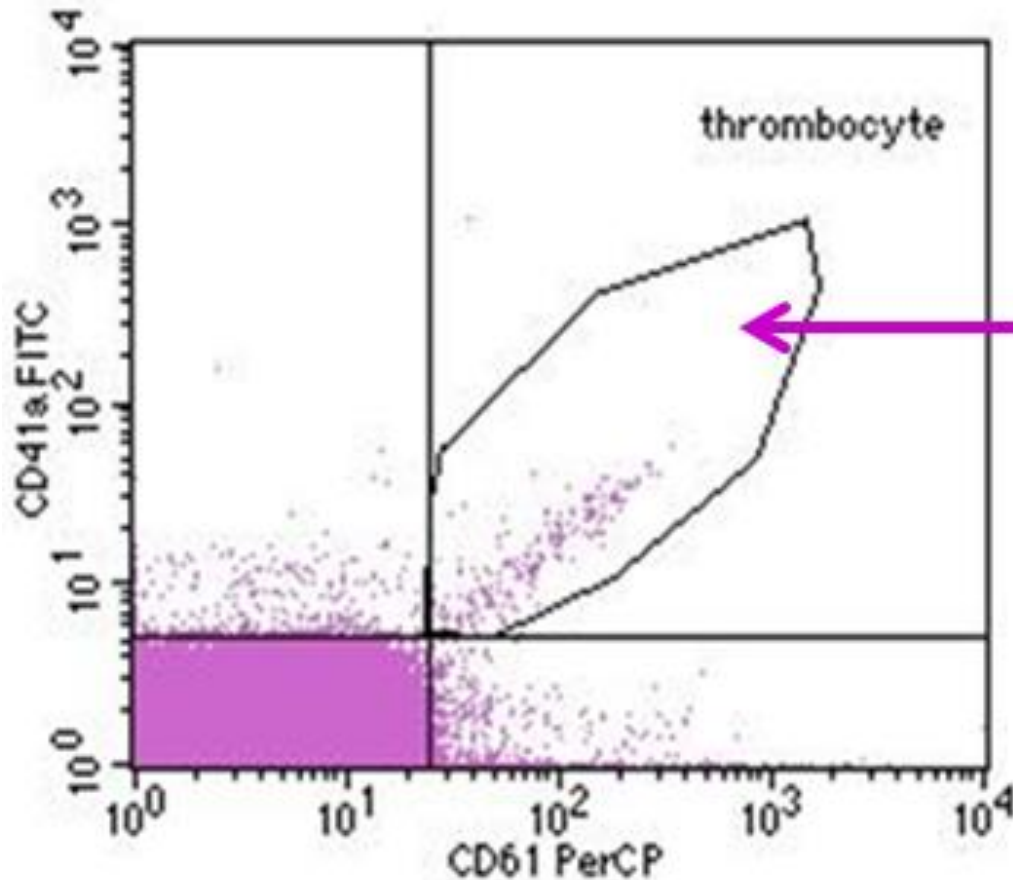


detektált gyöngyök száma : összes csőbe beletett gyöngy = detektált MV száma : összes mintában található MV

Keringő EV mintázat a betegcsoportban



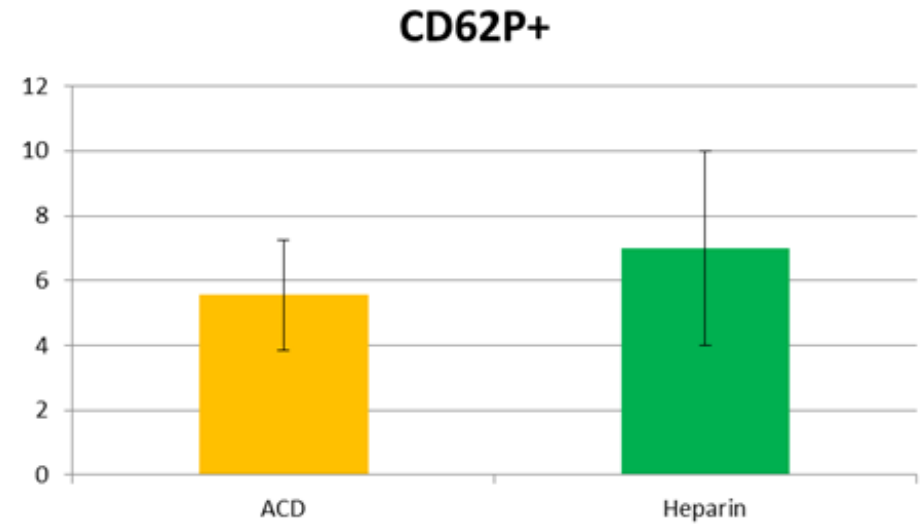
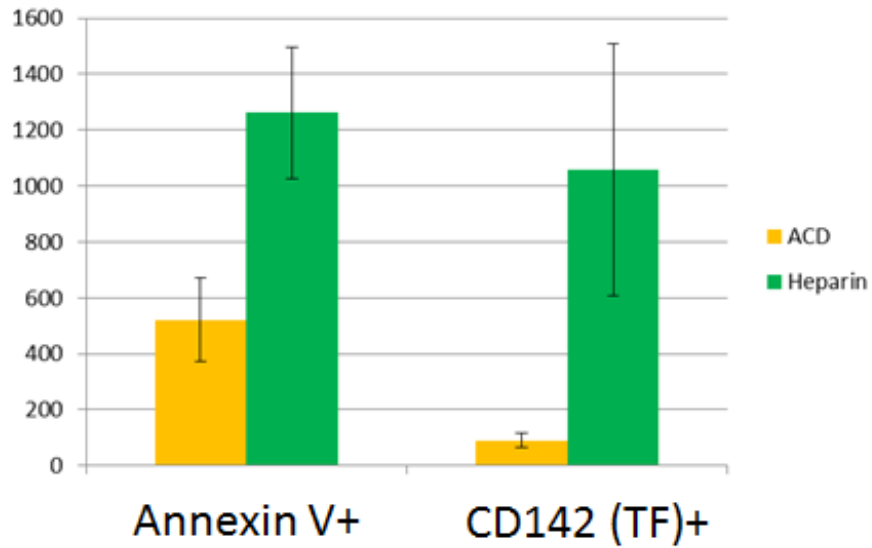
Keringő trombocita eredetű MV-k azonosítása



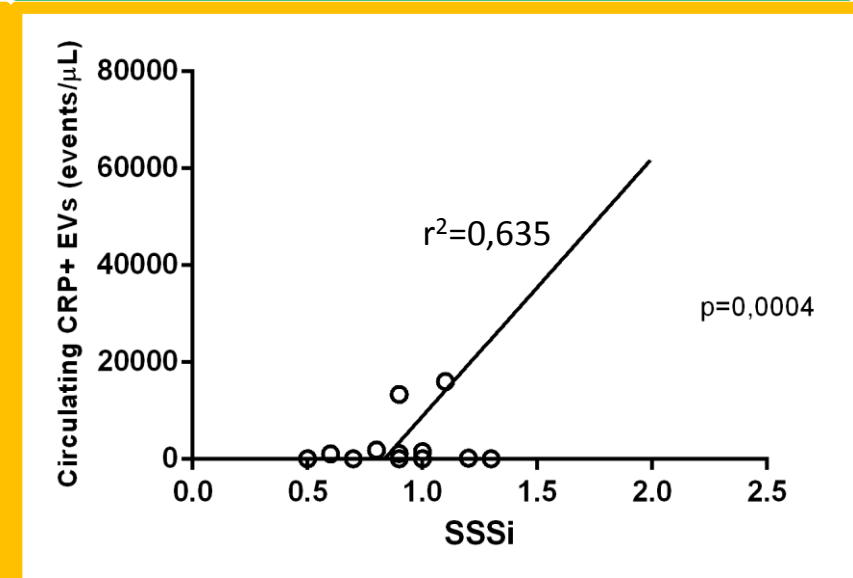
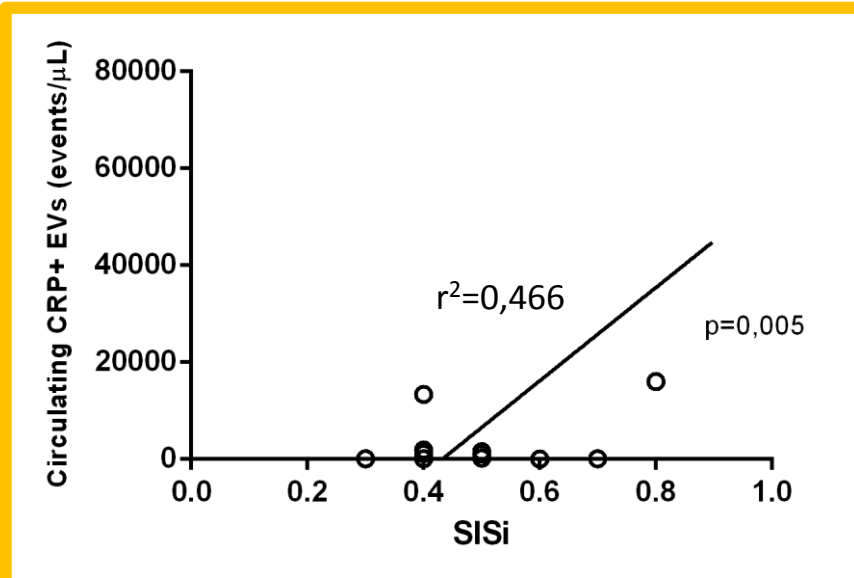
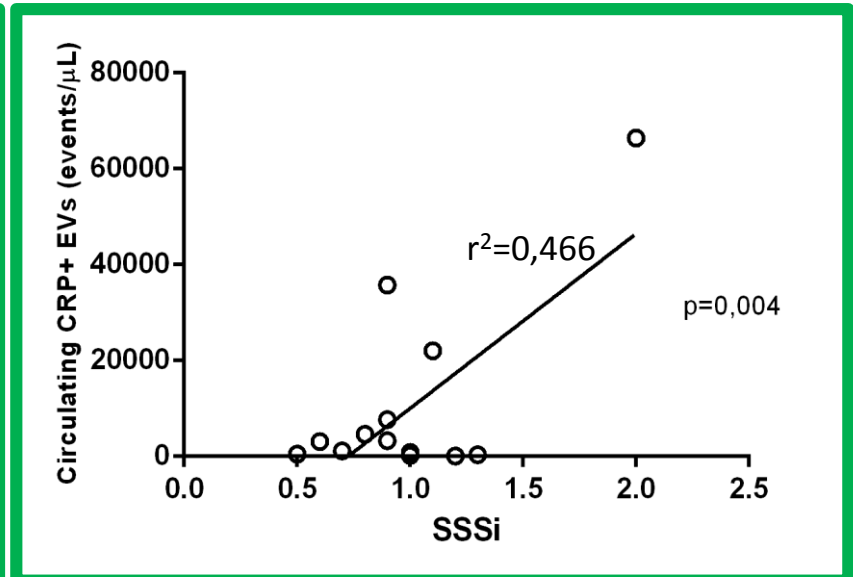
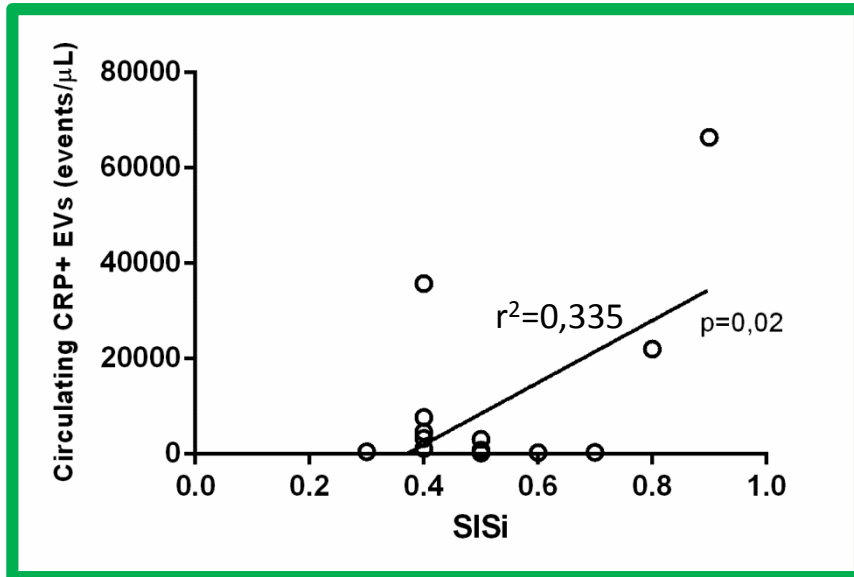
CD41a+/CD61+ thrombocyt
(thrombocyt kapu definiálása)

Aktivált thrombocytákból származó MV-k azonosítása a CD62P (P szelektin) ill. az AnnexinV expresszió alapján történt.

Keringő aktivált trombocita eredetű MV-k



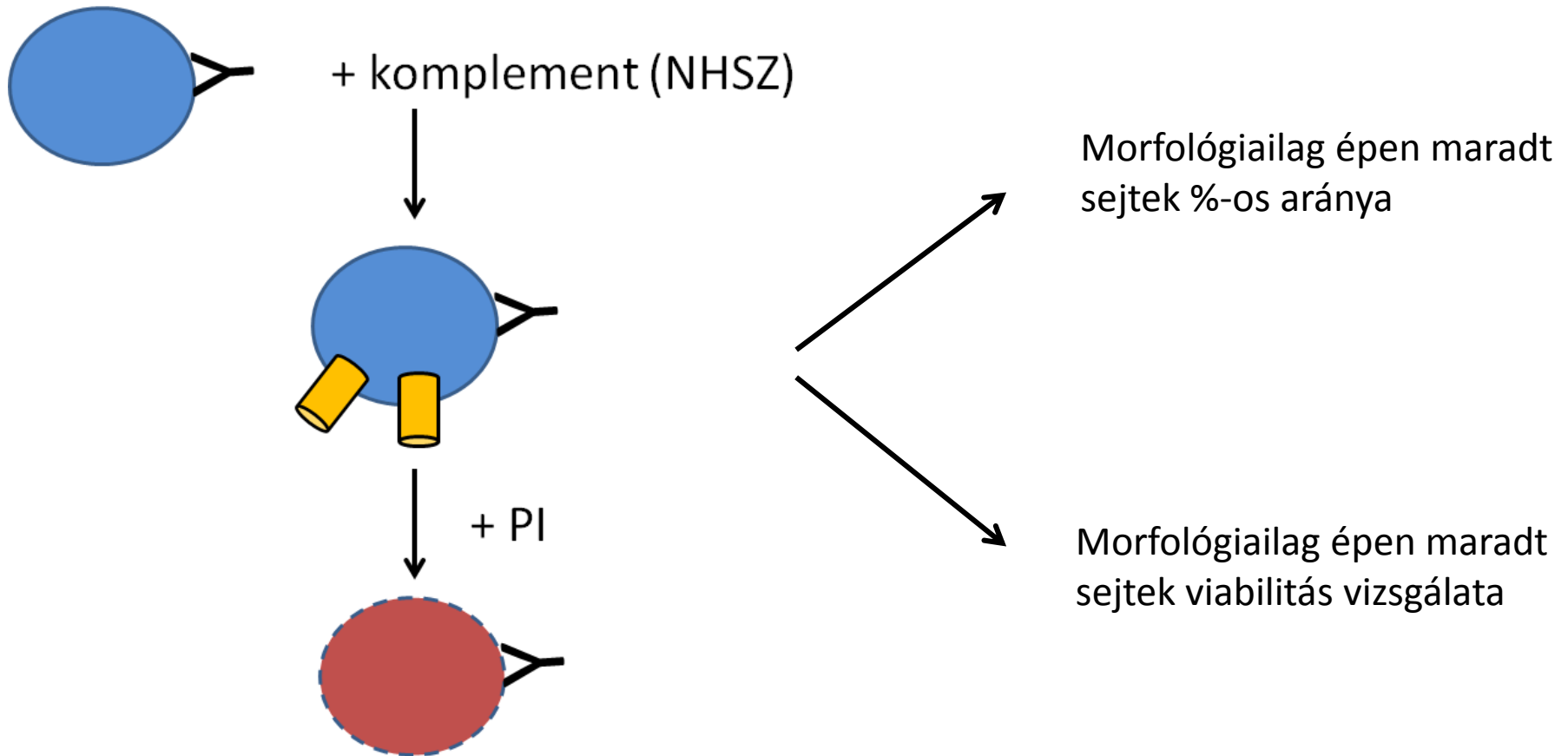
Pozitív korreláció van a plakk terheltséget jellemző pontrendszeres és a CRP+ EV-k között



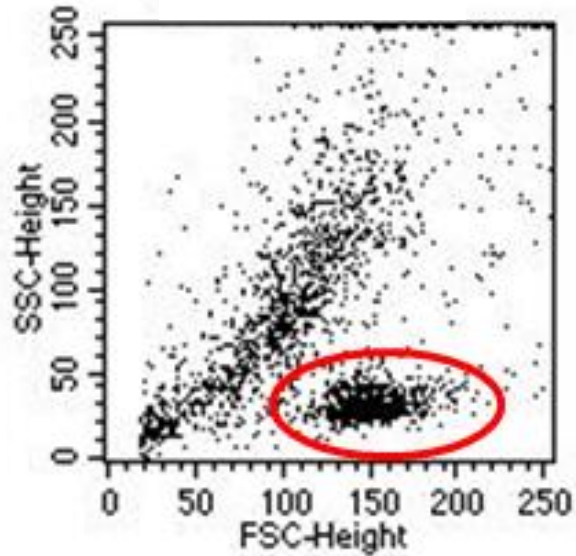
***In vitro* modell rendszer:**

EV – CRP kölcsönhatások vizsgálata

1/a Komplement közvetített cytotoxicitás vizsgálat (CDC) flow cytométerrel



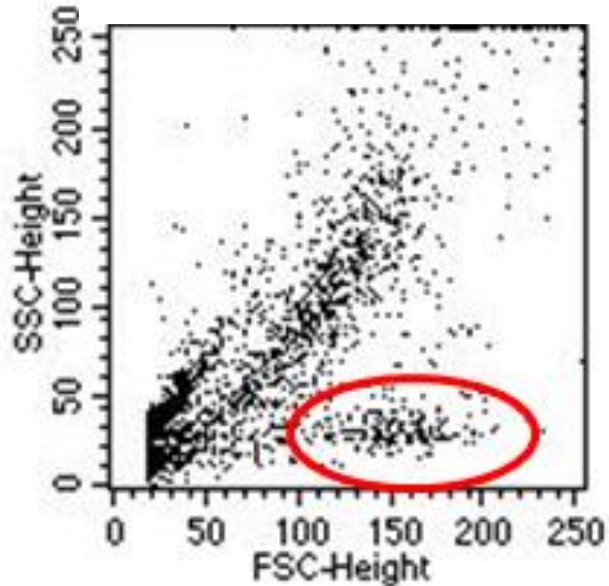
KEZELETLEN



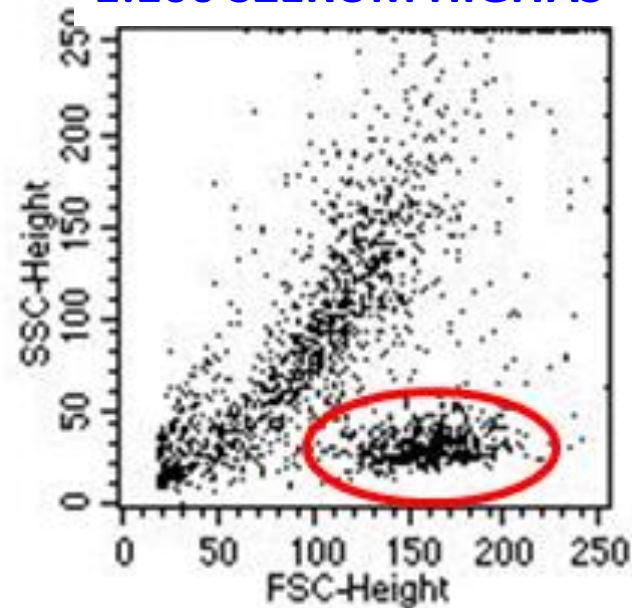
Koncentráció függés vizsgálata

Morfológiailag épen maradt
sejtek %-os aránya

1:10 SZÉRUM HIGÍTÁS

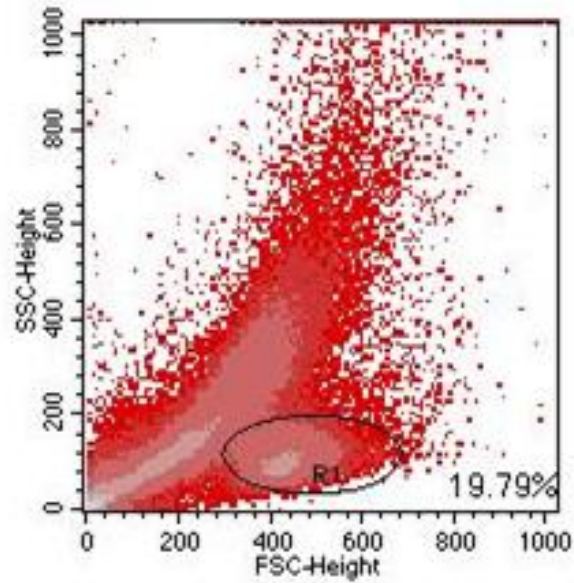


1:100 SZÉRUM HIGÍTÁS

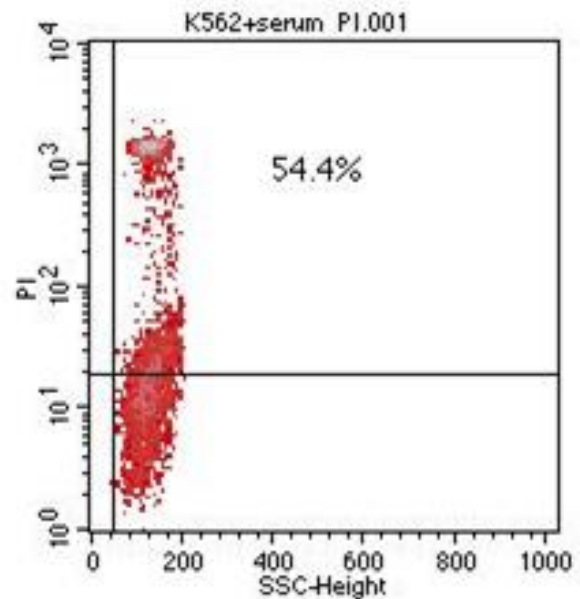
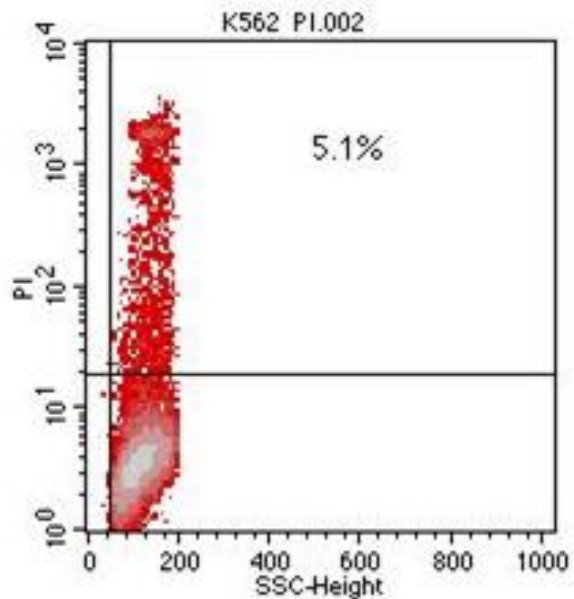
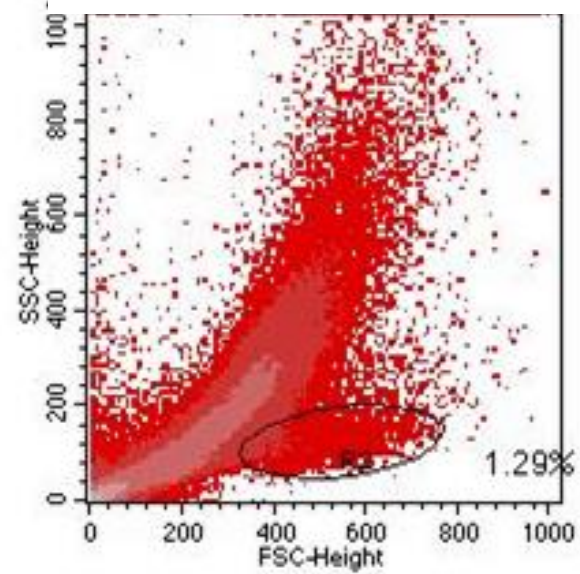


Viabilitás vizsgálat

KEZELETLEN

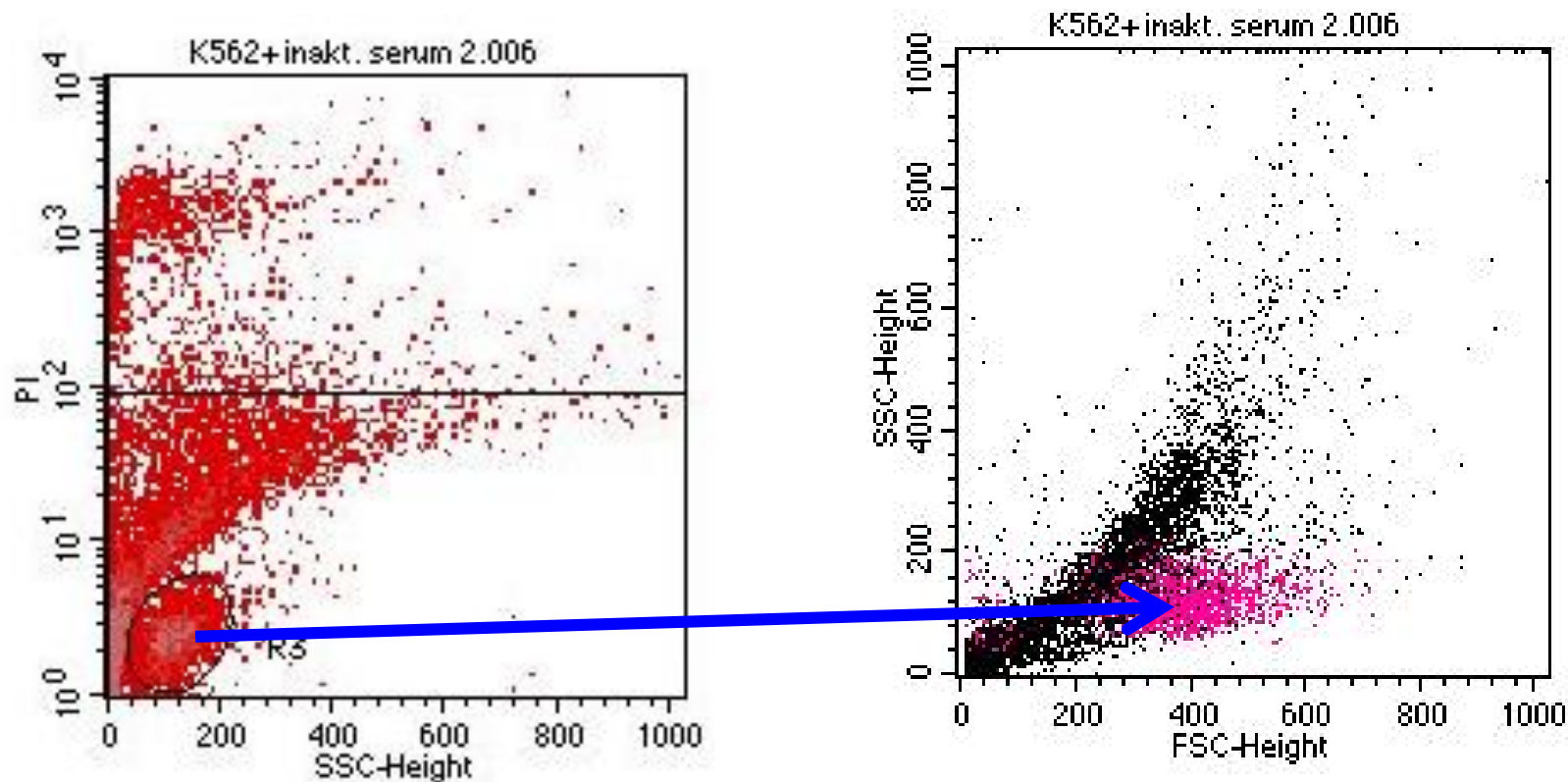


1:10 SZÉRUM HIGÍTÁS



Hőinaktiválás hatásának vizsgálata

Morfológiailag épen maradt
sejtek viabilitás vizsgálata



A reprezentatív ábra azt mutatja, hogy az inaktivált szérummal kezelt mintában detektálható egy kifejezett PI- populáció, ami a „color gating” alapján megfelel a morfológiailag épen maradt sejteknek.

1/b Befolyásolja-e a CDC-t az EV-k jelenléte?

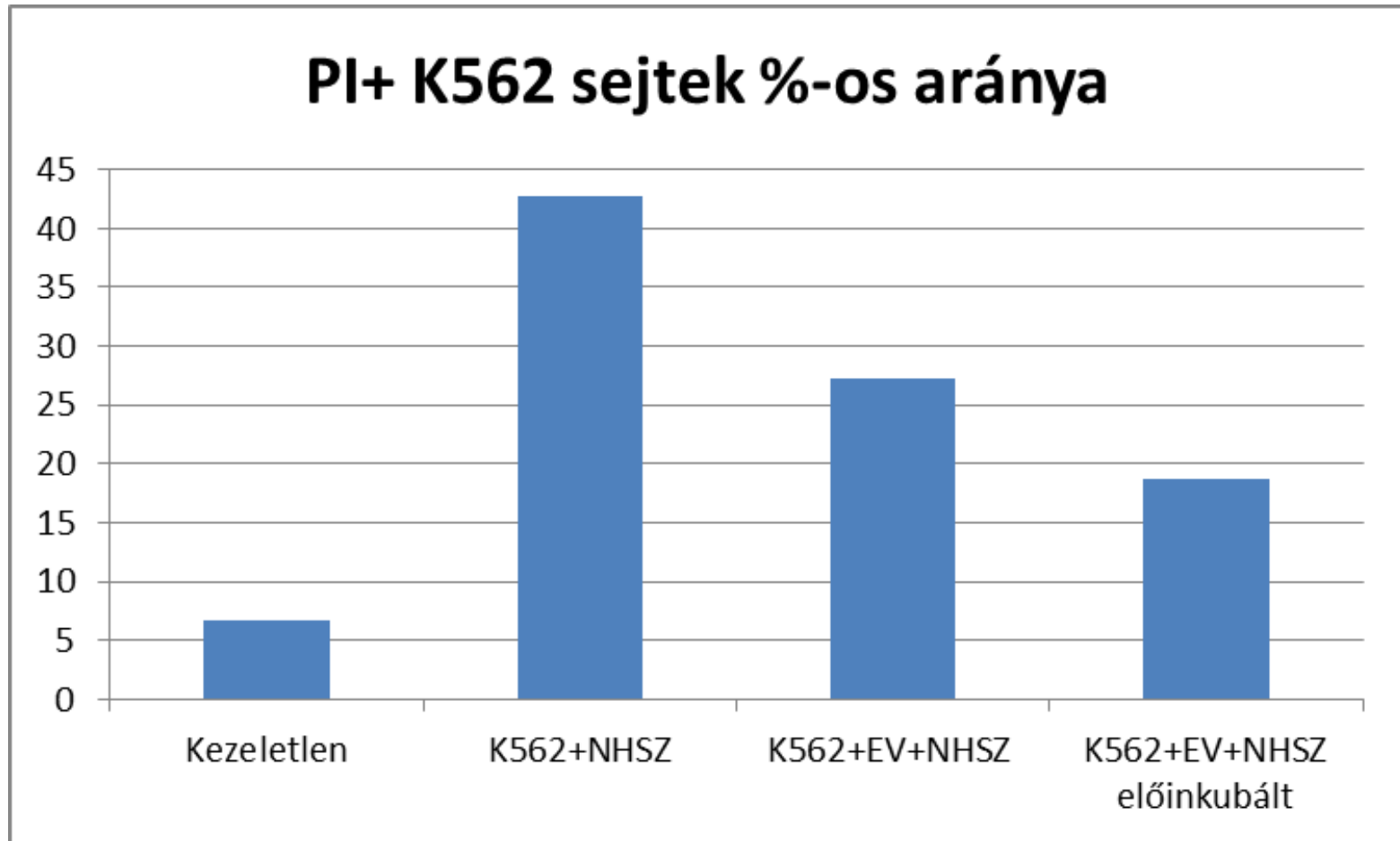
EV forrás: U937 sejtek felülúszójából centrifugálással izolált vezikulák

Célkitűzés: EV-k komplement közvetített citolízisre gyakorolt hatásának vizsgálata.

Kísérleti rendszerek:

1. K562 szenzitizált sejtek + NHSZ (1:10)
2. K562 szenzitizált sejtek + EV(K562) + NHSZ (1:10) (egyszerre volt a rendszerben a NHSZ és az EV)
3. K562 szenzitizált sejtek + EV-val előinkubált NHSZ
4. Kontroll: kezeletlen szenzitizált K562 sejtek

EV jelenlétében a NHSZ indukálta sejtpusztulás mértéke kisebb



n=3; Kísérletenként 3 párhuzamos mérés

1/c CRP CDC-re gyakorolt hatásának vizsgálata

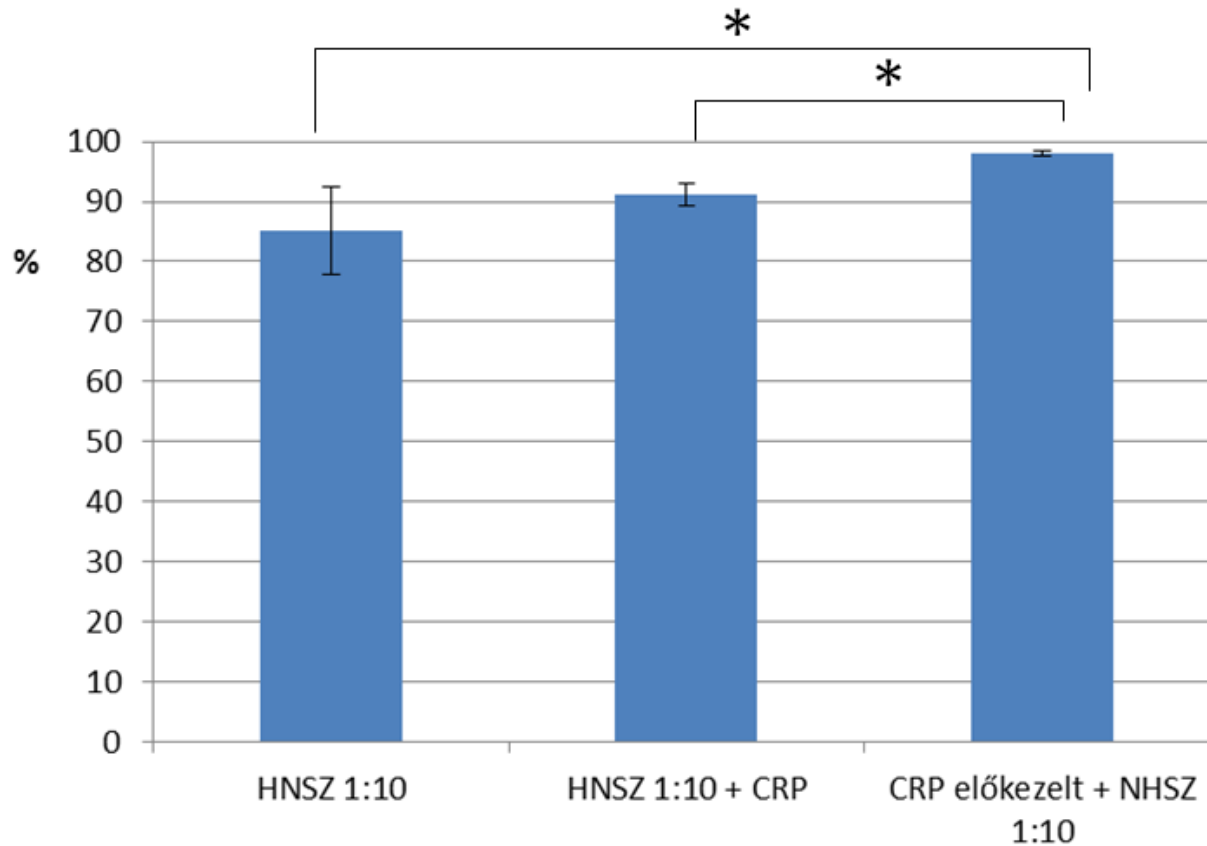
Célkitűzés: CRP komplement közvetített citolízisre gyakorolt hatásának vizsgálata.

Kísérleti rendszerek:

1. K562 szenzitizált sejtek + NHSZ (1:10)
2. K562 szenzitizált sejtek + rCRP + NHSZ (1:10) (egyszerre volt a rendszerben a NHSZ és a CRP)
3. K562 szenzitizált sejtek + CRP-vel előinkubált NHSZ
4. Kontroll: kezeletlen szenzitizált K562 sejtek

CRP előkezelés után a NHSZ indukálta sejtpusztulás mértéke fokozott

Elpusztult K562 sejtek %-os aránya



n=3; Kísérletenként 3 párhuzamos mérés

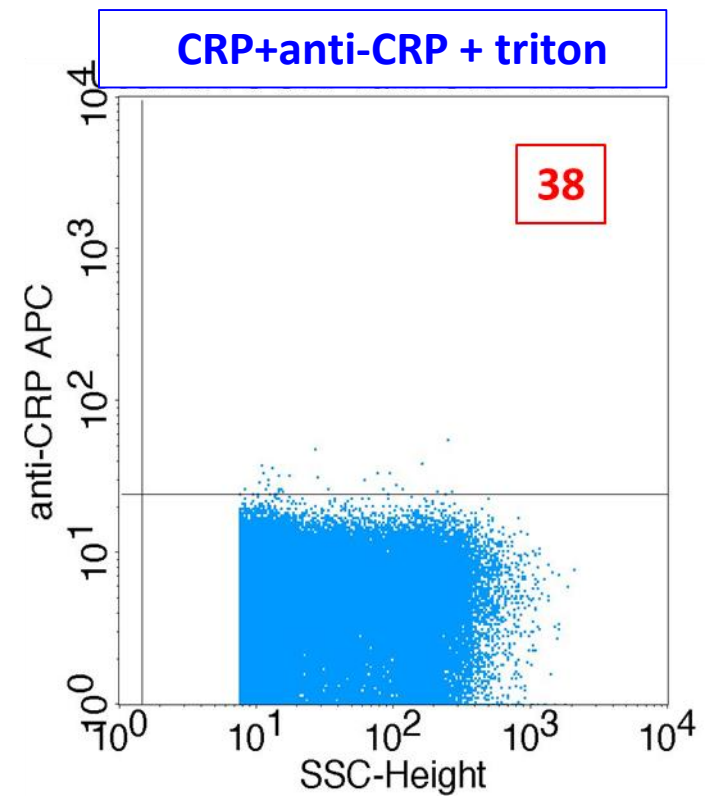
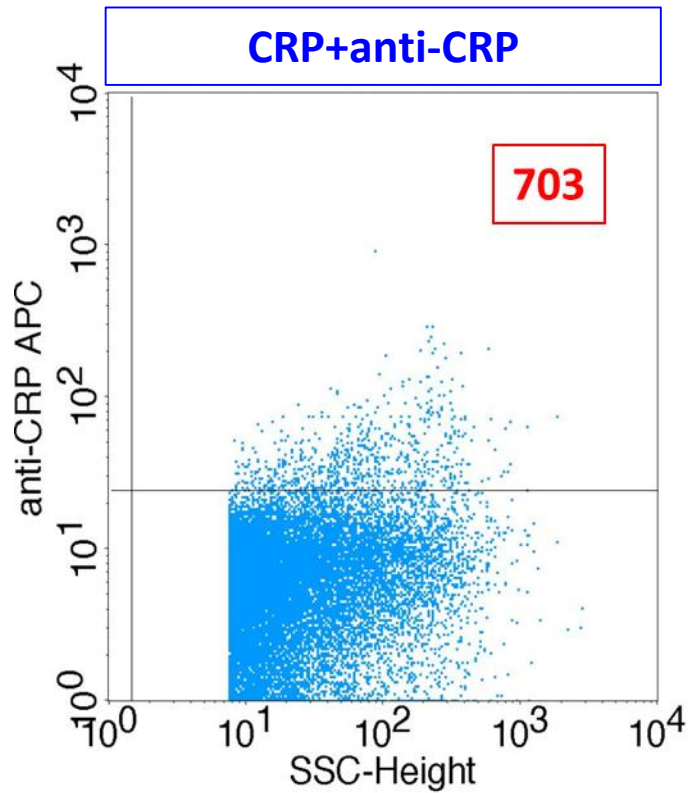
1/d EV-k CRP kötésének vizsgálata

Célkitűzés: EV-k CRP kötésének vizsgálata.

Módszerek:

- a. Human rekombináns CRP U937 sejtvonala felülúszójából izolált MV-k (MV(U937)) –
hoz történő kötődésének vizsgálata
- b. A CRP koncentráció CRP -MV(U937) kötődést befolyásoló hatásának vizsgálata

A rCRP kötődik az EV-hoz



A CRP koncentráció növelése nem befolyásolta a rCRP EV-hoz történő kötődését

Alkalmazott CRP koncentrációk : 1 mg/L; 3 mg/L; 5 mg/L

hs-CRP Value	Cardiovascular Disease Risk Level*
< 1 mg/L	low risk
1-3 mg/L	average risk
> 3 mg/L	high risk

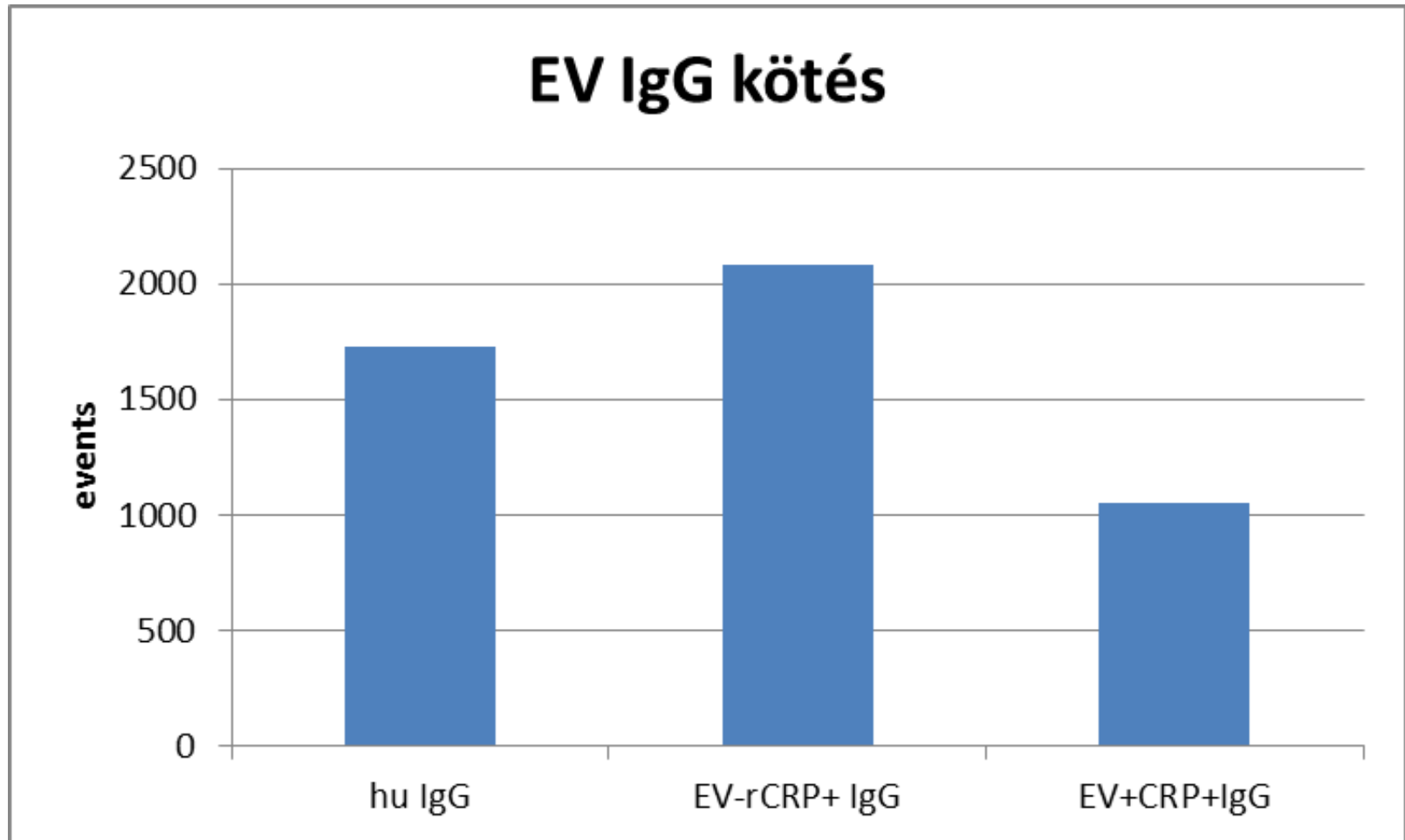
1/e A CRP EV-k immunglobulin-kötő képességére gyakorolt hatásának vizsgálata

Célkitűzés: EV-k IgM és IgG kötésének vizsgálata CRP jelenlétében.

Módszerek:

- a. U937 sejt vonal felülúszójából izolált MV-k (MV(U937)) IgG kötésének vizsgálata
- b. U937 sejt vonal felülúszójából izolált MV-k IgM kötésének vizsgálata
- c. U937 sejt vonal felülúszójából izolált MV-k Ig kötésének vizsgálata CRP jelenlétében:
 1. MV(U937) + CRP → mosás → IgM kötés
 2. MV(U937) + CRP → mosás → IgG kötés
 3. CRP + IgM → kötődés MV(U937)
 4. CRP + IgG → kötődés MV(U937)
 5. MV(U937) CRP kötésének vizsgálata: MV(U937) + CRP → mosás → + anti-CRP

EV humán IgG kötésének vizsgálata CRP jelenlétében

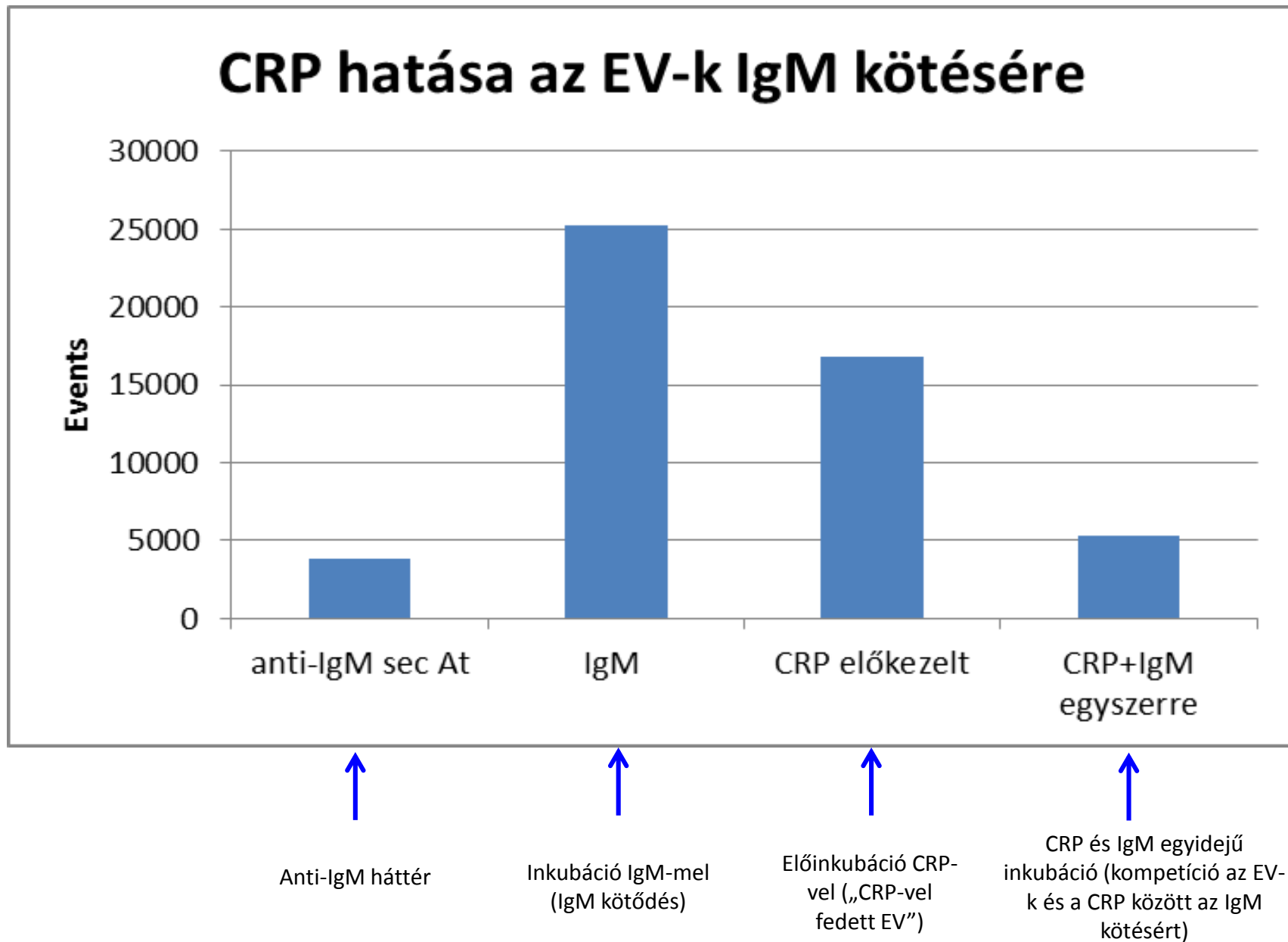


↑
Inkubáció IgG-vel (IgG kötődés)

↑
Előinkubáció CRP-vel („CRP-vel fedett EV”)

↑
CRP és IgG egyidejű inkubáció (kompetíció az EV-k és a CRP között az IgG kötésért)

EV humán IgM kötésének vizsgálata CRP jelenlétében



1/f Glükóz koncentráció hatása az EV-k immunoglobulin kötő képességére, CRP jelenlétében és hiányában

Célkitűzés: Eltérő glükóz koncentrációjú sejttenyésztő médiumban tenyésztett sejtek felülúszójából izolált EV-k IgM és IgG kötésének vizsgálata CRP jelenlétében.

Módszerek:

Sejttenyésztés:

FCS tartalom: 10% FCS

glukóz koncentráció: 11,1 mM (2 g/L); 20 mM (3,6 g/L); 30 mM (5,4 g/L)

tenyésztési idő: 48 óra

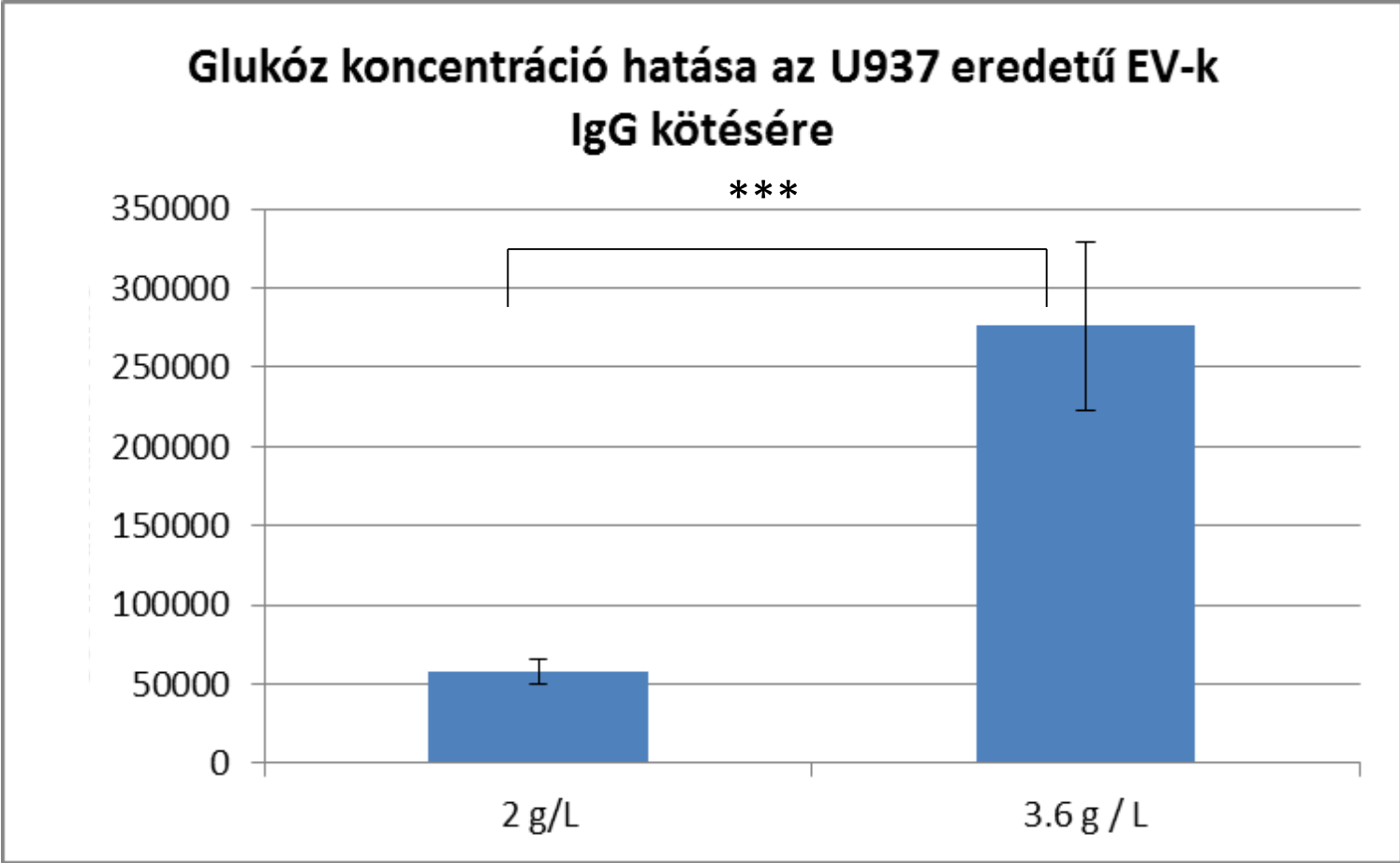
Vezikula szeparálás előtt:

FCS tartalom: 0% FCS (FCS mentes táp)

glukóz koncentráció: 11,1 mM (2 g/L); 20 mM (3,6 g/L); 30 mM (5,4 g/L)

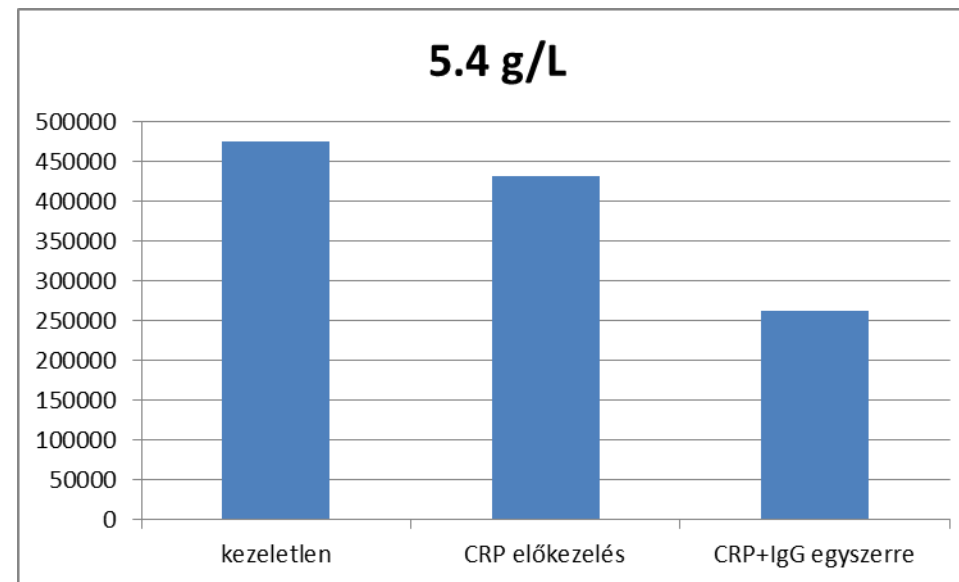
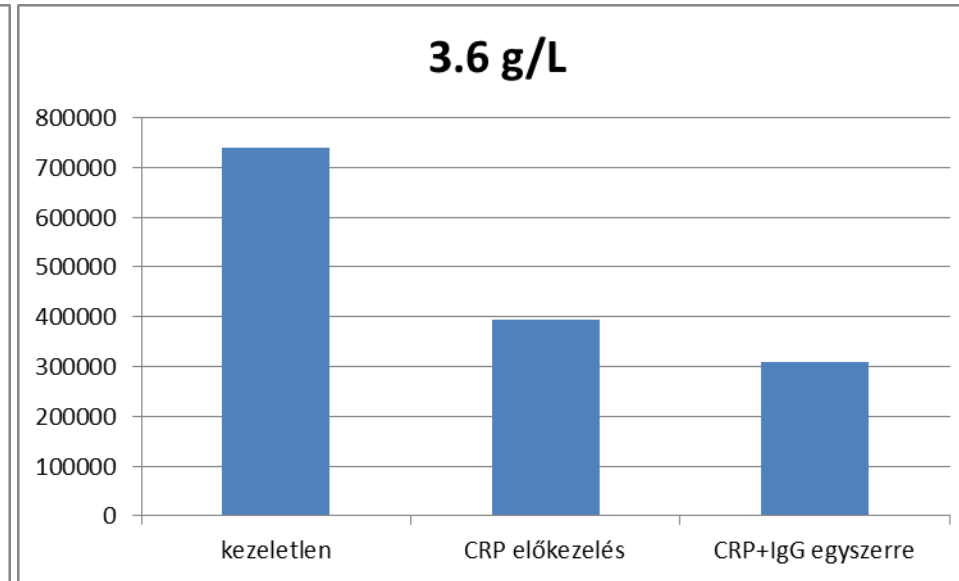
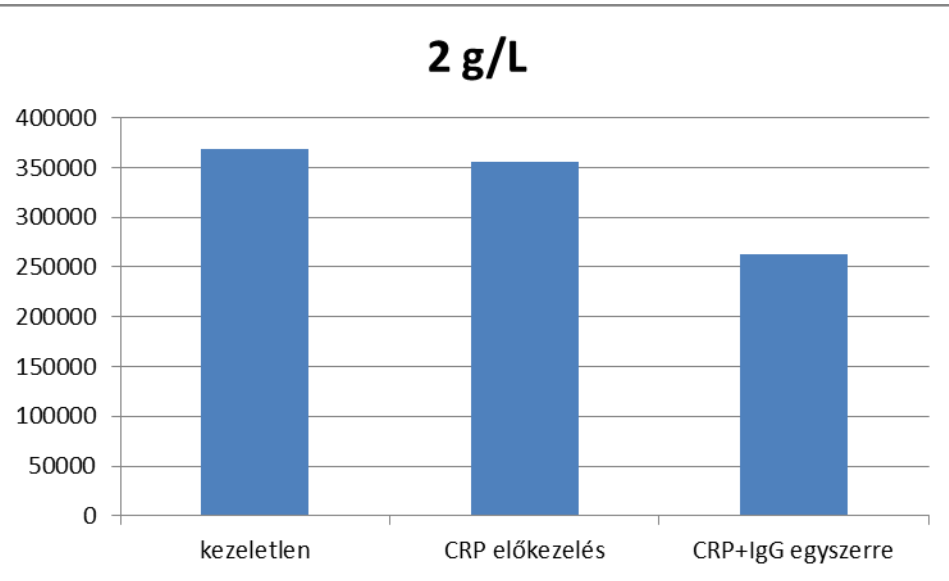
tenyésztési idő: 24 óra

Magasabb glükóz koncentráció mellett több U937 eredetű EV-hoz kötődik IgG



n=6; kísérletenként 2 párhuzamos mérés

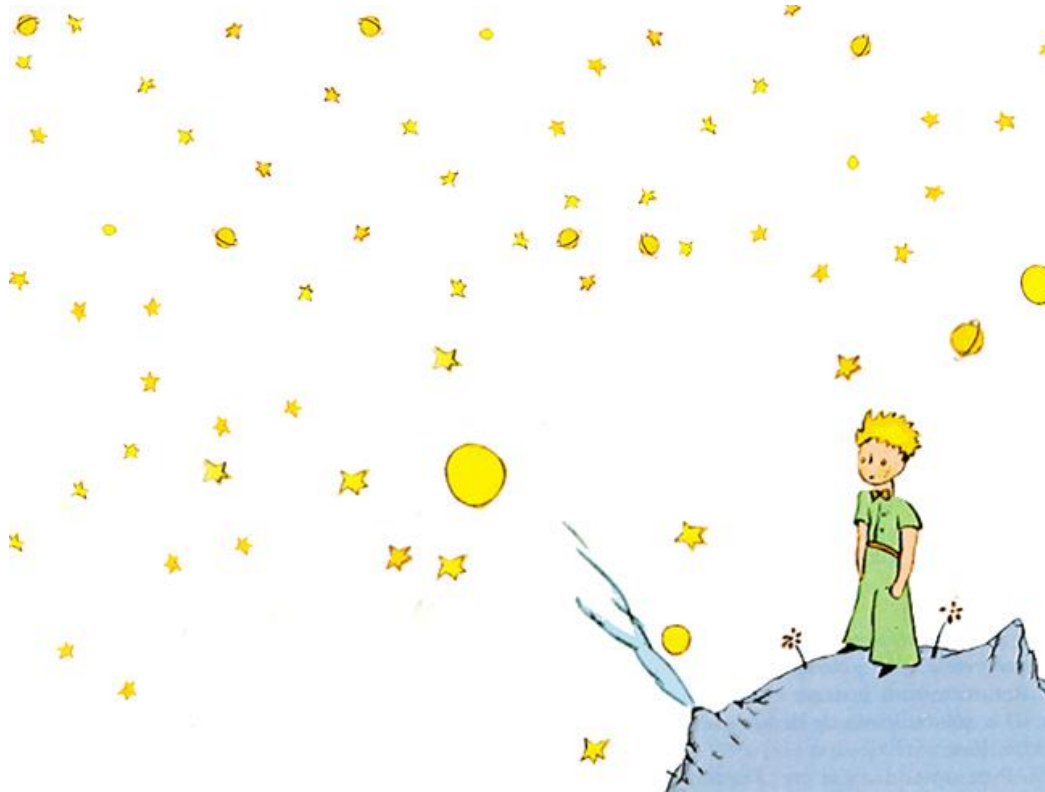
CRP előkezelés után kevesebb EV-hoz kötődik IgG



Összefoglalás

1. Megkezdődött a betegek beválogatása:
 1. Megtörtént a beválasztott betegek koszorúér CTA vizsgálata és az eredmények kiértékelése.
 2. Megtörtént a beválasztott betegek laboratóriumi vizsgálata.
 3. Megkezdődött a beválasztott betegek keringő EV mintázatának jellemzése többszínű FACS módszerrel. **Korrelációt találtunk a plakk terheltséget jellemző pontrendszerek és a CRP+ EV-k között.**
 4. Megtörtént az adatbázis létrehozása , ill. megkezdődött a feltöltése.
2. Flow cytometriás komplement mediálta cytotoxicitás vizsgálati módszert fejlesztettünk ki.
3. Kimutattuk, hogy EV jelenlétében a NHSZ (normál humán szérum) indukálta CDC mértéke alacsonyabb.
4. Igazoltuk, hogy CRP jelenlétében az NHSZ indukálta CDC mértéke fokozódik.
5. Igazoltuk, hogy a rekombináns CRP kötődik az EV-khoz.
6. Igazoltuk, hogy a CRP megváltoztatja az EV-k immunglobulin-kötő képességét.
7. Igazoltuk, hogy a z eltérő glükóz koncentrációjú sejttenyésztő médiumban tenyésztett EV-k immunoglobulin kötő képessége eltérő.
8. Igazoltuk, hogy az eltérő glükóz koncentrációjú sejttenyésztő médiumban tenyésztett EV-k immunoglobulin kötő képességét nem befolyásolja a CRP (elő)kezelés.

Köszönöm a figyelmet!



„Jól csak a szívével lát az ember...”