

Humán antimikrobiális immunválasz vizsgálata kísérletes és bioinformatikai módszerekkel

PhD értekezés

Dr. Kristóf Katalin

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Biológiai Doktori Iskola, Immunológia Program



ELTE Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék

Témavezető: Dr. Bajtay Zsuzsa PhD, egyetemi docens

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Erdei Anna, egyetemi tanár

Programvezető: Prof. Dr. Erdei Anna, egyetemi tanár

2013.

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	6
1.1 A sepsis fogalma és általános jellemzői	6
1.2 Az intestinalis nyálkahártya élettani körülmények között	9
1.3 A „bél mint a sepsis motorja” elmélet	13
1.4 A komplementrendszer és a dendritikus sejtek szerepe az immunválaszban	19
2. Célkitűzések	24
3. Módszerek	25
3.1 Az immunválasz effektor fázisának vizsgálata: molekuláris mimikri szerepe a sepsis kórélettanában	25
3.1.1 A vizsgálatunkban szereplő betegcsoport	25
3.1.2 A molekuláris mimikri matematikai megközelítése	27
3.1.3 Statisztikai értékelés	29
3.2 Az immunválasz indukciós szakaszának vizsgálata: komplement- receptorok szerepének vizsgálata az antigénbemutatásban	30
3.2.1 A felhasznált reagensek és antitestek	30
3.2.2 Emberi MDC-k előállítása, érésük nyomon követése	30
3.2.3 Áramlási citometria	31
3.2.4 Lézerpásztázó konfokális mikroszkópia	32
3.2.5 MLR teszt	32
3.2.6 Citokinszintek mérése	32
3.2.7 Opszonizált antigén phagocytosisa	33
3.2.8 RNS csendesítés	33
3.2.9 A sejthez kötött iC3b és CR3 internalizációja	34
3.2.10 Statisztikai értékelés	34
4. Eredmények	35
4.1 Az immunválasz effektor fázisának vizsgálata: molekuláris mimikri szerepe a sepsis kórélettanában	35

4.1.1 A vizsgálatunkban szereplő betegek jellemzői.....	35
4.1.2 A molekuláris mimikri és a betegség súlyosságának3 összefüggése.....	35
4.1.3 A molekuláris mimikri és a betegség kimenetelének összefüggése.....	36
4.1.4 Immunológiai keresztreaktivitás Gram pozitív és Gram negatív kórokozó specierek esetében.....	39
4.2 Az immunválasz indukciós szakaszának vizsgálata: komplement- receptorok szerepének vizsgálata az antigénbemutatásban	40
4.2.1 Komplementreceptorok expressziója emberi MDC-ken	40
4.2.2 Az iC3b és iC3b által opszonizált partikulumok felvétele éretlen MDC-kbe.....	41
4.2.3 A CR3 domináns szerepe az iC3b-vel opszonizált antigén felvételében	43
4.2.4 A CR3 és CR4 sorsa az iC3b-vel opszonizált antigén felvétele során	47
4.2.5 A CR3 keresztkötése nem vezet a DC-k éréséhez.....	49
4.2.6 A CR3 ligandkötése nem befolyásolja a DC-k T-sejt aktivációját és citokintermelését	50
5. Diskusszió.....	52
6. Összefoglalás.....	58
7. Summary.....	59
8. Irodalomjegyzék.....	60
9. Saját publikációk jegyzéke	73
9.1 A dolgozat alapját képező közlemények	73
9.2 9.2 A dolgozathoz közvetlenül nem kapcsolódó közlemények.....	74
10. Köszönetnyilvánítás	75

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- ADCC** - antitest-dependens celluláris citotoxicitás
- AIDS** - szerzett immunhiányos tünetegyüttes
- APACHE II** - acute physiology and chronic health evaluation II
- APC** - antigénprezentáló sejt
- ARDS** - akut respirációs distressz szindróma
- BAL** - broncho-alveolaris lavage
- BMI** - testtömegindex
- CARS** - kompenzatórikus antiinflammatorikus reakció
- CD** - cluster of differentiation
- COPD** - krónikus obstruktív tüdőbetegség
- CR** - komplement receptor
- DC** - dendritikus sejt
- DTH** - késői típusú túlérzékenység
- EBI** - European Bioinformatics Institute
- FPR** - formylated peptide receptor
- GALT** - bélhez kapcsolódó lymphoid szövet
- HIS** - hőinaktivált szérum
- HMGB1** - high mobility group 1
- HSP** - hősokkfehérje
- Ig** - immunglobulin
- IGF1** - inzulinszerű növekedési faktor 1
- iIEL** - intestinalis intraepithelialis lymphocyt
- IL** - interleukin
- imDC** - éretlen dendritikus sejt
- INF** - interferon
- InfQ** - inflammációs kvóciens
- IPAF** - IL-1 β -converting enzyme protease activator factor
- LPS** - lipopoliszacharid
- mAb** - monoklonális antitest
- maDC** - érett dendritikus sejt

MARS - kevert antagonisztikus válaszreakció
MASP - MBL-asszociált szerin-proteáz
MBL - mannózkötő lektin
MDC - monocyta eredetű dendritikus sejt
MHC - fő hisztokompatibilitási antigén
MLR - kevert leukocyta reakció
MODS - sokszervi diszfunkciós szindróma
MR - mannose receptor
NO - nitrogén-monoxid
NOD - nucleotide binding oligomerization-like receptor
PBS - phosphate-buffered saline
QS - quorum sensing
RAGE - receptor of advanced glycation endproducts
rHu - rekombináns humán
RNS - ribonukleinsav
SIRS - szisztémás gyulladós válaszreakció
TCR - T-sejt receptor
TFF3 - trefoil faktor 3
TGF - transforming growth factor
TLR - Toll-like receptor
TNF - tumor nekrosis faktor
TPN - teljes parenteralis táplálás

1. BEVEZETÉS

1.1 A sepsis fogalma és általános jellemzői

A sepsis egy fertőzés által kiváltott, szisztémás gyulladással járó válaszütemmel kísért összetett tünetegyüttes, mely előrehaladott esetben szervdiszfunkciókkal (súlyos sepsis), illetve shockos keringéssel jár (septicus shock), és a beteg halálához vezethet [1]. A modern orvostudomány talán legnagyobb áttörései, az antibiotikumok és a vakcináció lehetőségének felfedezése ellenére a fertőző betegségek, köztük a sepsis okozta közegészségügyi probléma sajnos napjainkra sem vált jelentéktelenné – ehhez hozzájárul a populáció elöregedése, a krónikus betegek nagy száma, és az implantálható idegentestek (pl. protézisek, pacemaker) széleskörű elterjedése is. Az intenzív osztályok mindennapjai során igen nagy, sőt emelkedő számban képviseltetik magukat a súlyos, életveszélyes fertőzésekkel küzdő betegek, ami orvos-szakmailag és az egészségügyi költségvetés szempontjából is nagy kihívást jelent. Mind a sepsis kórlelettanának megértésében, mind az intenzív terápiás betegellátás színvonalában jelentős előrelépés történt az elmúlt évek, évtizedek során, ennek ellenére a sepsis halálozása a mai napig elfogadhatatlanul magas. Angliai – észak-írországi adatok alapján 1996 és 2004 között a súlyos sepsis halálozása alig csökkent (48,3%-ról 44,7%-ra), viszont a sepsishez kapcsolódó halálesetek abszolút száma több, mint másfélszeresére nőtt [2].

A betegek kilátásainak javítása érdekében, a „Surviving Sepsis Campaign” keretein belül nemzetközi irányelveket fogalmaztak meg, melyek egységesítették a septicus betegek ellátásának alapelveit [3-8]. Az erőfeszítések eredményeképpen viszonylag alacsony, 5,4%-os mortalitás-csökkenést sikerült elérni két éves vizsgálati periódus alatt [9, 10]. Ennek oka – legalábbis részben – az lehet, hogy míg az irányelvek részletesen tárgyalják a korrekt mikrobiológiai diagnózis, antibiotikus terápia, gőckezelés és szervtámogató-szupportív intenzív ellátás részleteit, igen kevés szó esik az érem másik oldaláról, a szervezet kórokozóra adott immunológiai válaszüteméről. A nemzetközi ajánlások megírói valóban nehéz helyzetben vannak, mert a nagy számú alapkutatás ellenére igen keveset tudunk a sepsis immunológiájáról. A kezdeti gyulladás-immunológiai eredmények alapján létrejött

az az elmélet, mely szerint a septicus betegnél a kórokozóra adott szisztémás gyulladási reakció (SIRS, systemic inflammatory response syndrome) alakul ki, melyre a gyulladási citokinek (többek között TNF α , IL-1 β , INF γ , IL-6) túlzott, inadekvát termelődése jellemző, hozzájárulva a shock, szövetkárosodás és szervelégtelenség kialakulásához [11-13]. Emellett bevezetésre került a kompenzatorikus immunszupprimált állapot, a CARS (compensatory anti-inflammatory response syndrome) és a mindkét állapot jellegzetességeit mutató MARS (mixed agonist response syndrome) fogalma is [14]. Mindezek alapján történtek próbálkozások a immunmodulációs kezelésre sepsisben, az anti-citokin terápia azonban csalódást okozott, várakozáson aluli eredmények születtek [15]. A sepsis immunológiájával kapcsolatos kutatások folytatódtak, és egyre inkább körvonalazódik, hogy a sepsis nem egységes betegség, hanem egy klinikailag ugyan hasonló tüneteket produkáló, de immun-pathomechanizmusát tekintve rendkívül heterogén szindróma [16-19]. Csak néhány ponton beavatkozva, a betegség és a betegek heterogenitását, valamint a folyamat időbeli dinamikáját figyelmen kívül hagyva nem lehet jelentős eredményeket elérni.

Viszonylag korán ismertté vált, hogy a septicus beteg immunológiai státusza függ a kórokozó típusától [19, 20]. Annak ellenére, hogy *in vitro* kísérletek során Gram pozitív baktériumok is hatékonyan indukálták proinflammatorikus citokinek termelődését, a Gram-negatív sepsis *in vivo* általában, de nem minden esetben nagyobb mértékű gyulladási válasszal jár [16-18, 20-22]. Ez a jelenség feltételezi olyan tényezők jelenlétét, melyek a szervezet antimikrobiális immunválaszára hatással vannak, és közvetve vagy közvetlenül kapcsolatban állnak a kórokozó Gram-festődésével. Ezekről – bár a sepsis hatékony immunológiai megközelítése szempontjából igen lényeges lenne – egyelőre nem rendelkezünk pontos információval.

A bakteriális sepsis kórétanában kiemelt szerepük van a phagocytosisra képes sejtes elemeknek, mindenekelőtt a neutrophil granulocytáknak és a macrophagoknak. Ezek az első vonalban álló effektor sejtek fizikailag képesek eliminálni a kórokozó flórát. Figyelembe kell vennünk azonban, hogy a veleszületett és az adaptív immunitás számtalan ponton kapcsolódik egymáshoz, kölcsönösen szabályozva egymást [23, 24]. Ilyen módon az adaptív immunitás részvétele a sepsis

immunopathológiájában – ha bizonyos szempontból indirekt is –, messzemenőkéig nem elhanyagolható.

Régóta ismert, hogy a lymphocyták antigén-specificitása nem abszolút, egy-egy klón különböző antigének hasonló epitópjait is képes felismerni. A jelenséget molekuláris mimikri néven ismeri a klasszikus immunológia, és túlnyomórészt az infekció indukálta autoimmunitáshoz kapcsolódóan foglalkoztak vele. Újabb eredmények alapján kiderült, hogy – legalábbis – lineáris epitópok között (azaz T-sejtes mimikri esetében) az immunológiai keresztreakciók lényegesen gyakoribbak, mint korábban gondolták, és az eltérő antigénből származó epitópok felismerése nem binárisan értelmezhető, „igen vagy nem” kérdés. A keresztreaktív lymphocytaválasz valószínűsége folytonos skálán mozog, és matematikailag megbecsülhető [25].

A két különböző antigénen meglévő epitópok egyazon T-sejt klón általi felismerése elvben ahhoz vezethet, hogy a két antigénnel szemben kialakulhat hasonló jellegű – akár toleráns, akár gyulladásszerű – lymphocytaválasz. Septicus betegek esetében a kórokozóval vagy kórokozó flórával szemben indukált T-sejtes immunitás elméletileg két fő antigéncsoporttal, a saját – autoantigén – készlettel, és a szervezetben jelen lévő „idegen”, azaz kommenzális mikrobiális elemekkel interferálhat. Utóbbi csoportból tömegükénél fogva messze kiemelkednek a gastrointestinalis traktusban élő baktériumok. Tekintettel arra, hogy az immunológiailag intaktnak tekinthető szervezetben a saját struktúrákkal szembeni tolerancia áttörése nehéz, a kórokozó és az autoantigének lineáris epitópjai közötti hasonlóság, és a következményes T-sejtes molekuláris mimikri – elméleti megfontolások alapján – feltehetően inkább a kevésbé effektív antimikrobiális válaszhoz vezetne, mint infekció-indukált autoimmunitáshoz. Bonyolultabb a kérdés a kórokozó- és a kommenzális flóra közötti mimikri esetében. Élettani körülmények között a normál flórát immunológiai tolerancia védi, mely azonban sepsisben igen törékennyé válik, többek között a nyálkahártya állapotának, valamint a bélbaktériumok virulenciájának és összetételének markáns változása miatt [26]. A kórokozóval szemben kialakuló primer T-sejtes immunitás a molekuláris mimikri révén ebben az esetben várhatóan inkább szekunder nyálkahártyagyulladásra vezetne. Mindez érdekesen összecseng a „bél mint a sepsis motorja” elmélettel, mely szerint a bélben ill. bélnyálkahártyában zajló események meghatározó szerepet játszanak a sepsis kórleletében (részletesebben az 1.3 fejezetben). Ilyen módon –

annak ellenére, hogy az extracelluláris baktériumok elleni válasz elsődleges effektor sejtjei a phagocyták – a T-sejtes immunitás és a molekuláris mimikri jelensége is szervesen kapcsolódik a sepsis immunológiájához.

1.2 Az intestinalis nyálkahártya élettani körülmények között

A bélnyálkahártya és a hozzá kapcsolódó lymphoid szövet (GALT, gut associated lymphoid tissue) kényes egyensúlyt tart fenn a „belső külvilágot” alkotó nagyszámú mikroorganizmussal [27]. Kölcsönhatásuk nemcsak lokálisan szabályozza az immunválasz irányát – mely élettani körülmények között mindaddig toleráns, amíg veszélyt jelentő antigén nem érkezik –, hanem jelentős hatással van a szervezet immunitásának egészére. A bélnyálkahártyához kapcsolódó védelem nem mindennapi kihívásoknak kell, hogy megfeleljen: egyrészt biztosítania kell a szervezet integritását a rendkívül nagy tömegű mikroorganizmussal szemben, másrészt el kell kerülnie a nem veszélyes antigénekre adott választ, mely nemcsak kimerítené az erőforrásokat, hanem a gyulladás révén károsítaná magát az első védelmi vonalat jelentő nyálkahártyát is.

A speciális feladatoknak megfelelően a bél immun-apparátusának résztvevői (az epithelium, intraepithelialis lymphocyták, a lamina propria, a Peyer plakkok, mesenterialis nyirokcsomók és a peritonealis úr immunkompetens sejtjei) is jelentős részben specializált populációkból kerülnek ki. A klasszikus lymphocyták mellett a bélnyálkahártya illetve a peritonealis úr otthont ad számos nem konvencionális lymphocytá csoportnak, például B-1 sejteknek és igen változatos, részleteiben egyelőre kevésbé ismert, akár $\alpha\beta$ - akár $\gamma\delta$ -TCR-rel rendelkező intestinalis intraepithelialis lymphocytá (iIEL) populációknak is. [28]. Természetesen a veleszületett immunitás elemei, például a dendritikus sejtek is a feladatnak megfelelően specializált csoportot alkotnak [29], valamint maga a hám is részt vállal – a fizikai védelem biztosításán túlmenően – az immunológiai és szabályozási feladatokból is.

Az intestinalis hámsejtek polarizáltak, képesek antigénbemutató sejtként viselkedni – mind klasszikus MHC I és MHC II, mint nem-klasszikus MHC I osztályú hisztokompatibilitási antigéneket expresszállhatnak – és leírták MHC-

antigén komplexeket tartalmazó mikropartikulumok kibocsátását is. Utóbbi mechanizmus feltehetően a környező sejtek felé szolgáltat információt az intraluminalis antigénekről [30-32]. A hámréteg emellett antimikrobiális peptidek termelése révén is hozzájárul a nyálkahártya védelméhez [26]. A bélbaktériumok által indukált Angiogenin 4 például – mely a Paneth-sejtek terméke – Gram-pozitív antimikrobiális spektruma révén segít fenntartani az intestinalis baktériumközösség Gram-negatív predominanciáját. Szintén befolyásolják a normál flóra összetételét az immunmoduláns hatással is rendelkező defenzinek, valamint a széles spektrumú antimikrobiális hatású cryptdinek is [26, 33, 34]. A fizikai védelem fontos eszköze az epithelt bevonó nyálka, melynek termelődését szintén a kommenzális flóra tagjai indukálják. Egereken végzett kísérletek adatai alapján az intestinalis nyálka két rétegű, sűrűbb belső rétege szorosan tapad a hámréteghez, és fizikai akadályt képez az intraluminalis antigénekkal szemben. A nyálka segít az intestinalis mikrobiális közösség összetételének szabályozásában is, mert speciális adhéziós epitópokat kínál, preferenciát biztosítva egyes fajok számára [35-38].

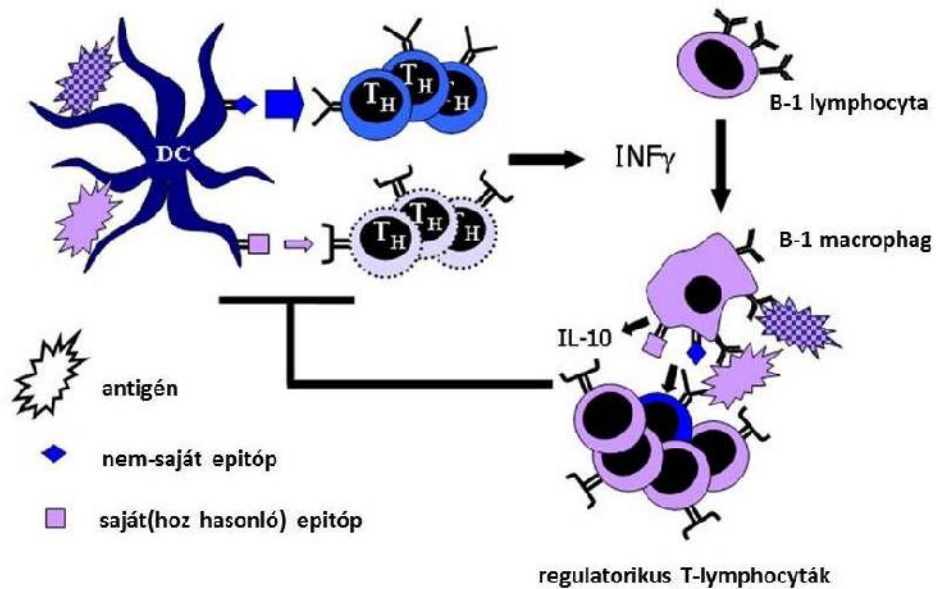
A kommenzális baktériumok élettani körülmények között nem ellenségként, nem is ellenfélként, hanem partnerként integrálódnak ebbe a rendszerbe. Populációjuk a nyálkahártyával együttműködve segít szabályozni saját összetételét, és újabb adatok szerint igen szigorú térbeli és mikrobiológiai rend alapján kolonizálja a mucosa élő szöveteit is. Partner baktériumaink hozzájárulnak továbbá a B-1 sejtek aktivációjához és a szisztémás immunitást segítő természetes antitestek képződéséhez [26, 28, 39], valamint hozzáférést biztosítanak a szervezet számára rövid szénláncú zsírsavakhoz, melyek hatása sokrétű. Az intestinalis epithelsejtek számára táplálékként szolgálnak és szabályozzák fejlődésüket, protektív hő sokkfehérjék (pl. HSP25) illetve mucin (MUC2) termelését indukálják, *in vitro* adatok alapján csökkentik a sejtközötti „tight junction” kapcsolatok permeabilitását, valamint indukálják az ornitin-dekarboxiláz termelődését, mely egy nélkülözhetetlen enzim az epithelréteg sérüléseiben fontos szerepet játszó poliaminok szintéziséhez [26, 38, 40-46]. Egyes adatok szerint a Bifidobaktériumok és a *Bacillus subtilis* közvetlenül is jótékony hatással vannak az intestinalis nyálkahártya védőgát funkciójára [47-49].

A mikrobiális flóra felismerése számos receptor és hozzájuk kapcsolódó jelátviteli út segítségével történik: részt vesznek a folyamatban TLR (Toll-like)

receptorok, FPR (formylated peptide receptor) és NOD (nucleotide binding oligomerization-like receptors) receptorok, valamint az IPAF (IL-1 β -converting enzyme protease activator factor) és C-típusú lektinek, a megfelelő jelátviteli utakkal együtt. A legtöbb species korlátozza az NF- κ B szignáltranszdukciós útvonalat, ami TGF β termeléséhez, és tolerogén, anti-apoptotikus környezet kialakulásához vezet. Egereken végzett kísérletek tanúsága szerint bizonyos kommenzális flóratagok viszont segítenek a Treg/TH17 egyensúlyt befolyásolva hatékony immunválaszt kiváltani pathogén fajokkal szemben [50-52].

Az intestinalis életközösség – beleértve saját szöveteinket és a mikrobiális flórát is – a szisztémás immunitástól bizonyos mértékig elkülönül. A GALT sejteinek homing mintázata szigorúan szabályozott, és a nyálkahártya baktériumokat hordozó dendritikus sejteit is kiszűrik a mesenterialis nyirokcsomók. Ilyen módon a normál flórára adott immunválasz élettani körülmények között megengedi a helyi IgA-termelést, de nem történik inadekvát immunizáció, melynek súlyos következményei (pl. enterocolitis, autoimmun szövödmények) lehetnének [26, 53].

A GALT élettani funkciói összetettek, sejtei nemcsak a szoros értelemben vett helyi klasszikus immunológiai védelemben vesznek részt. Az intestinalis intraepithelialis lymphocyták például növekedési faktor-termelés révén a nyálkahártya-sérülések gyógyulásában, azaz a fizikai védőgát helyreállításában is szerepet játszanak [54]. A B-1 populációból származó természetes antitestek pedig értékes elemei a szervezet bármely pontján betolakodó kórokozók elleni fél-specifikus első védelmi vonalnak. Természetes antitestek szükségesek továbbá a késői típusú túlérzékenység (DTH, delayed type hypersensitivity) során a primer T-sejtes válasz elindításához is [28, 55, 56]. Egyes adatok arra utalnak, hogy a bélhez kapcsolódó immunitás a szisztémás immunválasz szabályozásában is részt vehet. Leírtak például olyan B-1 sejt eredetű macrophagokat, melyek rendelkeznek felületi immunglobulinnal, IL-10-et szekretálnak, és kialakulásukat INF γ indukálja (1. ábra). Tekintettel a B-1 sejtek igen gyakori autoreaktivására, a gyulladással citokínkönyezet által indukált, toleranciát közvetítő autoantigén-specifikus B-1-macrophag gátolhatja az infekció-indukált autoimmunitás kialakulását [28]. Annak a lehetősége is felmerült, hogy a GALT toleranciája alá eső kommenzális flóratagok egyes autoantigénekkal való hasonlóság miatt, tolerogén molekuláris mimikri révén hozzájárulhatnak a saját struktúrák immunológiai védelméhez [57].



1. Ábra. A B-1 sejtek INF_γ jelenlétében macrophag-szerű, felületi immunglobulinnak rendelkező antigénbemutató sejtekké alakulhatnak, melyek IL-10 termelése révén akadályozhatják az infekció-indukált autoimmun folyamatok kialakulását. Eredeti ábra angol nyelven: Kristóf K, Erdei A, Bajtay Z Set a thief to catch a thief: Self-reactive innate lymphocytes and self tolerance *Autoimmunity Reviews* 7:(4) pp. 278-283. (2008)

Összességében a GALT kialakítása és a kommenzális flórával való békés együttélés nem csupán egy kényszerű következménye annak, hogy a mikrobák teljes eliminációja lehetetlen volna. A szervezet – élettani körülmények között – rengeteg előnyét élvezzi a bélflóra jelenlétének: segítségével vitaminokhoz jut (K-vitamin), hozzáfér a hámsejteket tápláló rövid szénláncú zsírsavakhoz, segítséget kap a szervezet bármely pontján belépő patogén mikroorganizmusok elleni védelemhez, és az immunválasz szabályozásához is.

1.3 A „bél mint a sepsis motorja” elmélet

Figyelembe véve a kényes és törékeny egyensúlyt a kommenzális flórára adott jótékony tolerancia és az intestinalis patogének szükségszerű eliminációja között, valamint a gastrointestinalum tágabb szerepét a szisztémás immunitás szabályozásában, nem meglepő a bélnyálkahártya kiemelt szerepe a sepsis kórélettanában. A „bél mint a sepsis motorja” elmélet a ’80-as években született meg, és azon a feltételezésen alapult, hogy a sérült mucosán keresztül történő bakteriális transzlokáció az immunológiai túlterhelt szervezet szövetei felé központi szerepet játszana a betegség kórélettanában. Az azóta eltelt évek alatt sok kísérletes eredmény született, melyek pontosították képünket a bélnyálkahártya sepsisben játszott szerepéről, de kiemelt jelentősége azóta sem kérdőjeleződött meg.

Septicus betegekben a gastrointestinalum – beleértve a szoros értelemben vett saját szöveteket és a velük élettani egységet alkotó mikrobiális közösséget is – anatómiai és funkcionális integritása sérül. Mindezen változások okai összetettek: hozzájárulnak a haemodinamikai megingások, az ischaemia-reperfúzió, a szöveti acidózis, valamint bakteriális toxinok jelenléte a vérben. A sepsist kísérő kórélettani folyamatok mellett azonban akár a terápiás erőfeszítéseink is szerepet játszhatnak a gastrointestinalum élettanának felborulásában: ezek közül kiemelkedik az esetleges parenteralis táplálás (vagy rendkívül könnyen felszívódó enterális tápszerek használatából eredő distalis intestinalis tápanyaghiány), illetve az antibiotikumhasználat [26].

Régi megfigyelés, hogy kritikus állapotokban a sérült gastrointestinalumból felszabaduló bizonyos mediátorok részt vesznek a sokszervi diszfunkció (MODS) kialakulásában, de ezek természetéről soráig hiányosak voltak ismereteink [26, 58]. Patkányokon végzett kísérletek adatai alapján a portális vérben és a szisztémás keringésben mért IL-6, TNF α és IL-1 β -koncentrációk között nem voltak jelentős különbségek polimikrobiális sepsis során [59]. Egy haemirrhagiás shock modell azonban rámutatott a bél eredetű nyirokban található mediátorok jelentőségére. Tekintettel arra, hogy a sepsisre is jellemző az intestinalis nyálkahártya ischaemiás-reperfúziós károsodása, az a tény, hogy a stressz-szituációban lévő bélnyálkahártyából elvezetődő nyirok szerepet játszik az ARDS (acute respiratory distress syndrome) és egyéb szervdiszfunkciók kialakulásában, rendkívül

figyelemreméltó. Egyelőre nem rendelkezünk pontos információval arra vonatkozóan, hogy ilyen helyzetekben a bél eredetű nyirok pontosan hogy vezethet szervkárosodások kialakulásához, de valószínűnek tűnik a TLR4- és NO-mediált útvonalak szerepe [26, 60].

A sepsisre, de az intestinalis ischaemia-reperfúzióra is jellemző a lymphocyták drámai megfogyatkozása az intestinalis lamina propriában, a Peyer-plakkokban, és az intraepithelialis kompartmentben is. Az immunválasz indukciós helyszínei, a Peyer-plakkok némileg ugyan kevésbé érintettek, de mindemellett a regenerációjuk is elhúzódozóbb. A lymphocyták pusztulása nem az egyetlen probléma, jellemző még a hámsejtek apoptózisa is. Tekintettel arra, hogy az apoptotikus sejtek ismert módon gyulladásgátló hatásúak – melynek élettani célja mindenekelőtt az autoimmun betegségek kialakulásának megelőzése lenne – a keringésbe jutó apoptotikus sejtfragmentumok hozzájárulhatnak a sepsisben gyakran tapasztalt immunparalízis kialakulásához [61].

A széleskörű apoptózis mellett további problémát jelent sepsisben az intestinalis nyálkaréteg sérülése [26]. Patkányokon végzett kísérletek eredményei alapján sepsisben csökken az intestinalis trefoil faktor 3 (TFF3) termelődése, mely élettani körülmények között stabilizálná a nyálkát, és hozzájárulna a mucosa sérüléseinek gyógyulásához. Párhuzamosan romlik továbbá a defenzin-5, a Paneth-sejtek széles spektrumú antimikrobiális termékének produkciója is [62]. A szisztémás gyulladással válaszreakció számos rágcsáló-modelljében (pl. súlyos égési sérülés, endotoxaemia), de humán intrabdominalis sepsisben is ismert jelenség a mucosális IgA-termelés csökkenése. Ennek köze lehet az említett lymphocytapoptózishoz, de ahhoz is, hogy – legalábbis rágcsálókon végzett kísérletek tanúsága szerint – sepsisben csökken a nyálkahártya IL-5 produkciója, mely fiziológiai körülmények között vezényelné az IgA felé történő immunglobulin-osztályváltást [26, 63-66]. A nyálkahártya védelmének határfokát nagy mértékben befolyásolja a helyi citokinkörnyezet is. Az epithelialis réteg permeabilitását növeli az $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, a RAGE-dependens szignál, a HMGB1 (high mobility group 1), az IL-2, IL-4 és IL-13, miközben az IL-10 és a $\text{TGF}\beta$ ellentétes hatást közvetít. Az IGF-1 (insulin-like growth factor 1) egérkísérletek alapján szintén javítja a nyálkahártya védelmét, melynek hátterében az áll, hogy gátolja a sepsist kísérő epithelialis hámsejt-apoptózist [26, 67-73].

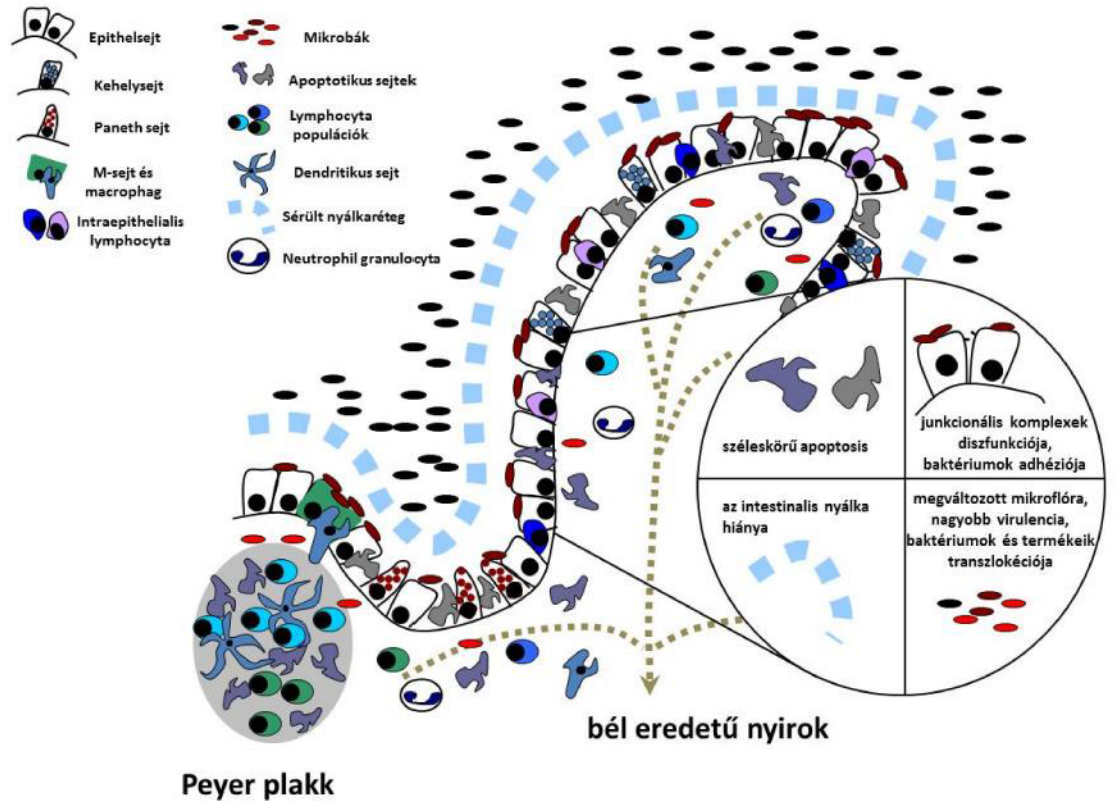
Terápiás erőfeszítéseink közül különösen kettő, a teljes parenteralis táplálás, és az antibiotikumok használata befolyásolhatja kedvezőtlenül a nyálkahártya sepsissel járó elváltozásait. Az intravénásan adott cefoperazon, ceftriaxon, piperacillin és ciprofloxacín esetében rendelkezésre állnak adatok arról, hogy hatásukra elszaporodnak a sarjadzógombák a bélben [74, 75]. Az élettani egyensúly megbomlása mellett ez azért is lehet veszélyes, mert *in vitro* kísérleti adatok szerint a sarjadzógombák igen gyakori képviselője, a *Candida albicans* segíti az *Escherichia coli* transzlokációját az epitheliumon [76]. A teljes parenteralis táplálás (TPN) során egérkísérletek adatai szerint felborul az intestinalis mikrobiális közösség élettani összetétele, miközben az intraepithelialis lymphocyták száma csökken, citokinprofiljuk megváltozik. Párhuzamosan nő az epithelsejtek apoptózishajlama és a hám permeabilitása, valamint csökken az IgA és a mucin termelése [26]. Lényeges, hogy mindezek a változások nem közvetlenül az intravénás táplálás, hanem az enterális táplálék hiányának következményei. Tekintettel arra, hogy a TPN a septicus betegek ellátása során olykor sajnos elkerülhetetlen, történtek próbálkozások a nyálkahártyára kifejtett kedvezőtlen hatásainak ellensúlyozására, elsősorban a táplálék immunmoduláns anyagokkal való kiegészítése – „immunonutrició” – révén. Állatkísérletek során néhány kiegészítő adalék, például a glutamin alkalmasnak bizonyult az intestinalis mucosa védelmére teljes parenteralis táplálás során [77, 78]. Meg kell azonban említeni, hogy emberben az eredmények még ellentmondásosak, és sem a probiotikum-használattal, sem az immunonutricióval kapcsolatban nincsenek még letisztult ismereteink [26]. Mindez újra felhívja a figyelmet az emberi szervezet és a kísérletek során leggyakrabban használt rágcsálók közötti különbségekre, és kiemeli annak jelentőségét, hogy az állatokon végzett kísérletek eredményeit mindenkor megfelelő kritikával kell szemlélünk.

A SIRS-ben szenvedő betegek körében megfigyelték, hogy a bél mikrobiális flórájában markánsan csökken az obligát anaerobok (többek között például a *Bacteroidaceae*, *Bifidobacterium* és *Veillonella* speciestek) illetve a Lactobacillusok száma, miközben a *Staphylococcus* és *Pseudomonas* fajok elszaporodnak. Egyes adatok szerint ez a változás – az obligát anaerobok számának csökkenése és a patogén speciestek túlsúlya – prognosztikai jelző is lehet. A bélflóra összetételének változása mellett jellemző SIRS-ben a szerves savak (mindenekelőtt az ecetsav,

vajsav és propionsav) mennyiségének csökkenése és a pH emelkedése a béltartalomban [79, 80].

Az elmúlt évek alap kutatásai felhívták a figyelmet arra, hogy sepsisben nemcsak az intestinalis flóra összetétele, hanem viselkedése is megváltozik. Kiderült, hogy a baktériumok a QS (quorum sensing) rendszer révén képesek szabályozni virulenciagénjeiket, melyeket akkor kapcsolnak be, amikor veszélyt – mindenekelőtt tápanyaghiányt, veszélyesen nagy baktériumsűrűséget – észlelnek, mely túlélésüket fenyegeti. Ilyen körülmények között a bélbaktériumok a gazdaszervezettel együtt való pusztulást csak akkor kerülhetik el, ha kilépnek partneri-kommenzális szerepkörükből, invazívvá válnak, és elárasztják a szöveteket. Igen lényeges momentum, hogy viselkedésük egy tervezett, koordinált, aktív folyamat eredménye, és nem arról van szó, hogy a nyálkahártya eleve meglévő sérüléseit kihasználva passzívan jutnának be a szervezetbe. Sajnos azzal, hogy az intestinalis mikrobák szeretnék elhagyni a „süllyedő hajót”, valószínűleg sok esetben maguk pecsételik meg az otthonukat biztosító szervezet sorsát [26]. A 2. ábra összefoglalja az intestinalis nyálkahártya sepsisben megfigyelt főbb elváltozásait.

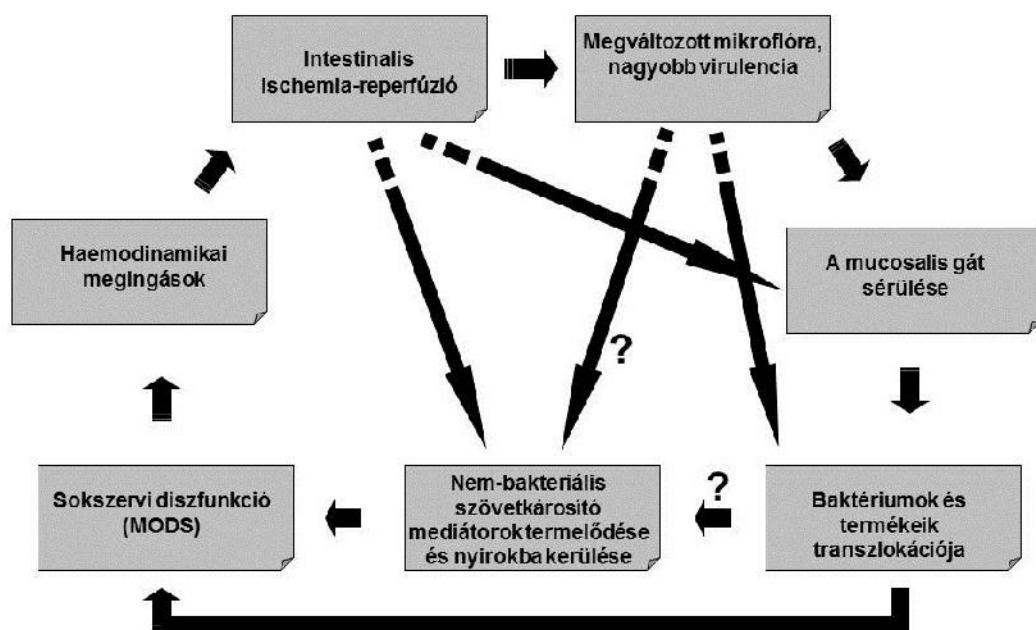
Az intestinalis mikrobiális közösség koordinált fellépése a gazdaszervezet ellen természetesen megkívánja a speciestek közötti kommunikációt, és a teljes intestinalis mikrobiális közösség koordinált fellépését. A QS-rendszer pontosan ezt teszi lehetővé [47, 81]. A „pathogén baktérium” fogalma tehát messzemenőig függ a körülményektől is, nemcsak a speciestől. A bélbaktériumok a tápanyag-ellátottság mellett képesek érzékelni a gazdaszervezet számukra veszélyszignált jelentő jelzéseit is: kísérletes adatok szerint *Pseudomonas aeruginosa* esetében a hypoxiás-ischemiás szövetekből érkező stressz-mediátorok, valamint gyulladáscitokinek (mint az $\text{INF}\gamma$) is rendkívül hatékonyan aktiválják a QS-rendszert [47, 81]. A baktérium ekkor elkezd a gazdaszervezet hatékonyabb megtámadását segítő mediátorok termelését, mint például a *Lactobacillus* speciestek elnyomó 2-heptil-4-hidroxi-kinolin-N-oxid [82], vagy a bakteriális toxinok előtt szabad utat nyitó, az intestinalis hámsejtek közötti „tight junction” kapcsolatokat támadó PA-I lektin [47].



2. **Ábra.** Az intestinalis nyálkahártya elváltozásai sepsisben. Jellemző a széleskörű apoptózis, az intestinalis nyálka hiánya vagy csökkent mennyisége és a szövettani dezorganizáció. Ez a mucosa áll szemben a mind összetételében, mint virulenciájában megváltozott intraluminalis mikrobiális közösséggel. A sérült nyálkahártyában felhalmozódó mediátorokat a bél nyirokútjai vezetik el. Eredeti ábra angol nyelven: Madách K*, Kristóf K*, Tulassay E, Iványi Z, Erdei A, Király A, Gál J, Bajtay Z, Mucosal Immunity and the Intestinal Microbiome in the Development of Critical Illness, *ISRN Immunology* 2011: *Paper 545729. 12 p.* (2011); * Megosztott első szerzők

Ezek a felismerések rendkívül fontosak a „bél, mint a sepsis motorja” elmélettel kapcsolatos ellentmondások megértésében. Az eredeti elképzelés alapján a sérült bélnyálkahártyán át a keringésbe jutó baktériumok súlyosbítanák a sepsis lefolyását, amit alátámasztani látszott az az elképzelés, hogy a steril környezetben felnevelt, bélflórával nem rendelkező „germ-free” kísérleti állatokban az intestinalis ischaemiát illetve vérzéses shock-ot követő halálozás mérsékeltebb volt. Kiderült

viszont az, hogy a sepsis során transzlokálódó baktériumok száma nem elégséges ahhoz, hogy azonos csíraszámú kísérleti körülmények között septicus választ lehessen előidézni. A zajló sepsisben mért szérumban lipopoliszacharid szint is túlságosan csekély volt ahhoz, hogy azzal kísérletesen kiváltható legyen egy sepsissel rokon szisztémás gyulladásos válaszreakció. A QS-rendszer létezése, a baktériumok virulenciájának szabályozhatósága támpontot adhat mindezen ellentmondások feloldásához [47, 83-85], és könnyebben elképzelhetővé teszi, hogy viszonylag kis csíraszámú, de igen virulens baktérium hogyan képes életveszélyesen felborítani a szervezet homeosztázisát. A 3. ábra vázlatosan bemutatja a gastrointestinalisnak a sepsis kórétanában játszott szerepét jelenlegi ismereteink szerint.



3. Ábra. Az intestinalis nyálkahártya és a vele funkcionális egységet képező intraluminalis baktériumtömeg szerepe a sepsis kórétanában. Eredeti ábra angol nyelven: Madách K*, Kristóf K*, Tulassay E, Iványi Z, Erdei A, Király A, Gál J, Bajtay Z, Mucosal Immunity and the Intestinal Microbiome in the Development of Critical Illness, *ISRN Immunology* 2011: Paper 545729. 12 p. (2011); * Megosztott első szerzők

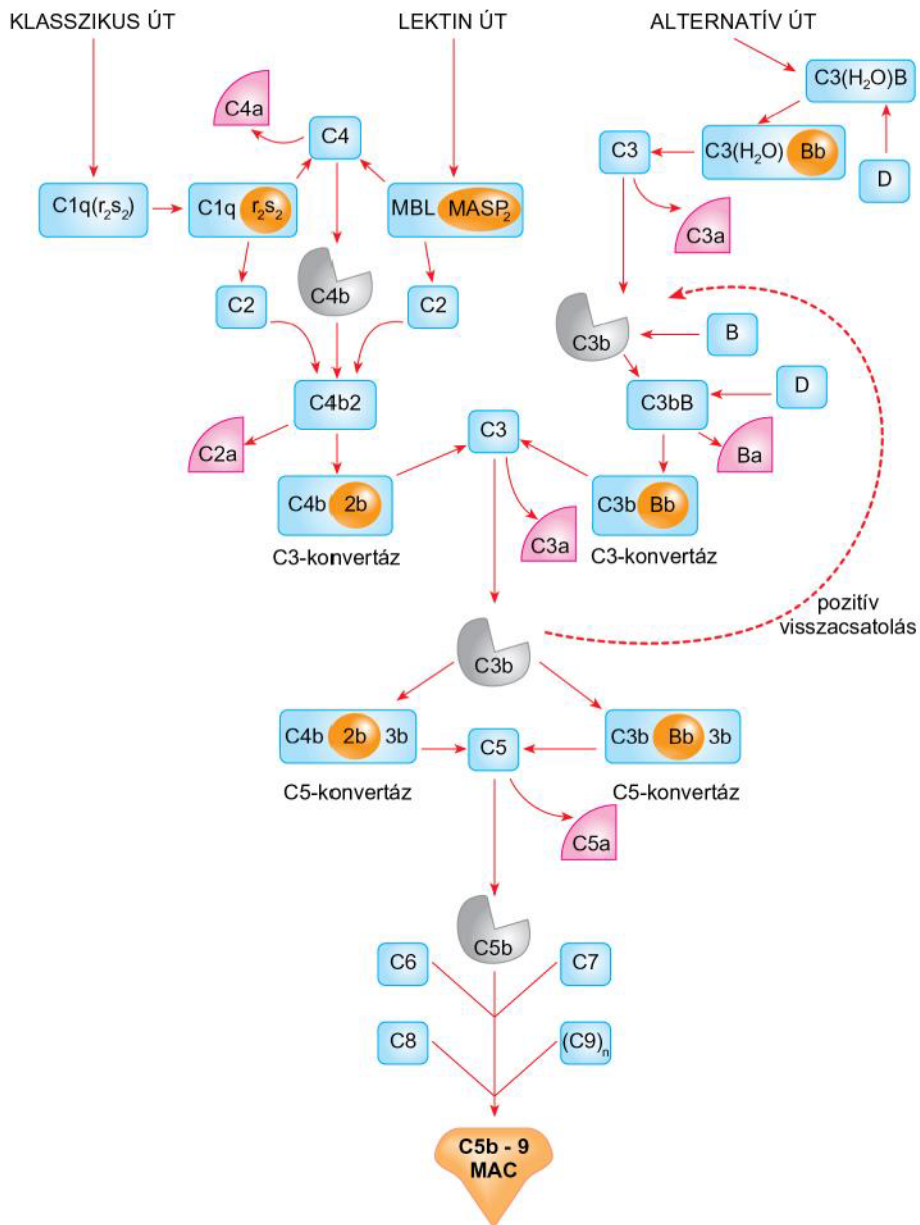
1.4 A komplementrendszer és a dendritikus sejtek szerepe az immunválaszban

A szervezet és a külvilág között álló elsődleges védőgátakat (a bőr és a nyálkahártyák epithel-rétegét) követően az első védelmi vonalunk a kórokozókkal szemben a komplementrendszer. Ez az enzimatisz kaszkádrendszer a patogéneket érkezésük pillanatában célba veszi, a phagocyták illetve antigénbemutató sejtek számára megjelöli (opszonizálja), és ideális esetben a membránkárosító komplex segítségével azonnal el is pusztítja. A vérben illetve az extracelluláris folyadékban jelen lévő komplementfehérjék jelentős része a májból származik, de több más sejtípus (pl. macrophagok, endothelsejtek) is képes előállítani azokat [86]. A komplementrendszerhez tartoznak még a kaszkád oldott elemein túl a komplementreceptorok, valamint a rendszert szabályozó molekulák is.

Amellett, hogy a komplement-aktiváció a veleszületett immunitás egyik leghatékonyabb és leggyorsabban reagáló eleme, szerepe nem korlátozódik az antigén feldolgozására. Az utóbbi években egyre több adat gyűlt össze arról, hogy a rendszer számos ponton összeköti a veleszületett és adaptív immunitást, részt vesz a lymphocyta-válasz elindításában és szabályozásában. A kórokozótól való hatékony védelem mellett a komplementkaszkád segíti az immunkomplexek, valamint a fölöslegessé vált saját antigének – szövettörmelék, apoptotikus sejtek – gyors eliminációját is, elejét véve potenciális autoimmun folyamatok kialakulásának [86].

A komplementrendszer aktivációjához alapvetően három út vezethet: a klasszikus, a lektinfüggő, és az alternatív útvonal, melyek a kaszkád központi szereplőjénél, a C3 molekulánál találkoznak, és ezt követően az események azonos módon folynak tovább. A klasszikus utat emberben elsősorban az IgM-, IgG3- és IgG1- tartalmú immunkomplex indítja el. Az ellenanyag és az antigén kapcsolódása lehetővé teszi a C1 molekulakomplex (a C1q, és a hozzá kapcsolódó C1r illetve C1s) megkötését, majd ezt követően a klasszikus C3-konvertáz létrejöttét. A folyamatot vázlatosan a 4. ábra mutatja be. Megemlítendő, hogy ezt az útvonalat nemcsak immunkomplexek, hanem a C1q-t kötni képes egyéb molekulák – pl. a C-reaktív protein vagy a pentraxin 3 – is képesek aktiválni [86-88]. Utóbbi esetben a kaszkád kizárólag felülethez (pl. bakteriális sejtfalhoz) kötött C1q-val való interakció esetében indul el. Az oldott pentraxin-3 szabad (nem immobilizált) C1q-val való

interakciója a klasszikus út gátlásához vezet, mely segít megakadályozni az inadekvát komplement-aktivációt [88].



4. **Ábra.** A komplementrendszer működésének vázlata. Eredeti ábra: Immunológia szerkesztette: Erdei Anna (Medicina kiadó, 2012.)

A lektinfüggő út esetében a komplementrendszer aktivációját a C1q-hoz hasonló felépítést mutató mannózkötő lektin (MBL) indítja el, melyek szénhidrát-felismerő (lektin) doménjeik révén kapcsolódnak a kórokozók felszínén jelen lévő mannózhoz illetve N-acetil-glükozaminhoz. A C1r és C1s szerepét ebben a molekulakomplexben az MBL-asszociált szerin-proteáz 1 és 2 (MASP-1 és MASP-2) veszi át, ezt követően az események a klasszikus útvonallal megegyező módon folynak tovább. A fikolinok az MBL-hez hasonló módon képesek aktiválni a lektinfüggő utat, de szénhidrát-felismerésükért fibrinogéndomének felelősek [86].

Az alternatív aktivációs útvonal alapja, hogy a kaszkád központi eleme, a C3 molekula szórványosan spontán hidrolízist szenvedhet, melynek során a feltáruló tioészter kötése révén kovalensen képes kötni amino- illetve hidroxilcsoportokhoz. Az aktiváló felszínhez kapcsolódó C3b az alternatív C3-konvertáz központi eleme, mely akkor is pozitív visszacsatolási kört hoz létre, ha a kaszkád eredendően a klasszikus úton indult meg (4. ábra). Az alternatív aktivációs út szelektivitását az biztosítja, hogy saját sejtjeink felszínén a kaszkád továbbvitelét megakadályozó elemek találhatóak.

Elnevezés	Ligandum	Szerkezet, Mr (Da)	Szöveti megoszlás
CR1 (CD35)	C3b > C4b	160-260 000 28-34 SCR-t tartalmaz, 4 allotípus	Vks, monoc/mf, neutrofil, eozinofil gr., B-límf., aktivált T-límf., FDC, dendritikus sejtek
CR2 (CD21)	C3d, C3dg, EBV, IFN α , CD23	145 000 15 SCR-t, tartalmaz	B-límfcita, aktivált T-límfcita FDC
CR3 (CD11b/ CD18)	iC3b, ICAM-1, LPS, fibrinogén	α -lánc: 165 000 β -lánc: 95 000	Monoc/mf, neutrofil s., NK-sejtek, néhány T-límf.
CR4 (CD11c/ CD18)	iC3b, fibrinogén	α -lánc: 165 000 β -lánc: 95.000	Monoc/mf, neutrofil s., NK-sejtek, néhány T-límf.
CRlg	iC3b	2 lg-domén	Kupffer-sejt
C3aR	C3a	48 000, 7 transzmembrán régió	Hízósejtek, neurofil, bazofil, eozinofil gr., monoc/mf, vérlemezkék, idegsejtek
C5aR (CD88)	C5a, des-Arg-C5a	43 000, 7 transzmembrán régió	Hízósejtek, bazofil gr., monoc/mf, vérlemezkék, idegsejtek
cC1qR (CD91 + kalretikulín)	C1q kollagénrésze		Leukociták

1. Táblázat. A legfontosabb komplementreceptorok vázlatos áttekintése. Eredeti táblázat: Immunológia szerkesztette: Erdei Anna (Medicina kiadó, 2012.)

Amennyiben a plazmában jelen lévő I-faktor – oldott vagy membránhoz kötött formában jelen lévő kofaktoraival együttműködve – a C3b molekulán újabb hasítást végez, inaktivált C3b (iC3b) jön létre, ezt követően újabb hasítások révén ebből C3dg majd C3d alakulhat ki. A C3b molekulából keletkező fragmentumok már nem képesek részt venni a kaskád továbbvitelében. Az I-faktor tevékenysége több célt szolgál, egyrészt megakadályozza a komplementkaskád excesszív és inadekvát aktivációját, megelőzi a fölösleges szövetkásorodást és a C3 készlet értelmetlen felhasználását. Másrészt – bár a membránkárosító komplex kialakításához többé nem járulhatnak hozzá – a létrehozott C3b-fragmentumok nem maradnak biológiai funkció nélkül, hiszen számos sejtípus működését befolyásolják. Mindezek alapján nem meglepő, hogy az I-faktor hiányos betegek visszatérő infekciókkal küzdenek [89]. A komplementrendszer aktivációjával összefüggésben keletkező molekulák felismerésére több receptor áll rendelkezésre, a legfontosabbakat az 1. táblázat foglalja össze vázlatosan.

A komplementfehérjéknek illetve fragmentumaiknak az immunválaszban betöltött szerepe – nem az azonnali komplement-mediált lízishez köthető – szerepköréről egyre több adat áll rendelkezésre. Először a B-sejtes válasz vizsgálata során vált nyilvánvalóvá a rendszer részvétele az adaptív immunitás kialakításában és szabályozásában. Megtudtuk, hogy a CR1 és CR2 receptorok jelen vannak a B-sejtek és follicularis dendritikus sejtek felszínén, ahol szerepet játszanak az antigének megtartásában, a B-sejtek túlélésében, a primer humorális válasz és B-sejtes memória kialakításában. Emellett a komplementreceptorok részt vesznek a B-lymphocyták tevékenységének szabályozásában is: míg a CR2 aktiváló, a CR1 inhibitoros jelet közvetít. A konvencionális B-sejtek működésén túl a komplementrendszer hatással van a B-1 lymphocytákra és a természetes ellenanyag-repertoire összetételére is [90-92].

Később kiderült, hogy a komplementrendszer elemei nemcsak a humorális, hanem az adaptív celluláris válasz szabályozásában is részt vesznek. A C1q-t tartalmazó immunkomplexekről azt találták, hogy a T-lymphocyták C1q-receptorain keresztül segítik a T-sejt aktivációt, míg a CR1 gátló jeleket közvetít [93-95]. A komplementfehérjék a lymphocytákra való közvetlen szabályozó hatásuk mellett a dendritikus sejtek funkcióját is befolyásolják, melynek révén az adaptív immunválasz egészét alakítják [96]. Humán monocyta eredetű dendritikus sejtekről

kiderült, hogy a macrophagok által lokálisan termelt C3-at C3b formájában kovalensen képesek megkötni, mely érésükhöz, és effektív T-sejt aktiváció kialakulásához vezet [97].

A dendritikus sejtek csoportja egészen kivételezett helyet foglal el az immunrendszeren belül, hiszen egyedül képes a naiv T-sejtek primer aktiválására, és ekközben orientációjuk tolerogén vagy effektor irányba történő befolyásolására is. Más professzionális antigénbemutató sejtek (pl. B-lymphocyták, macrophagok) esetében ugyanis az APC/T-sejt immunológiai szinapszisa elsősorban nem a T-sejt, hanem az antigénbemutató sejt aktivációját, és ezáltal a megfelelő humorális válasz, vagy aktivált, effektor macrophagok kialakítását célozza. A dendritikus sejtek működése tehát alapjaiban alakítja a teljes adaptív válasz egészét.

Mindezek alapján nem meglepő, hogy septicus betegek molekuláris immunológiai vizsgálata során a dendritikus sejtek funkciójának zavarát találták. Egyes adatok szerint sepsisben a monocyta eredetű dendritikus sejtek nagy arányban tolerogén módon differenciálódnak, és anergiás vagy regulatorikus irányban elkötelezett T-lymphocytákat indukálnak [98]. Mindez része lehet a sepsisben klinikailag is tapasztalt immunológiai kimerülésnek, és feltehetően egyik oka a másodlagos fertőzésekre való fokozott hajlammak. A jelenség pontos háttere, molekuláris alapja egyelőre még nem felderített, mindazonáltal egyes adatok felvetették a CR3 komplementreceptor potenciális szerepét dendritikus sejtek toleralizálásában [99, 100].

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a humán antimikrobiális válasz indukciós és effektor fázisait vizsgáltuk. Irodalmi adatok és elméleti megfontolások alapján felmerült annak lehetősége, hogy sepsisben a patogének ellen indukált T-lymphocyták a kórokozó és a bélbaktériumok közötti molekuláris mimikri révén másodlagos gyulladást okozhatnak az intestinalis nyálkahártyában, mely súlyosbíthatja a sepsis lefolyását, esetleg ronthatja kimenetelét. Az immunválasz indukciós részét vizsgálva arra kerestük a választ, hogy a komplementreceptorok által közvetített jelek milyen módon vesznek részt a dendritikus sejtek antigénfelvételében, fenotípusuk kialakításában, és tevékenységük szabályozásában, illetve hozzájárulhatnak-e a sepsisben tapasztalt immunológiai kimerülés és anergia létrejöttéhez. Mindezek alapján a következőket tűztük ki célul:

- Septicus pneumoniás betegcsoportban az azonosított kórokozók és az intestinalis mikrobák közötti T-sejtes mimikri mértékének matematikai becslése
- A patogének és a bélbaktériumok közötti immunológiai keresztreaktivitás, valamint az APACHE II betegsúlyossági pontszám illetve a betegség kimenetele közötti összefüggés vizsgálata.
- Az egyes kórokozóknak az intestinalis mikrobiális közösség felé mutatott T-sejtes mimikrihajlama és az általuk okozott sepsisre vonatkozó nemzetközi mortalitási adatok összevetése.
- Komplementreceptorok expressziójának vizsgálata humán monocyta eredetű érett és éretlen dendritikus sejteken.
- Az iC3b és iC3b-vel opszonizált részecskék MDC-k általi felvételének vizsgálata.
- A CR3 és CR4 receptorok szerepének vizsgálata a dendritikus sejtek antigénfelvételében.
- A CR3 és CR4 által közvetített jelek hatásának vizsgálata a dendritikus sejtek citokinteremlésére és T-sejt aktiváló képességére.

3. MÓDSZEREK

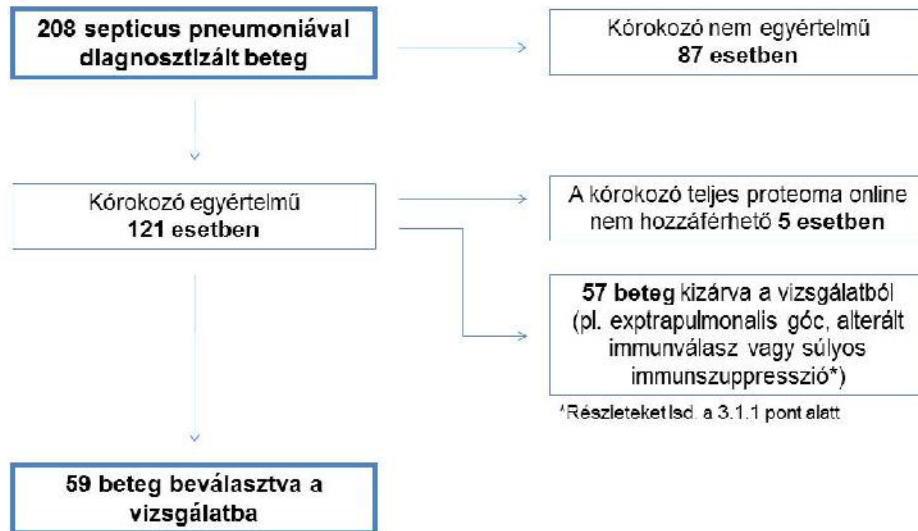
3.1 Az immunválasz effektor fázisának vizsgálata: molekuláris mimikri szerepe a sepsis kórélettanában

3.1.1 A vizsgálatunkban szereplő betegcsoport

Vizsgálatunkba való beválasztási kritériumok a következők voltak: a klinikum illetve mellkasröntgen alapján diagnosztizált septicus pneumonia; a kórokozó species mikrobiológiailag egyértelmű azonosítása (haemokulturából és/vagy bronchoalveolaris lavage – BAL – mintákból), mely klinikailag is kórokozónak (nem kontaminációnak) bizonyult; valamint a kórokozó teljes proteomának hozzáférhetősége. A kizárási kritériumok az alábbiak voltak: extrapulmonalis septicus góc jelenléte, alterált immunválasszal vagy – nem maga a sepsis okozta – immunszuppresszióval járó kísérőbetegségek illetve állapotok (pl. szteroidok és egyéb immunszuppresszív szerek krónikus szedése, AIDS, malignus betegségek, masszív transfúzió, terhesség, szoptatás, autoimmun betegségek, gyógyszerindukált cytopenia, krónikus betegségek végstádiuma). Az eredetileg 208 fős, septicus pneumoniával diagnosztizált kaukázusi betegcsoportból összesen 59 fő (25 nő és 34 férfi) volt alkalmas a jelen vizsgálatba való bevonásra. A 5. ábra vázlatosan bemutatja a beválasztás algoritmusát, a 2. táblázat pedig betegeink alapvető adatait.

Valamennyi beteg a Semmelweis Egyetem Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Klinikájára került felvételre 2004 júniusa és 2007 júniusa között. A súlyos sepsis és a septicus shock definícióit a 2001-es SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS konszenzus konferencia eredményének megfelelően használtuk [101]. Valamennyi betegünk kielégítette a „British Thoracic Society” súlyos pneumoniára vonatkozó kritériumait, és ellátásuk a „Surviving Sepsis Campaign” súlyos sepsisre és septicus shockra vonatkozó irányelveinek megfelelően történt [4]. A betegek primeren széles spektrumú empirikus antibiotikus kezelést kaptak a szóba jövő kórokozók várható érzékenységének megfelelően, mely a mikrobiológiai eredmények birtokában szükség szerint módosításra került. A csoport követése az intenzív osztályos ellátás végéig (elbocsátás vagy elhalálozás) tartott. A vizsgálat a helyi etikai bizottság

engedélyének birtokában történt. Tekintettel arra, hogy az adatfeldolgozás retrospektív módon történt, az etikai bizottság határozata alapján tájékozott beleegyezésre nem volt szükség a betegek ill. családtagjaik részéről.



5. Ábra. A betegek beválasztási algoritmus vizsgálata. Eredeti ábra angol nyelven: Kristóf K, Madách K, Sándor N, Iványi Z, Király A, Erdei A, Tulassay E, Gál J, Bajtay Z: Impact of molecular mimicry on the clinical course and outcome of sepsis syndrome, Mol. Immunol. 49:(3) pp. 512-517. (2011)

A VIZSGÁLATBA BEVONT BETEGEK ALAPADATAI

Demográfiai adatok	
Életkor (év)	63.95 (15-93)
Nem (férfi vs. nő)	57.6% vs. 42.4%
Kísérőbetegségek ill. állapotok	
Tápláltság (alutáplált vs. nem alutáplált)	16.9% vs. 83.1%
Ischaemiás szívbetegség (%)	47.5%
COPD (%)	52.5%
Hypertonia (%)	67.8%
Diabetes mellitus (%)	30.5%
Az intenzív terápiás ellátás alapadatai	
Felvételkori APACHE II pontszám	17.97 (1-44)
Invazív gépi lélegeztetés szükségessége (%)	79.7%
Gépi lélegeztetés időtartama (nap)	11.94 (1-57)
Intenzív osztályon töltött napok száma	13.17 (1-60)
Mortalitás (%)	35.6%
Mikrobiológiai jellemzők	
Gram negatív; Gram pozitív; Atípusos; Kevert	44.1%; 13.6%; 10.2%; 32.2%

2. Táblázat. A vizsgálatba bevont betegeink alapvető adatai. Eredeti táblázat angol nyelven: Kristóf K, Madách K, Sándor N, Iványi Z, Király A, Erdei A, Tulassay E, Gál J, Bajtay Z: Impact of molecular mimicry on the clinical course and outcome of sepsis syndrome, Mol. Immunol. 49:(3) pp. 512-517. (2011)

3.1.2 A molekuláris mimikri matematikai megközelítése

A T-sejtes immunológiai keresztreakciók várható mértékének becslésére egy olasz munkacsoport által közölt és kísérletesen validált módszert használtunk fel [25]. Az általunk alkalmazott beállítások a következők voltak: „peptidhossz”: 15 aminosav, „mismatch”: 7 (megfelel a szerzők által használt standard beállításoknak). A módszer valószínűségszámításon alapul, egy adott fehérjeszekvencia és egy fehérjekészlet közötti, lineáris epitópok szintén megvalósuló molekuláris mimikri becslésére alkalmas. Kiindulási adatként szükség van a kérdéses proteom aminosav-összetételére, és a vizsgált fehérjetermészetű antigén szekvenciájára. A módszer

összehasonlítja az antigén lehetséges, adott aminosav hosszúságú peptidjeit a proteom aminosav-összetételéből rekonstruált epitópkészlettel, fix számú hiba, „mismatch” megengedése mellett. A szerzők a megközelítést kísérletesen validálták, és nagyon fokban megbízhatónak találták.

A nyers számítások eredménye primeren egy grafikon, melynek x-tengelyén a vizsgált antigén egyes régiói láthatók (az első aminosavtól az utolsóig), az y-tengelyen pedig az illető régióhoz tartozó mimikri-valószínűség a vizsgált fehérjekészlettel szemben. A kérdéses antigénre vonatkozó teljes mimikri-valószínűséget értelemszerűen a görbe alatti terület adja meg. Tekintettel arra, hogy minél hosszabb egy fehérje, annál több potenciális epitópot tartalmaz, az antigén hosszával növekszik nemcsak specifikusan a vizsgált proteommal, hanem bármely fehérjekészlettel szembeni keresztreakciók valószínűsége. Ennek megoldása érdekében a görbe alatti területet normalizáltuk a vizsgált antigén hosszára (másképp megfogalmazva: kiszámítottuk az antigén egy átlagos epitópjának mimikri-valószínűségét a vizsgált fehérjekészlettel szemben).

Vizsgálatunk során két proteomot kellett összehasonlítanunk egymással: a betegekben azonosított kórokozó(ka)t, és vagy az ember, vagy az intestinalis baktériumok fehérjekészletét. Annak érdekében, hogy a lehető legpontosabb eredményeket kapjunk, a kisebb proteomnak (tehát a kórokozónak vagy kórokozó flórának) a teljes szekvenciáját, valamint a nagyobb fehérjekészlet aminosav-összetételéből vettük alapul. Tekintettel arra, hogy a vizsgálat retrospektív természete nem tette lehetővé a betegekből izolált kórokozók egyedi szekvenálását, az illető species egy-egy reprezentatív törzsét vettük alapul az EBI nyilvános adatbázisa alapján (<http://www.ebi.ac.uk/> 2011. áprilisi állapot).

A humán intestinalis normál flóra aminosav-összetételét az irodalomban hozzáférhető adatok alapján állítottuk be [102], mol%-ra átváltva. Igen lényeges megemlíteni, hogy ezek az értékek direkt mérések eredményei, ezért a különböző intestinalis bakteriális antigéneknek az emberben *in vivo* észlelhető előfordulási arányait tükrözik. Az általunk számolt mimikri-valószínűségek tehát egészen pontosan a következőt jelentik: „a kórokozó(k) és a normál flóra közötti T-sejtes keresztreakciók becsült valószínűsége súlyozva az intestinalis antigének emberi bélben mért *in vivo* előfordulási arányaival”. Ha adott egy kérdéses antigénnel szembeni lymphocytaválasz, logikusnak tűnik a feltételezés, hogy az illető antigén

minél nagyobb kópiaszámban fordul elő egy szövetben, a szövet gyulladási károsodása várhatóan annál nagyobb lesz. Ennek alapján az általunk számított molekuláris mimikri egészen pontosan inkább a primeren pulmonalis kórokozó ellenében indukált, keresztreaktív lymphocyták által a bélnyálkahártyában okozott gyulladási károk mértékét becsli meg.

Tekintettel arra, hogy egy epitóp minél inkább hasonlít a saját fehérjekészletre, ép immunrendszerrel rendelkező emberben annál kisebb a valószínűsége a rá specifikus T-sejtek sikeres aktivációjának [25], szükséges volt egy további változó, az infelammációs kvóciens (InfQ) bevezetése is. Ez az érték a „kórokozó versus normál flóra” és a „kórokozó versus humán” mimikri valószínűség-függvények hányadosának görbe alatti területe, az antigén (kórokozó proteom) hosszára normalizálva. Jelentése tehát igen hasonló a becsült „kórokozó versus normál flóra” mimikri értékekhez, de azoknál pontosabb, mert figyelembe veszi az autoreaktív lymphocytaklonok gátlását is.

3.1.3 Statisztikai értékelés

Adataink statisztikai kiértékeléséhez az „SPSS for Windows” 13.0 verzióját illetve a „Prism for Windows” 4.02-t használtuk (további információk: SPSS Inc., Chicago, IL, USA; <http://www.spss.com/>; illetve GraphPad, San Diego, USA, <http://www.graphpad.com/>). Sok változónk nem követte a Gauss-eloszlást, ezért nemparametrikus próbákat alkalmaztunk: korrelációk értékelésére a Spearman-féle rho-t, két független csoport összehasonlítására a Mann-Whitney U-tesztet, kategorikus változók összevetésére a Fisher exakt tesztet. Valamennyi statisztikai elemzést „two-tailed” beállítással hajtottunk végre, szignifikánsnak $P < 0.05$ esetén tekintettük az eredményt.

3.2 Az immunválasz indukciós szakaszának vizsgálata: komplementreceptorok szerepének vizsgálata az antigénbemutatásban

3.2.1 A felhasznált reagensek és antitestek

A sejtek izolálásához és tenyésztéséhez a következő anyagokat használtuk fel: Ficoll-Paque (Amersham, Uppsala, Svédország); CD14⁺ mikrogyöngyök (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország); CellGro szérumentes DC-médium (CellGenix, Németország); rHu IL-4 (R&D systems); rHu GM-CSF (R&D systems); LPS (Sigma, Magyarország); CFSE és FITC (Molecular Probes, Invitrogen, USA); saponin (Fluka, Svájc); iC3b (Merck, Németország).

A következő primer és szekunder ellenanyagokat használtuk a flow citometria és a konfokális mikroszkópia során: anti-humán CD4-A647 (Santa Cruz, USA); FITC-jelölt anti-biotin mAb (Sigma, Magyarország); streptavidine-Alexa546, streptavidine-Alexa647, streptavidine-Alexa488, Alexa488-jelölt kecske anti-egér Ig (Molecular Probes, Invitrogen, USA); FITC-jelölt anti-humán MHCII; FITC-jelölt anti-humán CD83; FITC-jelölt anti-humán CD86; APC-jelölt anti-humán CD14 mAb és biotinizált anti-humán CD11b (BD PharMingen, USA); PE-konjugált egér anti-humán mannóz receptor (mIgG1,3.29B1.10) az Immunotech-től (Franciaország); biotinizált anti-humán CD40 (Serotec, Egyesült Királyság); monoklonális anti-humán CD11b-RPE (Dako, Dánia); monoklonális anti-humán CD11c, anti-humán CD11c-A647, mIgG1-A647 (BioLegend, USA), anti-humán CD35-FITC (BD PharMingen, USA); anti-humán CD21-PE (Immunotools, Németország); anti-humán iC3b (Quidel, USA); biotinizált anti-humán CD11c és FcR blokkoló (Miltenyi Biotec, Németország); TMG6-5: a CD11b ligandkötő helyére specifikus mIgG1 (Andó István, Szeged, Magyarország).

3.2.2 Emberi MDC-k előállítása, érésük nyomon követése

A humán monocytákat egészséges véradók buffy coat-jából izoláltuk, melyet az Országos Vérellátó Szolgálat biztosított számunkra (a Helsink Deklaráció értelmében tájékozott beleegyezés birtokában). A CD14⁺ monocyták izolálása

mágneses szeparációval, vagy zselatinrétegre való adherenciával történt, ahogy csoportunk korábbi munkája során leírtuk [97]. Az izolált sejteket ezt követően CellGro szérumentes médiumban tenyésztettük, ehhez 100ng/ml rHu GM-CSF-et és 15 ng/ml rHu IL-4-et adtunk hozzá, melyeket 2 naponta pótolunk.

Az 5. napon a CD14⁺ éretlen monocyta eredetű dendritikus sejteket (imMDC) mostuk, majd 50 µg/ml iC3b-vel vagy 10 µg/ml CD11b specifikus TMG6-5 monoklonális antitesttel kezeltük 30 percig 37 fokos hőmérsékleten. Kontrollként egy izotípus-azonos ellenanyagot használtunk. Az inkubációt követően a sejteket mostuk, majd további két napra a fent leírt citokinekkal kiegészített friss médiumba helyeztük. A negatív kontroll imMDC-eket kezelés nélkül tenyésztettük tovább. Pozitív kontrollnak olyan dendritikus sejteket vizsgáltunk, melyeket 1 µg/ml LPS-sel kezeltünk. A 7. napon fenotípusos (FACS) és funkcionális (MLR, citokin-mérések) tesztekkel jellemeztük a különbözőképpen kezelt sejteket. Az MDC-k érését a következő sejtfelszíni markerek vizsgálatával követtük: MHCII, CD40, CD83, CD86, MR. A sejteket megjelöltük a markernek megfelelő ellenanyaggal, majd citofluorimetriával vizsgáltuk.

3.2.3 Áramlási citometria

A fenotípusos vizsgálatokhoz a dendritikus sejteket 4 °C hőmérsékleten, 20 percig inkubáltuk a megfelelő antitesttel, majd kétszer FACS pufferben (PBS-1% FCS-0,1% Na-azid) mostuk őket. Kontrollként izotípus-azonos ellenanyagokat használtunk. Az intracelluláris festéshez a sejteket 2%-es formaldehidet tartalmazó PBS-ben fixáltuk, majd 0,2% saponinnal permeabilizáltuk. A jelölés egyebekben hasonlóan történt, mint az extracelluláris markerek esetében. A mintákat FACSCalibur ill. FACS Aria III készülékkel vizsgáltuk, CellQuest Pro (Becton Dickinson) ill. FACS Diva adatgyűjtő és FCS Express adatelemző programokkal. Az eredményeket Δ MFI-ként adtuk meg a következők szerint: $(MFI_{\text{minta}} - MFI_{\text{izotípuskontroll}})/(MFI_{\text{izotípuskontroll}})$.

3.2.4 Lézerpásztázó konfokális mikroszkópia

A sejteket egy órán keresztül, 37 °C hőmérsékleten kezeltük 50 µg/ml koncentrációjú iC3b-vel, majd fixáltuk, permeabilizáltuk, és anti-iC3b ellenanyaggal jelöltük őket. A vizualizációhoz egy szekunder, anti-egér-Alexa488 antitestet használtunk. Az iC3b és a CD11b vagy CD11c kettős jelölése a következőképpen történt: anti-iC3b ellenanyag és anti-egér-Alexa488 valamint anti-CD11b vagy anti-CD11c és streptavidin-Alexa647 segítségével. Az internalizáció követésére a CD11b-t biotinizált anti-CD11b és streptavidin-Alexa546, a CD11c-t anti-CD11c-Alexa647-tel jelöltük. A jelölést követően iC3b-vel opszonizált *Staphylococcus aureus* adtuk a sejtekhez 1 órára. Az említett sorrend azért volt szükséges, mert a fixálás során tönkremennének azok az epitópok a CD11b és CD11c molekulákon, melyeket felismernének az ellenanyagaink. Az antitesteket teszteltük az iC3b kötésével való interferenciára, negatív eredményt kaptunk. A mintákat konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk (Olympus IX81, Fluoview 500).

3.2.5 MLR teszt

Az MDC-eket a fent bemutatott kezelést követően, a hetedik napon 96-lyukú plate-re helyeztük át, és allogén T-sejteket tettünk hozzájuk további négy napra (a DC:T-sejt arány 1:5 volt). A T-sejteket ezt megelőzően 0,5 µmol-os CFSE-vel jelöltük. A 4 nap letelte után citofluorimetriával vizsgáltuk a CD4-Alexa647-jelölt sejtek CFSE-festődését. Három különböző mérés alapján állapítottuk meg az osztódó sejtek átlag MFI±SD értékeit.

3.2.6 Citokinszintek mérése

Az MDC-k felülúszóit 24 órával a különböző kezelések után vizsgáltuk. Az IL-6 és TNFα meghatározására az R&D szendvics-ELISA rendszerét használtuk, míg az IL-8 koncentrációkat a BenderMedsystem Instant ELISA kit-jével mértük meg. Az eredményeket három független kísérletből számítottuk, és átlag koncentráció±SD formájában mutatjuk be.

3.2.7 Opszonizált antigén phagocytosisa

Vizsgálatainkhoz *Saccharomyces cerevisiae*t és *Staphylococcus aureus*t használtunk, utóbbit az Eötvös Loránd Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszékéről kaptuk. Az élesztőt és a baktériumot hővel elöltük, és FITC segítségével jelöltük a gyártó előírásainak megfelelően. Az éretlen DC-k phagocytotikus kapacitását vizsgálandó az antigéneket humán szérummal opszonizáltuk egy óra hosszan, majd mostuk, és különböző körülmények között a sejtekhez adtuk őket. A csak IgG-vel, komplementtel nem opszonizált *S. aureus* előállításához a baktériumot hőinaktivált szérummal inkubáltuk egy órán keresztül. Kontrollként nem opszonizált élesztőt és baktériumot is felhasználtunk. Blokkolási kísérleteink során az anti-CD11b illetve anti-CD11c ellenanyagokat 100µg/ml-es koncentrációban, az FcR-blokkoló Miltenyi reagenst pedig a gyártó előírásainak megfelelően használtuk. Az éretlen dendritikus sejteket az élesztővel 1:5 DC:élesztő arányban, a baktériummal 200µg/ml-es koncentrációban inkubáltuk 2 óra hosszan CO₂-inkubátorban. A bekebelezett partikulumok mennyiségét tripánkék felhasználásával citofluorimetriával, vagy a phagocytotikus index meghatározásával, invertoszkóp segítségével számítottuk ki. Az eredményeket három független kísérlet adatai alapján, átlag±SD formájában mutatjuk be.

3.2.8 RNS csendesítés

Az RNS csendesítést a Prechtel és munkatársai által leírt módszer szerint végeztük [103]. A kereskedelmi forgalomban hozzáférhető negatív kontroll siRNS-t és CD11c ill. CD11b specifikus siRNS-t használtunk fel (Qiagen, Németország). A dendritikus sejteket a differenciáció nulladik és 3. napján 20µg siRNS-sel transzfektáltuk, hogy az 5. napra CD11b- ill. CD11c-csendesített, vagy negatív kontroll sejteket kapjunk. A CD11b és CD11c expresszióját citofluorimetriával ellenőriztük, és a további kísérleteket ugyanazon a napon végeztük el.

3.2.9 A sejthez kötött iC3b és CR3 internalizációja

A sejthez kötött iC3b sorsának nyomonkövetésére a sejteket 4 °C-on 30 percig inkubáltuk 50µg/ml iC3b-vel. Az integrinek aktivációs állapotának vizsgálata érdekében kísérleteinket 5mM Mg²⁺ jelenlétében is elvégeztük, mely ismerten az aktív konformációs állapot kialakulásához vezet [104]. A fölösleges iC3b-t mosással eltávolítottuk, majd 37 °C-os CO₂-inkubátorban tároltuk a sejteket. Hasonlóan jártunk el a CR3 mozgásának vizsgálatakor. A sejteket TMG6-5 ellenanyaggal inkubáltuk 10µg/ml-es koncentrációban 30 percig jégen, hogy megelőzzük az internalizációt, majd 37 °C-on inkubáltuk őket a jelzett ideig. Fixálást követően a sejteket megjelöltük a sejt felszínén maradt iC3b-re és CR3-ra, majd áramlási citometriával vizsgáltuk.

3.2.10 Statisztikai értékelés

A Student t-próbát GraphPad programmal végeztük el, és az eredményt P<0.05 esetén tekintettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

3.1 Az immunválasz effektor fázisának vizsgálata: molekuláris mimikri szerepe a sepsis kórélettanában

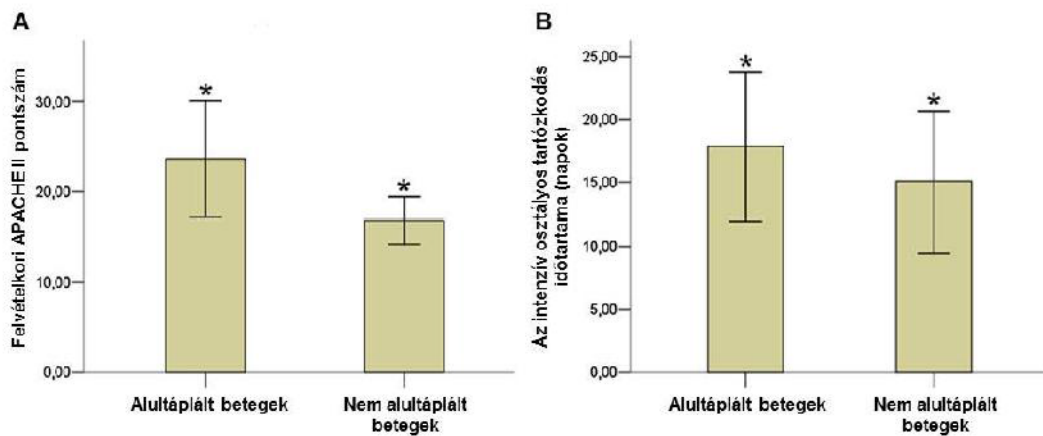
4.1.1 A vizsgálatunkban szereplő betegek jellemzői

A vizsgálatunkba bevont betegek alapvető adatait illetően utalunk a 2. táblázatban foglaltakra. A várakozásnak megfelelően a magasabb APACHE II pontszám illetve az előrehaladottabb életkor a kedvezőtlen kimenetellel asszociált ($P < 0.0001$ és $P < 0.001$ a túlélő és nem túlélő betegek összehasonlításában). Az invazív gépi lélegeztetés szükségessége hasonló összefüggést mutatott az APACHE II pontszámokkal ($P < 0.001$) és a magasabb életkorral ($P = 0.038$). A kísérőbetegségek illetve állapotok közül (lásd: 2. táblázat) egyik paraméter sem mutatott szignifikáns összefüggést a sepsis kimenetelével, viszont a tápláltsági státusz befolyásolta a betegség lefolyását: az alultáplált betegek ($BMI < 18,5 \text{ kg/m}^2$) magasabb APACHE II pontszámokkal érkeztek ($p = 0.037$) és átlagosan hosszabb időt töltöttek el az intenzív osztályon (természetesen csak a túlélő csoportra számítva $P = 0.030$). Az eredményeket az 6. ábra mutatja be. Női betegeink tendenciózusan jobb túlélést mutattak, ez azonban nem érte el a statisztikai szignifikanciát ($P = 0.053$).

4.1.2 A molekuláris mimikri és a betegség súlyosságának összefüggése

A betegek azonosított kórokozó flórájára kiszámított inflammációs kvóciensek (InfQ) (azaz a „kórokozó flóra versus intestinalis mikrobák”/”kórokozó flóra versus humán” mimikri-hányadosok) jól korreláltak az APACHE II betegség súlyossági pontszámokkal ($R_s = 0.311$; $P = 0.017$). A nyers „kórokozó flóra versus intestinalis mikrobák” mimikri becslés valószínűsége is tendenciózusan korrelált az APACHE II pontszámokkal, ez azonban nem érte el a statisztikai szignifikancia határát. Nem találtunk azonban összefüggést a betegek azonosított kórokozójának emberi proteommal mutatott becslés immunológiai keresztreaktivitása és a pneumonia eredetű sepsis súlyossága között.

Azoknál a betegeknél, akik invazív gépi lélegeztetésre szorultak, az azonosított kórokozó flóra tendenciózusan magasabb InfQ értékeket mutatott, mely azonban – feltehetően a viszonylag kis létszámú betegcsoport miatt – statisztikailag nem volt szignifikáns (P=0.091).

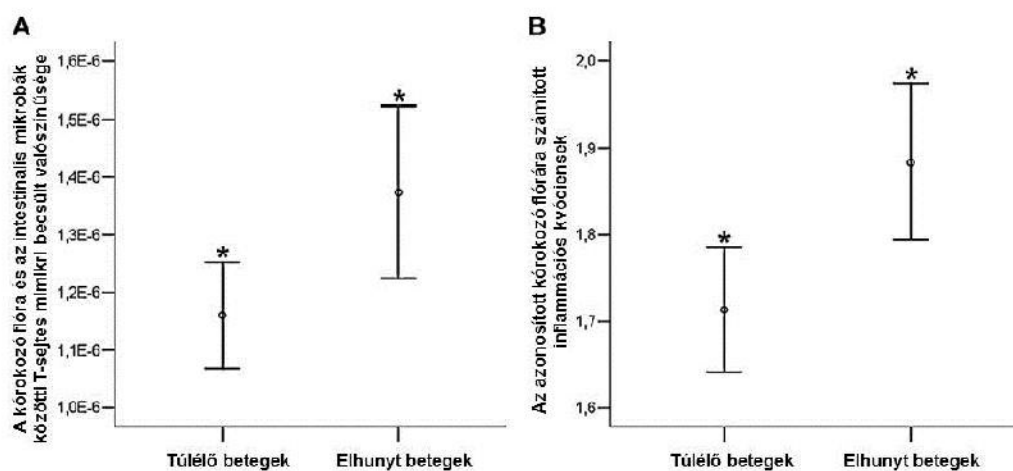


6. Ábra. A tápláltsági állapot összefüggése a pneumonia eredetű sepsis lefolyásával. (A) Az alultáplált betegek (BMI<18,5 kg/m²) magasabb felvételi APACHE II pontszámokat értek el, és (B) átlagosan hosszabb időt töltöttek el az intenzív osztályon (túlélőkre vonatkoztatva). Eredeti ábra angol nyelven: Kristóf K, Madách K, Sándor N, Iványi Z, Király A, Erdei A, Tulassay E, Gál J, Bajtay Z: Impact of molecular mimicry on the clinical course and outcome of sepsis syndrome, Mol. Immunol. 49:(3) pp. 512-517. (2011)

4.1.3 A molekuláris mimikri és a betegség kimenetelének összefüggése

Vizsgálati csoportunkban a kórokozó flóra intestinalis mikrobák irányába mutatott becsült T-sejtes mimikri-hajlama szignifikánsan alacsonyabb volt a septicus pneumóniát túlélő betegek körében (P=0.019). A kórokozó-specifikus T-lymphocyták bélnyálkahártyában okozott, molekuláris mimikrin alapuló károsító hatását pontosabban tükröző inflammációs kvóciensek (InfQ) ennél is egyértelműbb asszociációt mutattak a betegség kimenetelével (P<0.01). Az eredményeket a 7. ábra

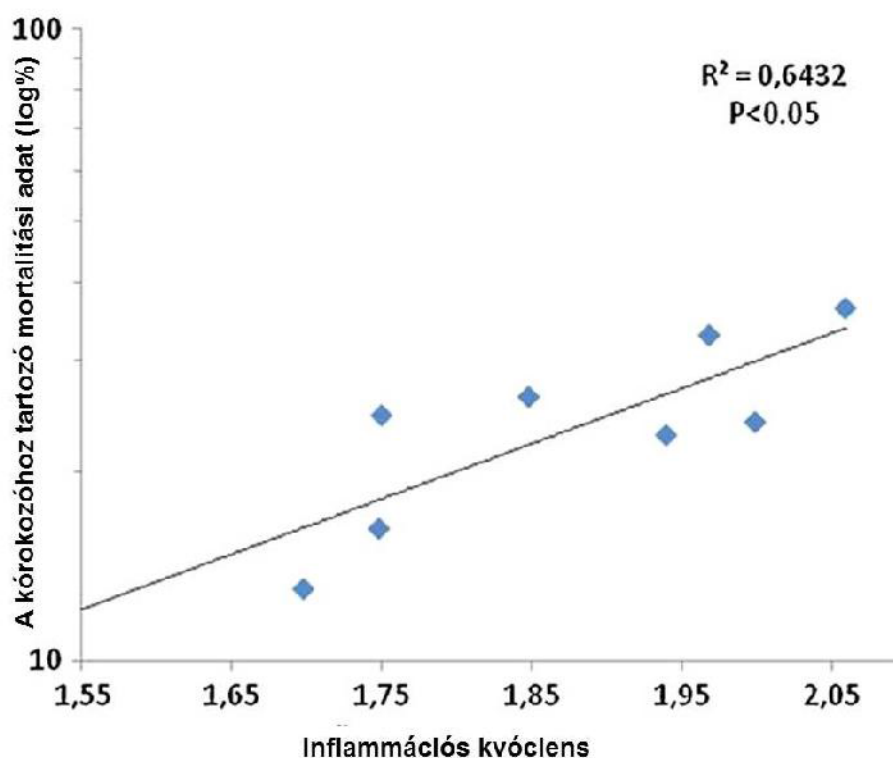
mutatja be. Lényeges megjegyezni, hogy az InfQ értékek nem lineáris, hanem logaritmikus skálán mozognak, ezért a csekélynek tűnő eltéréseket ennek ismeretében kell értelmeznünk. Az azonosított kórokozó flóra emberi fehérjekészlettel mutatott T-sejtes mimikri-hajlama és a betegség kimenetele között nem találtunk értékelhető összefüggést.



7. Ábra. Az azonosított kórokozók és a bélflóra közötti T-sejtes molekuláris mimikri és a pneumonia eredetű sepsis kimenetelének összefüggése. (A) Túlélő betegeink körében a kórokozó flóra és az intestinális mikrobák közötti mimikri becsült valószínűsége szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult, mint a nem túlélők között. (B) Az inflammációs kvóciensek még egyértelműbben asszociáltak a betegség kedvezőtlen kimenetelével. Eredeti ábra angol nyelven: Kristóf K, Madách K, Sándor N, Iványi Z, Király A, Erdei A, Tulassay E, Gál J, Bajtay Z: Impact of molecular mimicry on the clinical course and outcome of sepsis syndrome, *Mol. Immunol.* 49:(3) pp. 512-517. (2011)

Tekintettel arra, hogy az igen szigorú beválasztási kritériumok miatt vizsgálati csoportunk viszonylag kis létszámú volt, szükségesnek tartottuk eredményeink összevetését nagy nemzetközi tanulmányok adataival. Munkánk során a SOAP Study eredményeit vettük alapul, mely több mint ezer septicus beteg adatait dolgozta fel [105]. A tanulmány többek között foglalkozott az egyes kórokozók okozta sepsis

mortalitási adataival is. Ezek közül, amelyek kórokozó esetében lehetséges volt, kiszámítottuk a megfelelő inflammációs kvócienseket. A kapott eredményeket kiértékelve azt találtuk, hogy az InfQ hányadosok szignifikáns korrelációt mutatnak a megfelelő mortalitási értékekkel ($P < 0.05$; $R^2 = 0.6432$). Az összefüggést a 8. ábra mutatja be.



8. Ábra. A SOAP tanulmányból származó, egyes kórokozókra vonatkozó mortalitási adatok összefüggése az illető pathogénre számított inflammációs kvóciensekkel. Az „y” tengely beosztása logaritmikus. Eredeti ábra angol nyelven: Kristóf K, Madách K, Sándor N, Iványi Z, Király A, Erdei A, Tulassay E, Gál J, Bajtay Z: Impact of molecular mimicry on the clinical course and outcome of sepsis syndrome, Mol. Immunol. 49:(3) pp. 512-517. (2011)

Lényeges megemlíteni, hogy az összehasonlítás akkor lenne teljesen objektív, ha a tanulmányban szereplő betegekre érvényesek lettek volna a jelen vizsgálatban alkalmazott szigorú kizárási kritériumok, és standardizálva lett volna az infekció góca. Ezen adatok nem egységes volta ugyanis torzíthatja a kapott összefüggést.

Tekintettel arra azonban, hogy ezek a torzítások nagyobb valószínűséggel fedhetnek el egy valós összefüggést, mintsem statisztikailag szignifikánsnak tünetnének fel egy nem létező korrelációt, figyelemreméltó az egyezés jelen vizsgálatunk eredményeivel.

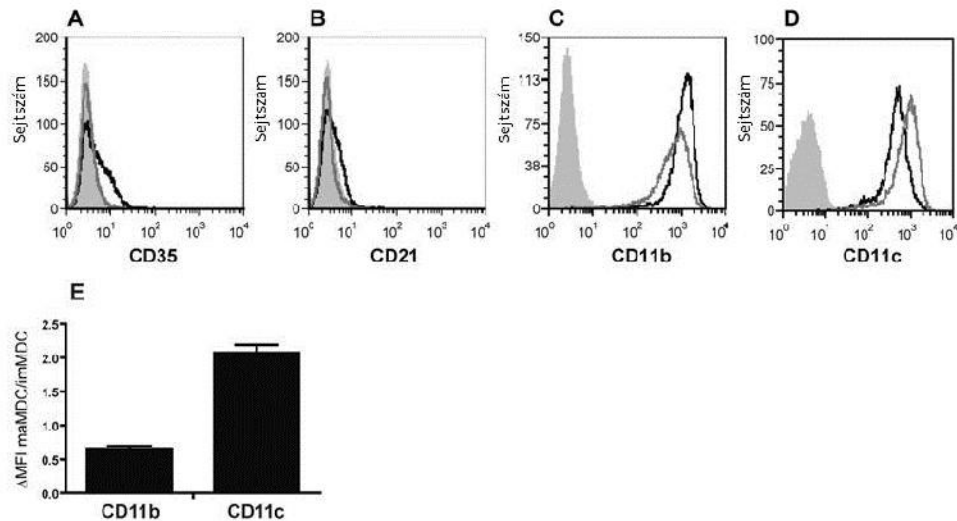
4.1.4 Immunológiai keresztreaktivitás Gram pozitív és Gram negatív kórokozó speciestek esetében

Tekintettel a Gram-pozitív és Gram-negatív sepsis eltérő immunpathológiájáról szóló irodalmi adatokra (részletesebben lásd a bevezető fejezetben) összehasonlítottuk a betegeink körében előforduló Gram-pozitív és Gram-negatív kórokozók T-sejtes mimikrire vonatkozó becsült értékeit. Azt találtuk, hogy a Gram-negatív pathogének esetén a „kórokozó versus intestinalis flóra” mimikri számított értéke szignifikánsan nagyobb volt a Gram-pozitív csoporténál ($P=0.01$). Mindez nem meglepő, ismerve a bélflóra Gram-negatív dominanciáját. Érdekes módon a Gram-negatívak nemcsak a bélbaktériumok, hanem a humán fehérjekészlet felé is szignifikánsan nagyobb mimikri-hajlamot mutattak ($P=0.018$). Az inflammációs kvóciensek tekintetében is egyértelműen magasabb értékeket kaptunk a Gram-negatív baktériumok esetében a Gram-pozitív csoporthoz viszonyítva ($P=0.003$).

4.2 Az immunválasz indukciós szakaszának vizsgálata: komplementreceptorok szerepének vizsgálata az antigénbemutatásban

4.2.1 Komplementreceptorok expressziója emberi MDC-ken

Munkacsoportunk korábban azt találta, hogy az MDC-k a macrophagokhoz illetve a B-lymphocytákhoz hasonlóan képesek C3b-t kovalensen kötni a felszínükre, és ez a jelenség fokozza az antigénbemutatásuk hatékonyságát [97, 106, 107]. A komplementreceptorokat illetően dendritikus sejteken eddig csak a CR3-t és a CR4-t vizsgálták [108, 109], a CR1-t és CR2-t nem. Erre való tekintettel mind éretlen, mind érett dendritikus sejteken megvizsgáltuk a CR1, CR2, CR3 és CR4 jelenlétét.



9. **Ábra.** A CD35, CD21, CD11b és CD11c expressziója érett és éretlen MDC-ken.

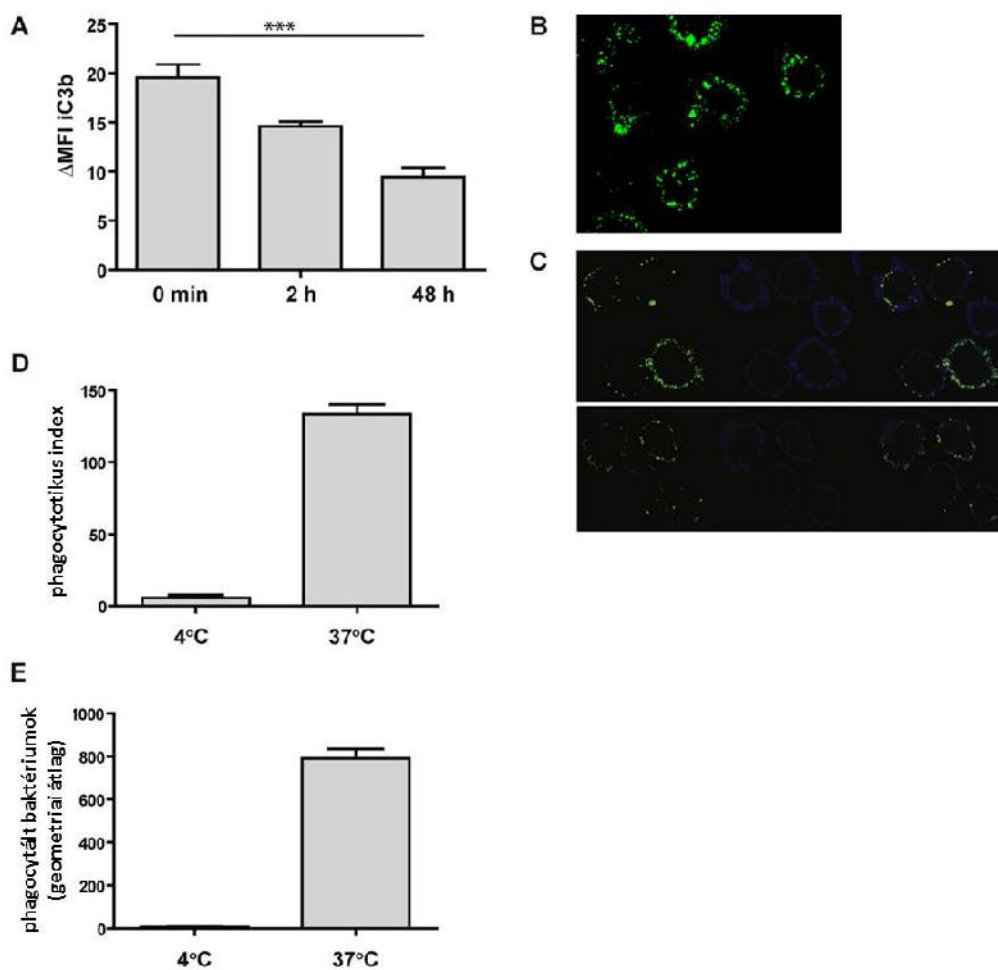
„A”: CD35 (CR1), „B”: CD21 (CR2), „C”: CD11b (CR3) és „D”: CD11c (CR4) sejt felszíni expressziója imMDC-ken és maMDC-ken. Az érett MDC-eket éretlen MDC-k 1 μg/ml LPS-sel való két napos inkubációja révén állítottuk elő. A fekete hisztogram az éretlen, a szürkére az érett dendritikus sejteket mutatja, míg a szürkével kitöltött görbe az izotípuskontrollra vonatkozik. Öt elvégzett kísérletből egy reprezentatívát mutatunk be. „E”: az MDC-k érése során a CD11b mennyisége csökkent, míg a CD11c expressziója nőtt. A változást a következőképpen fejezzük ki: $\Delta\text{MFI CD11b maMDC} / \Delta\text{MFI CD11b imMDC}$ illetve $\Delta\text{MFI CD11c maMDC} / \Delta\text{MFI CD11c imMDC}$. Az ábrán öt független kísérlet adatai láthatók \pm SD. Eredeti ábra angol nyelven: Sandor N, Kristof K, Parej K, Pap D, Erdei A, Bajtay Z: CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells. *Immunobiology*, 218(4): pp. 652-63. (2013) [110]

Megfigyeléseink szerint értetlen MDC-ken igen kis mennyiségű CR1 volt jelen, mely az érés során teljesen eltűnt (9. ábra „A”). A CR2 jelenlétét sem érett, sem értetlen MDC-ken nem tudtuk kimutatni (9. ábra „B”). A CD11b-t és CD11c-t az MDC-k konstitutívan expresszálták (9. ábra „C” és „D”), ám LPS-indukált érésük során amíg a CR3 mennyisége csökkent, a CR4-é szignifikánsan ($P=0.018$) növekedett. A CR3 és CR4 molekulák abszolút száma ugyan nagy egyéni variabilitást mutatott, de a differenciáció során megfigyelt változás mindig szignifikáns maradt (9. ábra „E”).

4.2.2 Az iC3b és iC3b által opsonizált partikulumok felvétele értetlen MDC-kbe

Az integrinek ismerten az aktív konformáció felvételét igénylik ahhoz, hogy képesek legyenek ligandjaik kötésére [111], ezért megvizsgáltuk az értetlen dendritikus sejtek CR3 és CR4 receptorainak ligandkötő kapacitását. Az értetlen MDC-eket iC3b-vel, a CR3 és CR4 természetes ligandjával inkubáltuk 30 percig 4 °C-on, majd Alexa488-jelölt ellenanyaggal vizsgáltuk a kötést. Ahogy a 10. ábra mutatja, a kísérlet kezdetén (gyakorlatilag a 0. percben) erőteljes iC3b-lerakódást találtunk a sejtek felszínén. Mivel a Mg^{2+} jelenlétében az integrinek aktív konformációs állapotba kerülnek [104], a kísérletet elvégeztük Mg^{2+} -mal előkezelt dendritikus sejteken is, a „Módszerek” fejezetben leírtaknak megfelelően. Az előkezelés nem fokozta a ligand kötését a receptorokhoz, ami arra enged következtetni, hogy a CR3 és CR4 komplementreceptorok már eleve aktív konformációban voltak jelen a sejtmembránon.

A következőkben a receptorhoz kötött iC3b sorsát vizsgáltuk. Ehhez a sejteket 4 °C-on iC3b-vel kezeltük, majd 37 °C-on inkubáltuk őket, hogy lehetővé tegyük az internalizációt (lásd a „Módszerek” fejezetben). Két óra múlva a sejthez kötött iC3b mennyisége szignifikánsan ($P=0.0039$) csökkent, majd 48 óra elteltével további csökkenést mutatott (10. ábra „A”). Konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk, hogy az iC3b sejtfelszínről való eltűnése a sejtről való lelkődéssel vagy internalizációval függ össze. Azt találtuk, hogy a felszínhez kötött iC3b-t a sejtek két óra elteltével bekebelezik, a C3 fragmentumokat apró foltos elrendezésben mutattuk ki (10. ábra „B”). Az iC3b-t mint a CR3, mind a CR4 kötötte; a sejtek iC3b-vel 4 °C-on történő előkezelését követően az iC3b-t CD11b-vel és CD11c-vel együtt is ki tudtuk mutatni (10. ábra „C”).



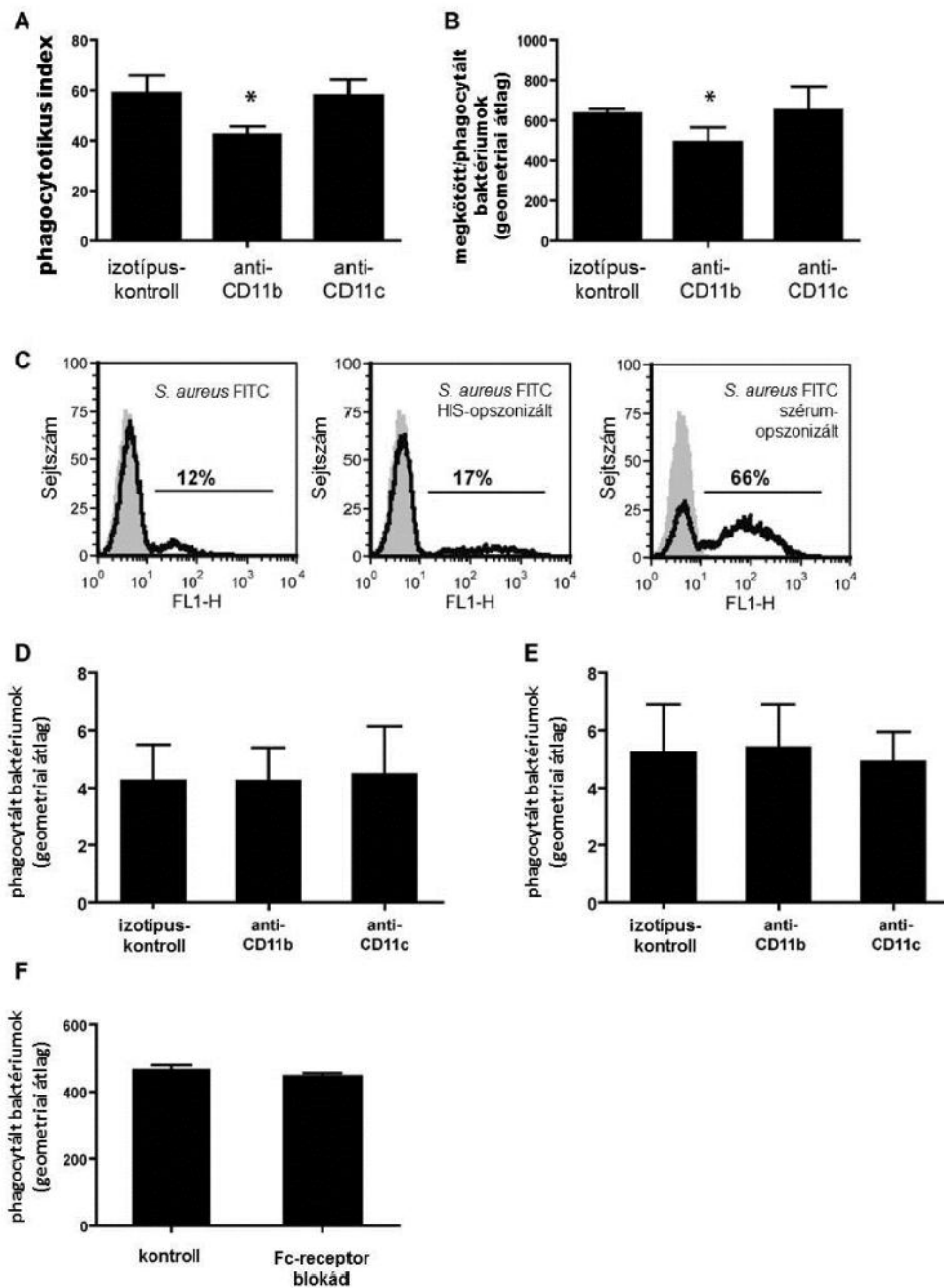
10. Ábra. Az iC3b és iC3b-vel opsonizált részecskék kötése az éretlen MDC-khez. „A” Az imMDC-
ket iC3b-vel inkubáltuk, majd mosást követően 37 °C-on tovább tenyésztettük őket. A feltüntetett
időpontokban vizsgáltuk a sejtfelszínhez kötött iC3b mennyiségét. Három független kísérletből kapott
adatok alapján tüntetjük fel a $\Delta\text{MFI} \pm \text{SD}$ értékeket. $***P=0.0004$ „B” Konfokális mikroszkópiás kép
37 °C-on 2 órán keresztül iC3b-vel kezelt, majd iC3b-re megjelölt imMDC-kről. 60x-os nagyítás. Öt
független kísérletből egy reprezentatívát mutatunk be. „C” Konfokális mikroszkópiás kép iC3b-vel
inkubált, és iC3b-re/CD11b-re (felső panel) vagy iC3b-re/CD11c-re (alsó panel) kettősen megjelölt
imMDC-kről. Az iC3b zöld színben a CD11b/CD11c kék színben látható. A nagyítás 60x-os. Három
független kísérletből egy reprezentatívát mutatunk be. „D” és „E” Éretlen MDC-
ket inkubáltunk iC3b-
vel opsonizált élesztővel vagy FITC-szel jelölt, iC3b-vel opsonizált baktrétiummal a feltüntetett
hőmérsékleten 2 órán át, majd vizsgáltuk a phagocytosis mértékét (phagocytotikus index számítása ill.
áramlási citometria segítségével). A nem opsonizált antigénre vonatkozó értékeket levontuk mindkét
esetben. Három független kísérlet átlagát $\pm \text{SD}$ adjuk meg. Eredeti ábra angol nyelven: Sandor N,
Kristof K, Parej K, Pap D, Erdei A, Bajtay Z: CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor
on human dendritic cells. *Immunobiology*, 218(4): pp. 652-63. (2013) [110]

Tekintettel arra, hogy a CR3-at és a CR4-et is nagy mennyiségben expresszálták az MDC-k (9. ábra „C” és „D”), megvizsgáltuk ezek szerepét az iC3b-vel opsonizált részecskék fagocitózisában. A kísérleteinkben használt élesztő (*S. cerevisiae*) és baktérium (*S. aureus*) a C3-at elsősorban iC3b formájában fixálja a sejt felszínén [112]. Az opsonizált élesztő és baktérium 4 °C-on és 37 °C-on történő phagocytosisát a 10. ábra „D” és „E” mutatja.

4.2.3 A CR3 domináns szerepe az iC3b-vel opsonizált antigén felvételében

Anak ellenére, hogy egyértelmű adatok nem mutatnak rá, a CR3 és CR4 funkcióját általában igen hasonlóknak tartják, hiszen mindkettő részt vesz az iC3b-vel opsonizált részecskék megkötésében és felvételében. A két receptor szerepéről alkotott képünk pontosítása érdekében vizsgáltuk az iC3b-vel opsonizált élesztő- és baktériumsejtek (*S. cerevisiae* és *S. aureus*) phagocytosisát éretlen MDC-kben anti-CD11b vagy anti-CD11c antitest jelenlétében is. Azt találtuk, hogy az anti-CD11b ellenanyag az izotípus-kontrollhoz képest szignifikánsan csökkentette az iC3b-vel opsonizált részecskék felvételét. Ez a hatás valamennyi, a kísérleteinkben használt antigén esetében egyformán érvényesült. Az anti-CD11c antitest semmilyen módon nem befolyásolta a phagocytosisát (11. ábra „A” és „B”).

Tekintettel arra, hogy az Fc-receptorok is részt vesznek a phagocytosisban, és interferálnak a komplementreceptorokkal, megvizsgáltuk annak a lehetőségét, hogy az anti-CD11b ellenanyag esetleg az Fc-receptorokra hatva fejtené ki az észlelt gátló hatását. Ennek érdekében vizsgáltuk nem opsonizált, illetve hőinaktivált szérummal előkezelt baktériumok phagocytosisát is MDC-kben. Utóbbi esetben komplementkötés nem jön létre, de IgG kapcsolódik az antigén felszínéhez, így az Fc-receptorok által közvetített phagocytosis lehetősége adott. Erdeményeink szerint a nem opsonizált baktériumokat az MDC-k csupán 12%-a vette fel, és az IgG-vel való opsonizáció is csak 17%-ra emelte ezt az arányt (11. ábra „C”). A normál szérummal előkezelt baktériumokat ellenben az MDC-k 66%-a phagocytálta (11. ábra „C”).

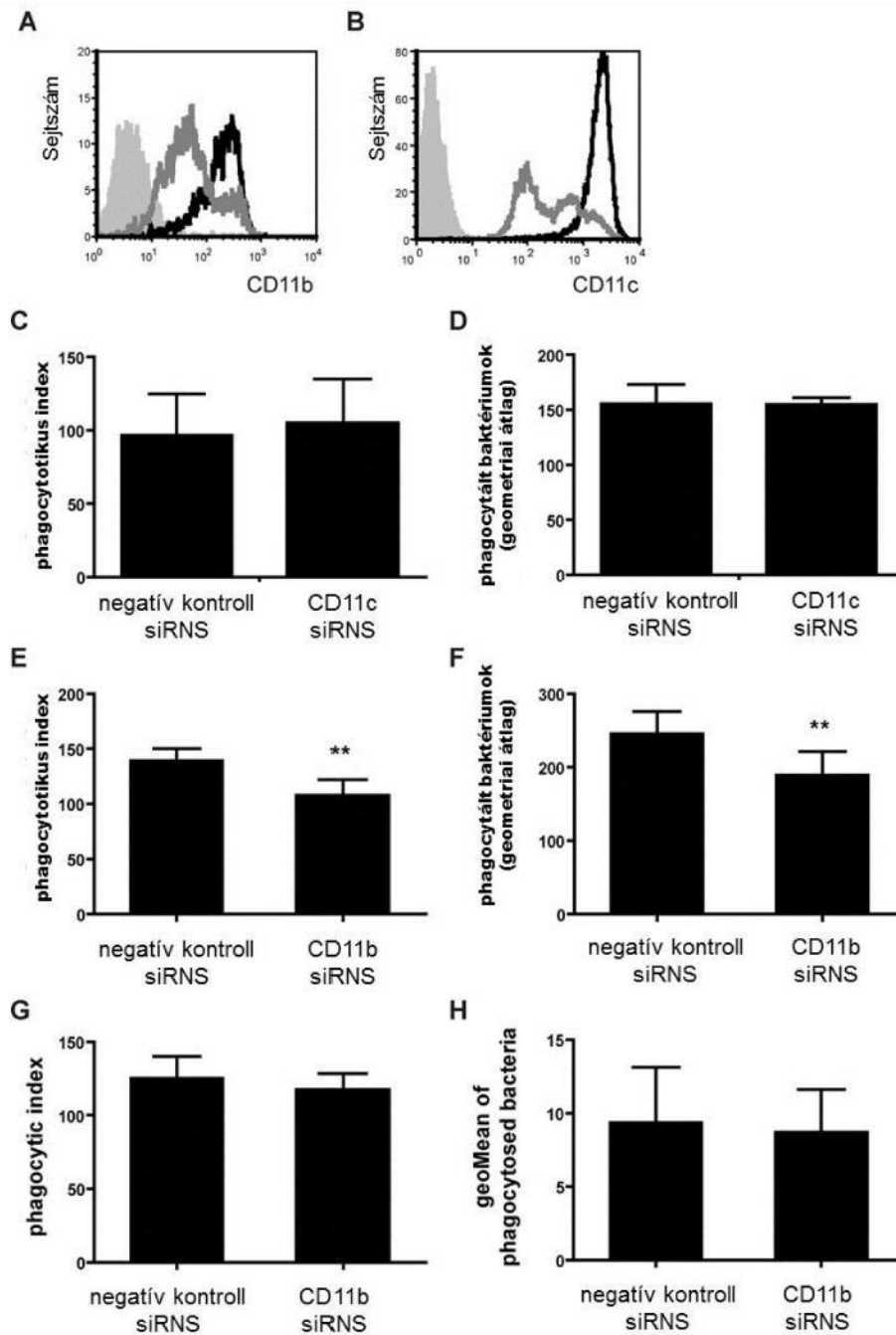


11. ábra. A CR3 receptor meghatározó szerepe a CR4-gyel szemben az iC3b-vel opsonizált antigén phagocytosisában imMDC-ben. „A” Opsonizált élesztő phagocytosisa anti-CD11b, antiCD11c és izotípuskontroll-ellenanyag jelenlétében (az adatok négy független kísérlet eredményét mutatják \pm SD). *P=0.0329. „B” Opsonizált baktérium phagocytosisa anti-CD11b, antiCD11c és izotípuskontroll-ellenanyag jelenlétében (az adatok négy független kísérlet eredményét mutatják \pm SD). *P=0.0387. „C” Nem opsonizált, hőinaktivált savóval opsonizált és iC3-vel opsonizált *S. aureus* phagocytosisa imMDC-kben (öt független kísérletből egy reprezentatívát mutatunk be). A számok a phagocytosisra

képes MDC-k százalékos arányát jelölik. A fekete görbe az MDC-kre vonatkozik, a szürke hisztogram az autofluoreszcencia. „D” és „E” Nem opsonizált (D) illetve hőinaktivált savóval opsonizált ϵ baktérium phagocytosisa anti-CD11b, antiCD11c és izotípuskontroll-ellenanyag jelenlétében (az adatok négy független kísérlet eredményét mutatják \pm SD). „F” Opsonizált baktérium phagocytosisa FcR-blokád mellett ill. anélkül (átlag \pm SD). Eredeti ábra angol nyelven: Sandor N, Kristof K, Parej K, Pap D, Erdei A, Bajtay Z: CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells. *Immunobiology*, **218**(4): pp. 652-63. (2013) [110]

A CD11b és CD11c együttes blokkolása nem volt hatással sem a hőinaktivált szérummal előkezelt, sem a nem opsonizált antigén felvételére (11. ábra „D” és „E”), ami arra enged következtetni, hogy a CR3 és CR4 receptorok MDC-kben nem befolyásolják az esetleges mintázatfelismerő-receptorok által közvetített, vagy Fc-receptor-mediált phagocytosist. A folyamatra nem volt hatással az Fc-receptor blokkoló jelenléte sem (11. ábra „F”).

A kapott eredményeinket megerősítették az siRNS-ekkel végzett kísérleteink is. A differenciálódó dendritikus sejteket CD11b-re vagy CD11c-re specifikus siRNS-sel transzfektáltuk, így a kontroll siRNS-kezelt csoporthoz képest a CR3-at vagy a CR4-et szignifikánsan alacsonyabb mennyiségben expresszáló éretlen MDC-ket kaptunk (12. ábra „A” és „B”). Az expresszió-csökkentés hatásfoka kb. 70%-os volt. A kezelt sejtekkel elvégezve kísérleteinket a korábban részletezettekkel egybevágó eredményeket kaptunk: a CD11c csökkent mennyisége nem befolyásolta az antigén phagocytosisát (12. ábra „C” és „D”), míg a CD11b expressziójának csökkenése jelentősen rontotta az iC3b-vel opsonizált élesztő vagy baktérium felvételét (12. ábra „E” és „F”). A CD11b-t alulexpresszáló és a kontroll MDC-k között nem találtunk különbséget a nem opsonizált antigének phagocytosisában (12. ábra „G” és „H”), így elvetettük annak lehetőségét, hogy a CD11b-specifikus siRNS a sejtek phagocytotikus kapacitását egészében rontotta volna.



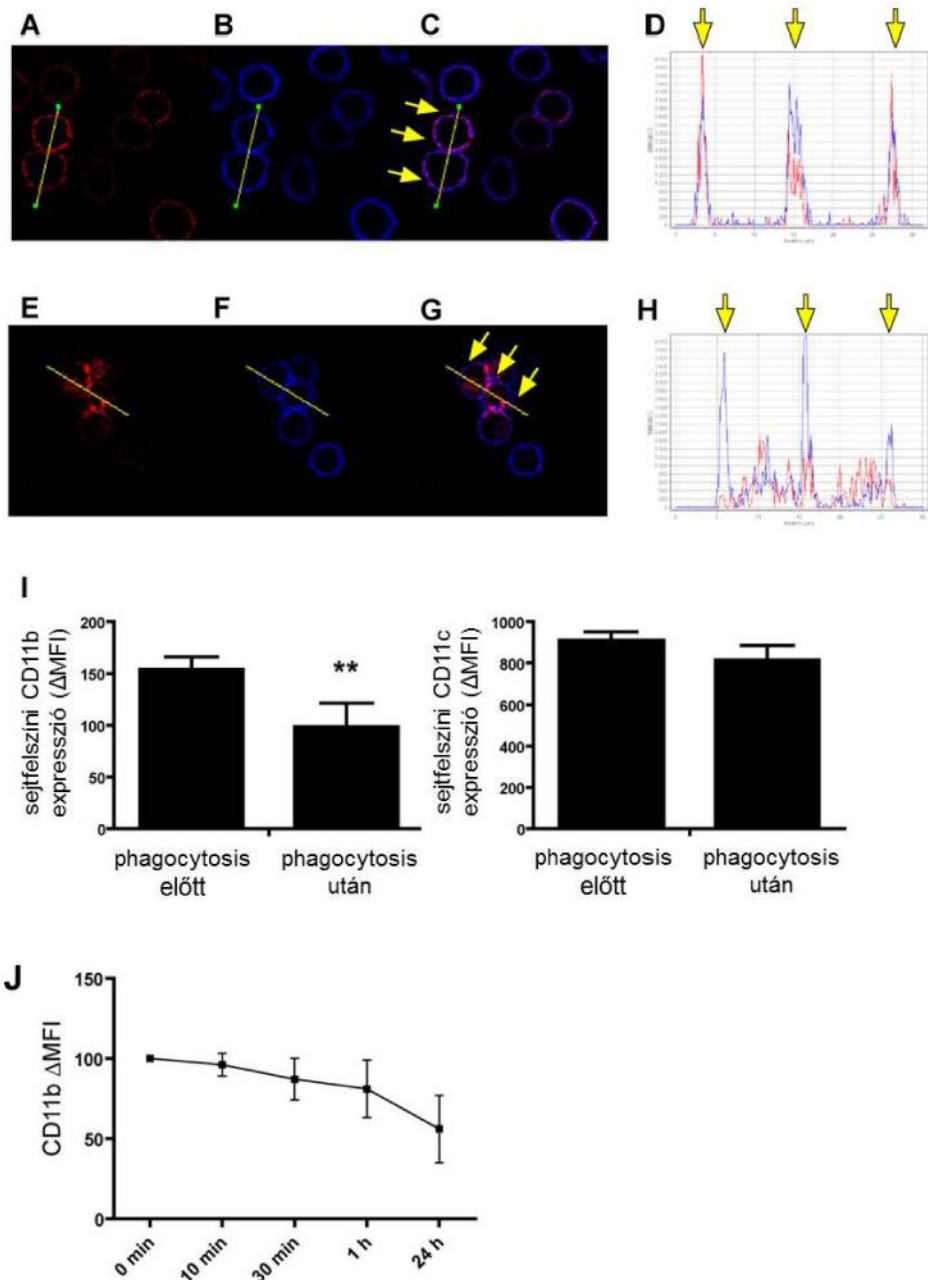
12. ábra. Az CD11b meghatározó szerepe iC3b-vel opsonizált antigének phagocytosisában imMDC-kben – siRNS-sel végzett kísérletek eredményei. „A” A CD11b expresszió csökkentésének eredményessége kb. 70%-os volt (egy reprezentatív mérést mutatunk be). A fekete görbe a kontroll, a szürke hisztogram a CD11b-specifikus siRNS-sel transzfektált MDC-kre vonatkozik. „B” A CD11c expresszió csökkentésének eredményessége kb. 70%-os volt (egy reprezentatív mérést mutatunk be). „C” és „D” Az iC3b-vel opsonizált élesztő („C”) és baktérium („D”) phagocytosisa kontroll és CD11c-t csökkenten expresszáló MDC-kben (öt független kísérlet átlaga±SD). „E” és „F” Az iC3b-vel opsonizált élesztő („E”) és baktérium („F”) phagocytosisa kontroll és CD11b-t csökkenten

expresszáló MDC-kben (öt független kísérlet átlaga \pm SD). $P=0.0065$ az élesztő, $P=0.0012$ a baktérium esetében. „G” és „H” Nem opsonizált élesztő („G”) és baktérium („H”) phagocytosisa kontroll és CD11c-t csökkenten expresszáló MDC-kben (öt független kísérlet átlaga \pm SD). Eredeti ábra angol nyelven: Sandor N, Kristof K, Parej K, Pap D, Erdei A, Bajtay Z: CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells. *Immunobiology*, **218**(4): pp. 652-63. (2013) [110]

4.2.4 A CR3 és CR4 sorsa az iC3b-vel opsonizált antigén felvétele során

A komplementreceptor-mediált phagocytosis részleteinek további vizsgálata érdekében konfokális mikroszkópiával követtük az iC3b-vel opsonizált, MDC-k által felvett *Staphylococcus aureus* sorsát. A 13. ábra „A-D” mutatja a CD11b (piros színnel) és a CD11c (kék színnel) elhelyezkedését az éretlen MDC-ken, a ligand jelenléte nélkül. A két szomszédos sejtet keresztező sárga vonal mentén kiszámítottuk és hisztogramon ábrázoltuk a fluoreszcencia-intenzitást. A felvételek alapján egyértelműen megállapítható a CR3 és CR4 receptorok kolokalizációja a sejtmembránon. A 13. ábra „E-H” mutatja a receptorok megjelölését követően 200 μ g/ml koncentrációjú iC3b-vel opsonizált *S. aureus* baktériumokkal inkubált MDC-eket. Látható, hogy ebben az esetben a CD11b a sejt belsejébe került, így majdnem teljesen eltűnt a membránról, míg a CD11c nagyrészt a sejt felszínén maradt.

A kapott eredmények megerősítése érdekében áramlási citometriával is megvizsgáltuk a sejtfelszíni CD11b és CD11c mennyiségét az opsonizált *S. aureus* felvétele előtt és után. A sejteket a ligand hiányában, majd később a phagocytosist követően is megjelöltük CD11b-re és CD11c-re. A 13. ábra „I” bemutatja, hogy a phagocytosist követően a CD11b mennyisége csökkent a sejtmembránon, míg a CD11c változatlanul jelen volt. A 13. ábra „E” része – ahol a CD11b majdnem teljesen hiányzik a membránról – és „I” része – ahol a molekula még a phagocytosist követően is jelen van a felszínen – közötti látszólagos ellentmondást magyarázza, hogy a CD11b recirkulációja a membrán és a sejten belüli készletek között igen gyors [113]. A citofluorimetriás méréseknél ezért meg tudtuk jelölni azokat a receptorokat is, melyek a membránra kerülnek, míg a konfokális mikroszkópia során a CD11b eltűnik a sejtfelszínről, mivel a molekulákat csak közvetlenül a phagocytosis előtt jelöltük meg. Adataink arra is utalnak, hogy a CD11c is részt vehet a komplementreceptor-mediált antigénfelvételben, szerepe azonban nem meghatározó.



13. ábra. A CR3 és CR4 sorsa az iC3b-vel opsonizált antigén megkötését követően. A CD11b-t piros, a CD11c-t kék színnel jelöltük meg. „A” CD11b elhelyezkedése, „B” CD11c elhelyezkedése, „C” a két felvétel átfedése antigén hiányában. „D” A jelölt receptorok fluoreszcencia-intenzitása a feltüntetett sárga vonal mentén. Látható, hogy mindkét receptor a sejtmembránon (sárga nyilak) található. „E-H” iC3b-vel opsonizált *S. aureus* phagocytosisát követően a CD11b (piros színnel) és CD11c (kék színnel) kolokalizációja megbomlik, a CD11b szinte maradéktalanul belép a sejt belsejébe, míg a CD11c nagyrészt a membránon marad. „I” Sejt felszíni CD11b és CD11c kimutatása imMDC-ken áramlási citometriával az iC3b-vel opsonizált *S. aureus* phagocytosisa előtt és után (három független kísérlet átlaga±SD). **P=0.0052. „J” A CD11b ligandkötő helyére specifikus

TMG6-5 ellenanyaggal kezeltük az MDC-eket jégen, mely az antitest kötését megengedi, az internalizációt azonban nem. Ezután mosást követően 37 °-on inkubáltuk a sejteket, és a feltüntetett időpontokban áramlási citometriával mértük a sejtfelszíni CD11b mennyiségét (három független kísérlet átlagát tüntettük fel \pm SD). Eredeti ábra angol nyelven: Sandor N, Kristof K, Parej K, Pap D, Erdei A, Bajtay Z: CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells. *Immunobiology*, **218**(4): pp. 652-63. (2013) [110]

A CR3 szerepének további feltárása érdekében felhasználtuk a TMG6-5 ellenanyagot, mely specifikus a CD11b ligandkötő helyére. Mindenekelőtt ellenőriztük, hogy az antitest a természetes ligandhoz hasonlóan viselkedik-e, így citofluorimetriával követtük a TMG6-5-tel kezelt MDC-k esetében az internalizációt. A 13. ábra „J” mutatja, hogy a TMG6-5 által keresztkötött CD11b hasonlóképpen internalizálódott, mint a természetes ligand esetében. Erre az adatra alapozva a továbbiakban a TMG6-5 antitest felhasználásával vizsgáltuk a CD11b funkcióját az éretlen dendritikus sejteken.

4.2.5 A CR3 keresztkötése nem vezet a DC-k éréséhez

Eredményeink szerint mind a CR3, mind a CR4 aktív konformációs állapotban található meg az éretlen MDC-k felszínén, készen természetes ligandja kötésére. Miután kimutattuk a CD11b domináns szerepét az iC3b-mediált phagocytosisban, arra kerestük a választ, hogy a folyamat elindíthatja-e a dendritikus sejtek érését. Ehhez az éretlen MDC-eket vagy iC3b-vel, vagy a TMG6-5 ellenanyaggal kezeltük – előbbi előnye, hogy a receptorokat természetes ligandjukkal ingereljük, hátránya viszont, hogy nem specifikus, hiszen mind a CD11b, mind pedig a CD11c köti. A sejteket 37 °C-on 30 percig inkubáltuk a különböző ligandok jelenlétében, majd mosást követően további két napig tenyésztettük őket. A sejtek aktivációs állapotát áramlási citometriával vizsgáltuk, a sejtfelszíni MHCII, MR, CD40, CD83 és CD86 expresszió meghatározásával. A 3. táblázatban bemutatott adatok alapján megállapítottuk, hogy sem az iC3b, sem a TMG6-5 ill. az izotípuskontroll nem okozott szignifikáns változásokat az MDC-k fenotípusában. Mindez arra utal, hogy a korábban leírt tolerogén hatás [114-119] nem CD11b-dependens. Pozitív kontrollként LPS-kezelt dendritikus sejteket használtunk, melyek klasszikus

aktivációs mintázatot – fokozódó MHC II, CD40, CD83, CD86, és csökkent MR expresszió – mutattak (3. táblázat).

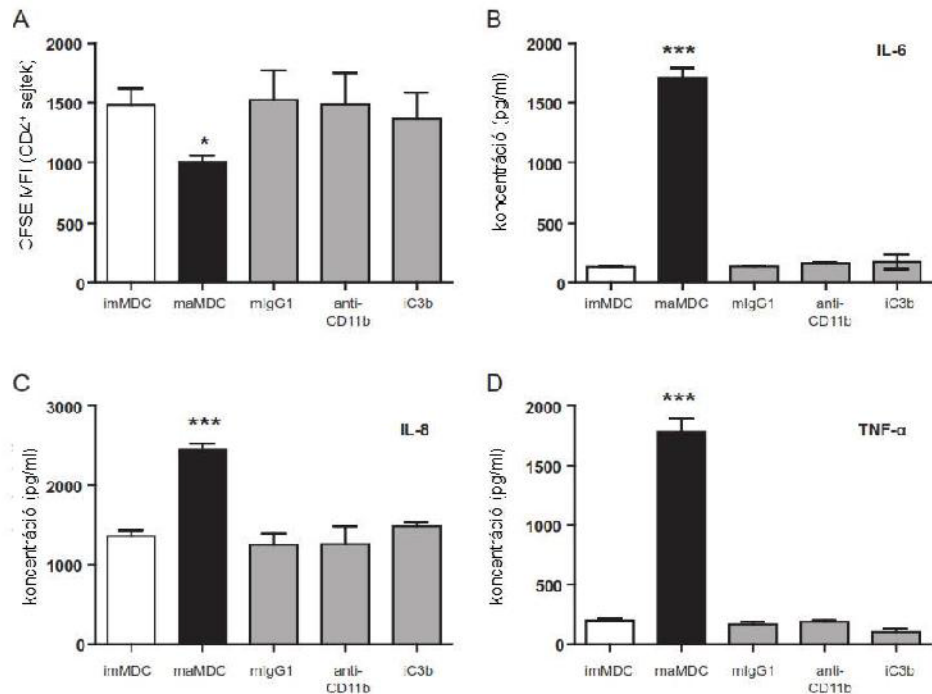
	imDC	maDC	Izotípus-kontroll	anti-CD11b	iC3b
MHC II	293.95 ± 61.08	456.61 ± 51.35	317.46 ± 34.53	265.65 ± 61.2	288.73 ± 40.23
MR	44.97 ± 2.87	32.26 ± 1.6	44.57 ± 3.83	45.02 ± 5.11	45.84 ± 3.46
CD40	204.42±14.18	294.42 ± 24.84	217.42±15.79	226.45 ± 23.18	224.6 ± 18.61
CD83	8.10 ± 0.45	25.93 ± 2.33	7.53 ± 0.76	7.25 ± 0.74	7.08 ± 0.75
CD86	50.44 ± 3.03	138.38 ± 58.32	49.65 ± 12.08	47.22 ± 10.23	39.21±7.98

3. Táblázat. Sejtfelszíni markerek expressziója áramlási citometriás meghatározással éretlen és érett MDC-ken, valamint iC3b-vel, anti-CD11b-vel és izotípuskontroll antitesttel kezelt imMDC-ken. Az érett MDC-eket LPS-sel való inkubáció révén nyertük imMDC-ekből. Az érett MDC-k és a nem kezelt kontroll sejtek összehasonlításában: P=0.0019 (MHC II); P<0.0001 (MR); P=0.0001 (CD40); P<0.0001 (CD83); P=0.0098 (CD86). Öt független kísérlet átlagos Δ MFI értékeit adjuk meg \pm SD. Eredeti táblázat angol nyelven: Sandor N, Kristof K, Parej K, Pap D, Erdei A, Bajtay Z: CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells. *Immunobiology*, 218(4): pp. 652-63. (2013) [110]

4.2.6 A CR3 ligandkötése nem befolyásolja a DC-k T-sejt aktivációját és citokintermelését

Munkánk során vizsgáltuk az iC3b-vel illetve TMG6-5 ellenanyaggal kezelt sejtek citokintermelését és allogén T-sejt aktiváló képességét is. Az éretlen DC-eket két napig inkubáltuk az iC3b vagy a TMG6-5 jelenlétében, majd további 4 napra allogén T-lymphocytákkal tenyésztettük őket tovább 1:5-ös DC:T-sejt arányban. Áramlási citometriával vizsgáltuk a CFSE- és CD4-jelölt T-sejtek proliferációját. A 14. ábra mutatja, hogy sem az iC3b, sem a TMG6-5 nem befolyásolta a dendritikus sejtek T-sejt aktiváló kapacitását. Mértük továbbá a kezelt sejtek IL-8, IL-6 és TNF α -termelését is, de azt találtuk, hogy a CR3 ingerlése nem váltja ki számottevően az említett citokinek termelését (14. ábra „B-D”). Pozitív kontrollként itt is LPS-kezelt

sejteket használtunk, melyek jól stimuláltak az allogén T-lymphocytákat és nagy mennyiségben termelték az említett citokineket.



14. ábra. A CR3 receptor ingerlésének funkcionális következményei MDC-kben. „A” Éretlen, érett, izotípuskontroll antitesttel, anti-CD11b-vel illetve iC3b-vel inkubált MDC-k allogén T-sejt aktiváló képessége. „B-D” Az említett sejtcsoportok IL-6, IL-8 és TNF- α termelése. Öt független kísérlet átlagát \pm SD adjuk meg. *P=0.0271;***P<0.0001. Eredeti ábra angol nyelven: Sandor N, Kristof K, Parej K, Pap D, Erdei A, Bajtay Z: CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells. *Immunobiology*, **218**(4): pp. 652-63. (2013) [110]

5. DISZKUSSZIÓ

A modern intenzív terápia bővülő lehetőségei ellenére a súlyos fertőzések okozta halálozás napjainkban is elfogadhatatlanul magas [2]. Ehhez jelentős mértékben hozzájárul, hogy a sepsis immunológiájával kapcsolatos ismereteink a gyorsuló ütemű alapkutatások mellett is egyelőre hiányosak. Az eddigi eredmények alapján körvonalazódni látszik, hogy a sepsis nem tekinthető egységes betegségnek, mert bár klinikailag hasonlóan nyilvánulhat meg, immun-pathomechanizmusát tekintve a kórokozó flóra mikrobiológiai jellemzőitől, a fertőzéses góc elhelyezkedésétől és a beteg egyéni jellemzőitől függően igen heterogén szindróma [120]. Az eredményes beavatkozásnak, illetve a halálozás további csökkentésének kikerülhetetlen feltétele, hogy jobban megismerjük az emberi antimikrobiális immunválasz részleteit, továbbá az általános infekció-biológiai tudás mellett a súlyos, életveszélyes fertőzések kórélettanáról is kiegészítő ismeretekkel rendelkezzünk.

Az intestinalis nyálkahártyának a sepsis kórélettanában betöltött szerepe igen régóta napirenden van a gyulladás-immunológiai kutatások kapcsán. A kezdeti elképzelést, mely szerint a sérült nyálkahártyán át történő bakteriális transzlokáció az immunológiailag túlterhelt szervezet szövetei felé a sepsis „motorja” lenne, az utóbbi évek kutatási eredményei finomították. Kiderült, hogy az intestinalis mikrobiális közösség messzemenőkéig nem passzív résztvevője az eseményeknek, hanem a QS-rendszer révén érzékenyen, aktívan és koordináltan reagál az otthonukat biztosító szervezetet fenyegető állapotokra. Amennyiben a baktériumok veszélyben érzik környezetüket és a bélrendszerben való túlélésüket, egymással folyamatosan kommunikálva virulenciagéneket kapcsolnak be, toxinokat termelnek, megbontják a hám védelmi rendszerét és elárasztják a gazdaszervezet szöveteit [26].

A klasszikus immunológiából ismert jelenség, hogy az adaptív immunrendszer specificitása nem száz százalékos, mert a lymphocyták által felismert epitópok viszonylag kis kiterjedésűek, és azonos vagy hasonló motívumok egymástól eltérő antigéneken is jelen lehetnek. Újabb adatok szerint T-sejtek esetében ezek a tévedések meglehetősen mindennaposak, és valószínűségük matematikailag megbecsülhető [25]. Ismerve azt a jelenséget, hogy az intestinalis baktériumok

veszély-érzékelése azok kifejezett virulenciáját idézhet elő, felmerült a lehetőség, hogy amennyiben a kórokozó ellen indukált T-lymphocyták a bélbaktériumok felé irányuló molekuláris mimikri miatt „tévedésből” szekunder gyulladást okoznak a bálnyálkahártyában, az a sepsis súlyosságát illetve kimenetelét ronthatja. Munkánk során bioinformatikai eszközök segítségével vizsgáltuk ezt a hipotézist.

Vizsgálatunkhoz a pneumonia eredetű sepsist választottuk. Ez egyfelől megkönnyítette a kórokozó vagy kórokozók igen pontos, mikrobiológiailag és klinikailag is egyértelmű azonosítását – mely számításaink előfeltétele volt – hiszen az alsó légutak élettani körülmények között sterilek, így kontamináló normál flóra nem zavarta a vizsgálatot. Másfelől, mivel a fertőzés elsődleges helye anatómiailag távol volt a bálnyálkahártyától, a molekuláris mimikri révén potenciálisan kialakuló szekunder gyulladást nem befolyásolhatta a primer góc közvetlen közelsége. Lényeges volt továbbá, hogy ezen a módon egységessé vált a vizsgálati populáción belül a fertőzés góca, mely hitelesebbé tette a kapott eredményeket. Tekintettel arra, hogy a beválasztási kritériumaink igen szigorúak voltak (kizártuk az extrapulmonalis fertőzéses góccal rendelkezőket, valamint – magán a sepsisen kívül – a bármilyen immunszuppressziót illetve immunmodulációt okozni képes kísérőbetegséggel/állapottal kezelt betegeinket is), a vizsgálati csoport viszonylag kis létszámú maradt. Megemlítjük azonban, hogy a csoport rizikófaktorai illetve mortalitási mutatói is megegyeznek a szakirodalomban fellelhető korábbi adatokkal [105, 121-124], mely alátámasztja a minta reprezentatív voltát. A maximális pontosság érdekében a mikrobiológiai diagnózist haemokulturák és BAL (broncho-alveolaris lavage) minták tenyésztése alapján nyertük, a molekuláris mimikri matematikai becslését pedig egy közölt, kísérletesen validált, meglehetősen precíz közelítést adó algoritmus alapján végeztük el [25].

Azt találtuk, hogy a kórokozó flóra és az intestinalis baktériumok közötti, lineáris epitópokat figyelembe véve becsült immunológiai hasonlóság rosszabb APACHE II betegsúlyossági pontszámokkal, és kedvezőtlen kimenetellel (a beteg halálával) asszociált. Az inflammációs kvóciensek ebben a tekintetben pontosabb összefüggést mutattak a vizsgált paraméterekkel, ami várható is volt, tekintettel arra, hogy ezek az értékek – a számított „nyers” kórokozó versus bélbaktériumok mimikrirel ellentétben – figyelembe veszik azt is, hogy az autoantigénekre jobban hasonlító epitópokkal szemben kevésbé várható lymphocytaválasz. Mindez teljesen

összhangban volt a mimikri becslésére szolgáló algoritmus szerzőgárdájának megfigyeléseivel is, mely szerint egy epitóp immunigenitása exponenciális összefüggésben áll az autoantigénekhez való hasonlósága reciprokával [25]. Tekintettel arra, hogy vizsgálati csoportunk a szigorú beválasztási kritériumok miatt kis létszámú volt, megvizsgáltuk a jóval terjedelmesebb betegpopulációt áttekintő SOAP vizsgálat eredményeit is. Azt találtuk, hogy az egyes kórokozókra kiszámolt inflammációs kvóciensek korreláltak a kórokozóhoz kapcsolódó sepsis mortalitási mutatókkal. Természetesen ezt az összefüggést megfelelő kritikával kell szemlélnünk, hiszen ebben az esetben a betegekre nem teljesültek a maximális precizitást biztosító feltételek (fertőzéses góc egységessége, releváns kísérőbetegségek kizárása). Ennek ellenére a kapott összefüggés figyelemre méltó.

Számításaink természetéből fakadóan az inflammációs kvóciensek valójában azt fejezik ki, hogy az eredetileg kórokozókkal szemben indukált T-lymphocyták molekuláris mimikri révén várhatóan milyen mértékű szekunder gyulladást képesek okozni az intestinalis nyálkahártyában (részletesen lásd a „Módszerek” fejezetben). Az InfQ értékek és a betegség súlyossága illetve kimenetele közötti összefüggés maximálisan összhangban áll azokkal az eredményekkel, melyek szerint a bélbaktériumok fokozott invazivitással és agresszivitással reagálnak környezetük veszélyeztetettségére, valamint azzal is, hogy a stressz alatt álló bélnyálkahártyából elvezetett nyirok sokszervi elégtelenség kialakulásához hozzájáruló mediátorokat tartalmazhat [26]. Valószínűnek tűnik, hogy ezekkel függhet össze a kórokozó versus bélflóra mimikri negatív hatása sepsisben.

Eredményeink újra felhívják a figyelmet arra az ismertetett, ám a klinikumban gyakran ignorált tényre, hogy a kórokozó természete messzemenőkéig befolyásolja a sepsis immunpathomechanizmusát, a szervezet válaszát, és végső soron a betegség lefolyását illetve kimenetelét. Mindez megfogalmazódott már a PIRO-konceptióban („predisposition, infection, response, organ dysfunction”) is, mely a sepsist a predisponáló faktorok, a fertőzés jellege, a szervezet válasza és a kialakuló szervdiszfunkciók alapján igyekszik megérteni [125]. Vizsgálatunk alapján felmerül annak lehetősége, hogy a kórokozó és az intestinalis mikrobiális közösség közötti molekuláris mimikri egyike lehet azon tényezőknek, melyek megkülönböztetik a mikrobiológiailag eltérő sepsis-típusokat.

Igen figyelemreméltó, hogy az inflammációs kvóciensek a Gram-negatív kórokozók esetében statisztikailag magasabbak, mint a Gram-pozitív csoportban. Mindez természetesen érthető, hiszen ismerjük a bélbaktériumok Gram-negatív túlsúlyát. Mindezek alapján azonban felmerül annak lehetősége, hogy a Gram-negatív kórokozók – általában, de nem mindig! – azért okoznának *in vivo* nagyobb amplitúdójú gyulladási választ sepsisben [16-18, 20-22], mert a bélbaktériumokkal mutatott immunológiai hasonlóság révén egy önrontó gyulladási kört hoznának létre az intestinalis nyálkahártyában. Ebben a folyamatban egyértelmű, hogy nem közvetlenül a Gram-negatív sejtfallal függne össze ez a jelenség, hanem egy, a Gram-negativitáshoz asszociáló másodlagos tulajdonsággal (a magasabb inflammációs kvóciensekkel). Mindez érthetőbbé tenné azt a jelenséget, hogy *in vitro* a Gram pozitívak is jól indukálják a gyulladási citokinek termelődését, valamint azt is, hogy a Gram-negatív csoport magasabb gyulladáskeltő potenciálja csak általánosságban igaz, egyéni kivételek vannak.

Természetesen meg kell említenünk vizsgálatunk korlátait is. Mindenekelőtt tudnunk kell, hogy a matematikai modellezés – bár a kísérletes munkának igen hasznos kiegészítője – soha nem pótolhatja azt, csupán alapul szolgálhat további ötletek megszületéséhez, illetve igazolásra váró hipotéziseket állíthatunk fel segítségével. Másrészt, a vizsgálati populáció viszonylag alacsony létszáma is óvatosságra int, mielőtt messzemenő következtetéseket vonnánk le. Meg kell említenünk azt is, hogy az inflammációs kvóciensek számításakor az ember fiziológiás normál flóráját vettük alapul, melynek összetétele egészséges egyének közötti összehasonlításban meglehetősen kis szórásokat mutat [102], ám sepsisben gyorsan és dinamikusan változik. Ez komoly problémát jelenthetne, viszont figyelembe véve, hogy az APACHE II pontszámok az első 24 óra paraméterei alapján kerülnek kiszámításra, eredményeink értelmezhetők maradnak. Mindössze tudatában kell lennünk, hogy a bélnyálkahártya ellen induló legelső szekunder gyulladási szub összefüggését vizsgáltuk az első 24 óra eseményeivel, valamint a betegség végső kimenetelével. Mindezen korlátok ellenére a kapott összefüggések jó szignifikanciája és teljes elméleti összhangja az elmúlt évek eredményeivel igen figyelemreméltó, elgondolkodtató, és további kísérletes kutatásokra ösztönöz.

A septicus betegek ellátása során a bélnyálkahártyában folyó események melletti további kellemetlen jelenség a szekunder immunparalízis, és ehhez

kapcsolódóan a másodlagos fertőzésekre való fokozott hajlam. A jelenség immunológiai-biológiai háttere még messzemenőkéig nem tisztázott részleteiben, de hozzájárulhat a problémához, hogy sepsisben a monocyta eredetű dendritikus sejtek jelentős mértékben tolerogén módon differenciálódnak, és anergiás vagy regulatorikus irányban elkötelezett T-lymphocytákat indukálnak [98]. Ennek pontos molekuláris alapja egyelőre még nem felderített, mindazonáltal egyes adatok felvetették a CR3 komplementreceptor potenciális szerepét dendritikus sejtek toleralizálásában [99, 100]. Vizsgálatunk második felében így a CR3 és CR4 komplementreceptorok szerepét jártuk körül humán monocyta eredetű dendritikus sejtek működésében, és beleértve a T-lymphocyták indukcióját is.

Azt találtuk, hogy a CD11b összekapcsolódása természetes ligandjával, az iC3b-vel, vagy a kötőhelyre specifikus ellenanyaggal a CR3 receptor 10 percen belüli internalizálódásához vezet, de ez a jelenség nem jár együtt a dendritikus sejtek fenotípusának megváltozásával. Mindez igencsak figyelemreméltó, hiszen korábbi vizsgálatok eredményei alapján a CR3 elsősorban inhibitoros receptornak tűnt, mely immunológiai tolerancia kialakulását segítené [99, 104, 115, 118, 126, 127].

Az általunk használt kísérleti rendszerben a CD11b blokkolása szignifikánsan csökkentette az iC3b-vel opszonizált élesztő vagy *Staphylococcus aureus* éretlen monocyta eredetű dendritikus sejtek általi felvételét, míg a CD11c gátlása nem okozott kimutatható zavart a folyamatban. Mindez összecseng más kutatók eredményeivel, akik monocyták vizsgálata során azt találták, hogy a CD11c ugyan részt vesz a sejtadhézióban, de a CD11b szerepe lényegesen fontosabb a citoskeletális mozgások megindításában [128]. Eredményeink azt mutatják, hogy ugyan a CR3 és a CR4 receptorok egyaránt szerepet játszanak a komplementfehérjével opszonizált részecskék felvételében, a CD11c-hez való kapcsolódás önmagában nem elegendő a phagocytosis megindulásához, ebben a CD11b kiemelt jelentősége egyértelmű.

A C3 komplementkomponens egy akutfázis-fehérje, aktivációs termékeinek mennyisége a gyulladásos stimulusokra megemelkedik a különböző testnedvekben. Munkacsoportunk korábbi eredményei azt mutatták, hogy a monocyta eredetű dendritikus sejtek a macrophagokkal szemben nem termelnek C3-at, viszont képesek azt kovalensen megkötni a felszínükön, és ez a folyamat a DC-k éréséhez, valamint az allogén T-sejtek proliferációjának hatékony stimulálásához vezet [97]. Jelen

munkánk során azt találtuk, hogy a patogén felszínén fixált iC3b és a dendritikus sejtek CR3 illetve CR4 receptorai közötti interakció más-más következményekkel jár. Bemutattuk, hogy – ellentétben a kovalensen fixált C3-fragmentumokkal – az iC3b kötődése a CR3 illetve CR4 receptorokhoz nem vezetett a dendritikus sejtek differenciációjához, sem proinflammatorikus citokinek termeléséhez, ráadásul a dendritikus sejtek allogen T-sejt stimuláló kapacitását sem befolyásolta az iC3b. Ezek az eredmények, valamint munkacsoportunk korábbi adatai kiemelik az érésben lévő dendritikus sejt mikrokozonyzatának jelentőségét. Ugyanis teljesen más élettni válaszhoz vezet, ha a dendritikus sejtnek lehetősége van C3-at fixálni saját C3b-akceptor helyein, vagy ha éppen iC3b-vel opszonizált antigénnel hat kölcsön. Feltételezésünk szerint előbbi esetben a dendritikus sejtek környezetében lévő macrophagok által szekretált natív C3-at a dendritikus sejtek membránhoz kötött proteázaikkal elhasítják, és kovalensen megkötik [106, 129-132]. Abban az esetben azonban, amikor érésben lévő dendritikus sejtek kölcsönhatnak iC3b-vel opszonizált antigénnel, a CR3 és CR4 receptoroké lesz a főszerep, és a végeredmény egészen más lehet. A CR3 receptoron keresztüli stimulus önmagában nem vezet a dendritikus sejtek differenciálódásához, de ezeknek a receptoroknak komoly szerep jut a komplementtel opszonizált patogének felvételében. Másrészt a CR4 receptor önmagában nem képes phagocytosis iniciálására. Úgy tűnik, igen bonyolult összjáték van a dendritikus sejtek különböző komplement-kötő struktúrái között, mely döntő módon befolyásolja a sejt aktuális válaszát. Mindenképpen további kutatásokra lesz szükség, hogy jobban megértsük ezeket az interakciókat, így a CR3 és CR4-es komplementreceptorok élettni funkciójáról is pontosabb képet kapjunk.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során a kórokozó és az intestinalis mikrobialis flóra közötti T-sejtes molekuláris mimikri, valamint a dendritikus sejtek CR3 és CR4 receptorainak szerepét vizsgáltuk a humán antimikrobiális immunválaszban.

Megállapítottuk, hogy humán pneumonia eredetű sepsisben a kórokozó és a bélbaktériumok közötti, lieáris epitópok szintjén értelmezett immunológiai hasonlóság a betegség súlyosságát mutató APACHE II ponszámokkal korrelál, és magasabb értéke a kezvezőtlen klinikai kimenetellel (a beteg halálával) asszociál. Korrelációt mutattunk ki a nagy számú septicus beteget magában foglaló SOAP vizsgálat sepsis mortalitási adatai és a kérdéses kórokozókra kiszámított inflammációs kvóciensek között. Ez az összefüggés – a saját vizsgálatunkban is használt szigorú beválasztási kritériumok nem teljesülése miatt – kritikával szemlélendő, de figyelemreméltó. A jelenség okának a kórokozó-specifikus T-sejtek által, molekuláris mimikri révén a bélnyálkahártyában okozott szekunder gyulladást sejtjük, mely aktiválhatja a bélbaktériumok QS-rendszerét, és koordinált, gazdaszervezet-ellenes bakteriális offenzívát idézhet elő. Kimutattuk továbbá, hogy a Gram-negatív kórokozócsoport – a bélbaktériumok Gram-negatív dominanciája alapján érthetően – magasabb inflammációs kvóciensekkel rendelkezik, ami felveti a lehetőségét, hogy a Gram-negatív sepsist kísérő általában nagyobb amplitúdójú gyulladási reakció esetleg a mimikri okozta szekunder intestinalis gyulladással, és nem közvetlenül a kórokozó sejtfalának összetételével függhet össze.

A humán MDC-k vizsgálata során megállapítottuk, hogy a DC-k érése során a CR3 sejtfelszíni expressziója csökken, a CR4-é nő. A CR3 és CR4 receptorok közül az iC3b-vel opsonizált részecskék phagocytosisában a CR3 kiemelkedő szerepe egyértelmű a CR4-gyel szemben. Megállapítottuk, hogy a CR3 receptor ugyan komoly szerepet játszik a komplementtel opsonizált kórokozók phagocytosisában, nem befolyásolja sem a DC-k differenciációját, sem citokintermelésüket, sem T-sejt aktiváló képességüket. A CR3-ról mint toleranciát közvetítő receptorról szóló korábbi adatok tükrében eredményeink kiemelik a sejt mikrokozonyának jelentőségét az érés során, mely alapjaiban befolyásolhatja a sejt későbbi válaszait.

7. SUMMARY

In this work, we undertook to investigate the role of T-cell molecular mimicry between pathogens and gut commensals along with CR3 and CR4 complement receptors of dendritic cells in human antimicrobial immunity.

We have found, that the immunological similarity between the pathogenic flora and gut bacteria on the level of linear epitopes correlates with APACHE II scores and associates with disadvantageous outcome (death of patients) in human pneumonia-induced sepsis. We also found a correlation between sepsis mortality rates by causative agent and corresponding inflammatory quotients based on the results of the SOAP study, which investigated a large number of septic patients. The latter relationship must be interpreted with caution, since maximally accurate comparison would require strict enrollment criteria (standardization of the study population along with the site of infection), it is however notable. As the primary reason for this phenomenon, we suppose a secondary inflammation in the gut mucosa induced by pathogen-specific T lymphocytes via molecular mimicry, that trigger the bacterial QS-system and induces a coordinated bacterial attack against the host. We also found, that Gram-negative species tend to reach higher inflammatory quotients, which is comprehensible considering the Gram-negative dominance of the gut flora. This finding however raises the possibility, that the potencial of Gram-negative pathogens to induce a higher-amplitude inflammatory response in sepsis might be primarily related to molecular mimicry and not the structure of the cell wall itself.

Investigating human MDC-s, we found that the expression of CR3 decreases, while that of CR4 increases by the maturation of dendritic cells. In the phagocytosis of iC3b-opsonized particles by DCs, the dominant role of CR3 over CR4 was obvious. We found, that although CR3 had a celar role in the phagocytosis of complement-opsonized pathogens, it had no effect on the differentiation, cytokine production and T-cell activating ability of dendritic cells. Considering former results, that report CR3 to mediate tolerogenic signals, our results underline the importance of the microenvironment of dendritic cells, which fundamentally affects the actual response of the cell.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. *Az Egészségügyi Minisztérium szakmai irányelve A súlyos szepszis és a szeptikus sokk kezelése.* Egészségügyi Közlöny, 2005. **12**.
2. Harrison, D.A., C.A. Welch, and J.M. Eddleston, *The epidemiology of severe sepsis in England, Wales and Northern Ireland, 1996 to 2004: secondary analysis of a high quality clinical database, the ICNARC Case Mix Programme Database.* Crit Care, 2006. **10**(2): p. R42.
3. Dellinger, R.P., et al., *Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock.* Intensive Care Med, 2004. **30**(4): p. 536-55.
4. Dellinger, R.P., et al., *Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock.* Crit Care Med, 2004. **32**(3): p. 858-73.
5. Dellinger, R.P., et al., *Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008.* Crit Care Med, 2008. **36**(1): p. 296-327.
6. Dellinger, R.P., et al., *Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008.* Intensive Care Med, 2008. **34**(1): p. 17-60.
7. Dellinger, R.P., et al., *Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012.* Intensive Care Med. **39**(2): p. 165-228.
8. Dellinger, R.P., et al., *Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012.* Crit Care Med. **41**(2): p. 580-637.
9. Levy, M.M., et al., *The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis.* Intensive Care Med. 2010. **36**(2): p. 222-31.

10. Levy, M.M., et al., *The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis*. Crit Care Med. 2010. **38**(2): p. 367-74.
11. Ramnath, R.D.W., S. He, M. Sun, J. Zhang, H. Bawa, M. S. Bhatia, M., *Inflammatory mediators in sepsis: Cytokines, chemokines, adhesion molecules and gases*. Journal of Organ Dysfunction, 2006. **2**: p. 80-92.
12. Meduri, G.U., et al., *Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time*. Chest, 1995. **107**(4): p. 1062-73.
13. Casey, L.C., R.A. Balk, and R.C. Bone, *Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome*. Ann Intern Med, 1993. **119**(8): p. 771-8.
14. Ostanin, A.A., et al., *Inflammatory Syndromes (SIRS, MARS, CARS) in Patients with Surgical Infection*. Russ J Immunol, 2000. **5**(3): p. 289-300.
15. Minnich DJ, M.L., *Anti-cytokine and anti-inflammatory therapies for the treatment of severe sepsis: progress and pitfalls*. Proc Nutr Soc., 2004. **63**(3): p. 437-441.
16. Abe, R., et al., *Gram-negative bacteremia induces greater magnitude of inflammatory response than Gram-positive bacteremia*. Crit Care, 2010. **14**(2): p. R27.
17. Hessele, C.C., B. Andersson, and A.E. Wold, *Gram-positive and Gram-negative bacteria elicit different patterns of pro-inflammatory cytokines in human monocytes*. Cytokine, 2005. **30**(6): p. 311-8.
18. Xu, X.J., et al., *Inflammatory cytokine measurement quickly discriminates gram-negative from gram-positive bacteremia in pediatric hematology/oncology patients with septic shock*. Intensive Care Med, 2013. **39**(2): p. 319-26.
19. Opal, S.M. and J. Cohen, *Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis?* Crit Care Med, 1999. **27**(8): p. 1608-16.

20. Feezor, R.J., et al., *Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria*. *Infect Immun*, 2003. **71**(10): p. 5803-13.
21. Charles, P.E., et al., *Serum procalcitonin elevation in critically ill patients at the onset of bacteremia caused by either Gram negative or Gram positive bacteria*. *BMC Infect Dis*, 2008. **8**: p. 38.
22. Vandijck, D.M., et al., *Dynamics of C-reactive protein and white blood cell count in critically ill patients with nosocomial Gram positive vs. Gram negative bacteremia: a historical cohort study*. *BMC Infect Dis*, 2007. **7**: p. 106.
23. Ley, K., E. Smith, and M.A. Stark, *IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes*. *Immunol Res*, 2006. **34**(3): p. 229-42.
24. Richards, H., et al., *Novel role of regulatory T cells in limiting early neutrophil responses in skin*. *Immunology*. 2010. **131**(4): p. 583-92.
25. Ristori, G., et al., *Compositional bias and mimicry toward the nonself proteome in immunodominant T cell epitopes of self and nonself antigens*. *Faseb J*, 2000. **14**(3): p. 431-8.
26. Madách K, K.K., Tulassay E, Iványi Z, Erdei A, Király A, Gál J, Bajtay Z, *Mucosal Immunity and the Intestinal Microbiome in the Development of Critical Illness*. *ISRN Immunology*, 2011. **2011**: p. Article ID 545729, 12 pages, doi:10.5402/2011/545729.
27. Sansonetti, P.J. and J.P. Di Santo, *Debugging how bacteria manipulate the immune response*. *Immunity*, 2007. **26**(2): p. 149-61.
28. Kristof, K., A. Erdei, and Z. Bajtay, *Set a thief to catch a thief: self-reactive innate lymphocytes and self tolerance*. *Autoimmun Rev*, 2008. **7**(4): p. 278-83.
29. Bedoui, S., et al., *Different bacterial pathogens, different strategies, yet the aim is the same: evasion of intestinal dendritic cell recognition*. *J Immunol*, 2010. **184**(5): p. 2237-42.

30. J. Mallegol, G.v.N., and M. Heyman, *Phenotypic and functional characterization of intestinal epithelial exosomes*. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2005. **35**(1): p. 11–16.
31. Y. van de Wal, N.C., M. Allez et al., *Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(5): p. 1420–1431.
32. Blumberg, A.D.C.a.R.S., *The intestinal epithelial cell: immunological aspects*. Springer Seminars in Immunopathology, 1997. **18**(4): p. 449–461.
33. Clark, J.A. and C.M. Coopersmith, *Intestinal crosstalk: a new paradigm for understanding the gut as the "motor" of critical illness*. *Shock*, 2007. **28**(4): p. 384-93.
34. Hooper, L.V., et al., *Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(3): p. 269-73.
35. Mack, D.R., et al., *Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of Lactobacillus strains to intestinal epithelial cells in vitro*. *Gut*, 2003. **52**(6): p. 827-33.
36. Ohland, C.L. and W.K. Macnaughton, *Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010. **298**(6): p. G807-19.
37. Johansson, M.E., et al., *The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(39): p. 15064-9.
38. Sharma, R., C. Young, and J. Neu, *Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota*. *J Biomed Biotechnol*, 2010. **2010**: p. 305879.
39. Obata, T., et al., *Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. **107**(16): p. 7419-24.

40. Augenlicht, L.H., et al., *Short-chain fatty acid metabolism, apoptosis, and Apc-initiated tumorigenesis in the mouse gastrointestinal mucosa*. *Cancer Res*, 1999. **59**(23): p. 6005-9.
41. Madsen, K., *Probiotics in critically ill patients*. *J Clin Gastroenterol*, 2008. **42 Suppl 3 Pt 1**: p. S116-8.
42. Ohata, A., M. Usami, and M. Miyoshi, *Short-chain fatty acids alter tight junction permeability in intestinal monolayer cells via lipoxygenase activation*. *Nutrition*, 2005. **21**(7-8): p. 838-47.
43. Burger-van Paassen, N., et al., *The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection*. *Biochem J*, 2009. **420**(2): p. 211-9.
44. Ren, H., et al., *Short-chain fatty acids induce intestinal epithelial heat shock protein 25 expression in rats and IEC 18 cells*. *Gastroenterology*, 2001. **121**(3): p. 631-9.
45. Willemsen, L.E., et al., *Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts*. *Gut*, 2003. **52**(10): p. 1442-7.
46. Tappenden, K.A., et al., *Short-chain fatty acids increase proglucagon and ornithine decarboxylase messenger RNAs after intestinal resection in rats*. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1996. **20**(5): p. 357-62.
47. Alverdy, J.C. and E.B. Chang, *The re-emerging role of the intestinal microflora in critical illness and inflammation: why the gut hypothesis of sepsis syndrome will not go away*. *J Leukoc Biol*, 2008. **83**(3): p. 461-6.
48. P. D. Cani, S.P., T. van de Wiele et al., *Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability*. *Gut*, 2009. **58**(8): p. 1091–1103.
49. M. Fujiya, M.W.M., Y. Nakagawa et al., *The bacillus subtilis quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter*. *Cell Host and Microbe*, 2007. **1**(4): p. 299–308.

50. Ivanov, II, et al., *Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria*. Cell, 2009. **139**(3): p. 485-98.
51. Atarashi, K., T. Tanoue, and K. Honda, *Induction of lamina propria Th17 cells by intestinal commensal bacteria*. Vaccine, 2010. **28**(50): p. 8036-8.
52. Ivanov, II, et al., *Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(4): p. 337-49.
53. Macpherson, A.J. and T. Uhr, *Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria*. Science, 2004. **303**(5664): p. 1662-5.
54. Chen, Y., et al., *Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14338-43.
55. Boes, M., et al., *A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2381-6.
56. Campos, R.A., et al., *Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant Valpha14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1785-96.
57. Kristof, K., et al., *Mathematical analysis of clinical data reveals a homunculus of bacterial mimotopes protecting from autoimmunity via oral tolerance in human*. Mol Immunol, 2009. **46**(8-9): p. 1673-8.
58. Carrico, C.J., et al., *Multiple-organ-failure syndrome*. Arch Surg, 1986. **121**(2): p. 196-208.
59. Koo, D.J., et al., *Is gut the major source of proinflammatory cytokine release during polymicrobial sepsis?* Biochim Biophys Acta, 1999. **1454**(3): p. 289-95.
60. Deitch, E.A., *Gut lymph and lymphatics: a source of factors leading to organ injury and dysfunction*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1207 Suppl 1**: p. E103-11.
61. Unsinger, J., et al., *Sepsis-induced apoptosis leads to active suppression of delayed-type hypersensitivity by CD8+ regulatory T cells through a TRAIL-dependent mechanism*. J Immunol, 2010. **184**(12): p. 6766-72.

62. M. Z. L. Y. Yiang, T.E.Z., Z. F. Yang, L. Q. Wen, and J. X. Chang, *Changes of the immunological barrier of intestinal mucosa in rats with sepsis*. World Journal of Emergency Medicine, 2010. **1**(2): p. 138–143.
63. C. Liu, A.L., Y. B. Weng, M. L. Duan, B. E. Wang, and S. W. Zhang, *Changes in intestinal mucosal immune barrier in rats with endotoxemia*. World Journal of Gastroenterology, 2009. **15**(46): p. 5843–5850.
64. Fan, J., et al., *The influence of Peyer's patch apoptosis on intestinal mucosal immunity in burned mice*. Burns, 2009. **35**(5): p. 687-94.
65. Coutinho, H.B., et al., *Intra-abdominal sepsis: an immunocytochemical study of the small intestine mucosa*. J Clin Pathol, 1997. **50**(4): p. 294-8.
66. Hurt, R.T., et al., *Immune-enhancing diet and cytokine expression during chronic sepsis: an immune-enhancing diet containing L-arginine, fish oil, and RNA fragments promotes intestinal cytokine expression during chronic sepsis in rats*. J Gastrointest Surg, 2006. **10**(1): p. 46-53.
67. Bruewer, M., et al., *Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6164-72.
68. Sappington, P.L., et al., *HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice*. Gastroenterology, 2002. **123**(3): p. 790-802.
69. Epple, H.J., et al., *Impairment of the intestinal barrier is evident in untreated but absent in suppressively treated HIV-infected patients*. Gut, 2009. **58**(2): p. 220-7.
70. Raman, K.G., et al., *The role of RAGE in the pathogenesis of intestinal barrier dysfunction after hemorrhagic shock*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **291**(4): p. G556-65.
71. Roche, J.K., et al., *Transforming growth factor beta1 ameliorates intestinal epithelial barrier disruption by Cryptosporidium parvum in vitro in the absence of mucosal T lymphocytes*. Infect Immun, 2000. **68**(10): p. 5635-44.

72. Madsen, K.L., et al., *Interleukin 10 prevents cytokine-induced disruption of T84 monolayer barrier integrity and limits chloride secretion*. Gastroenterology, 1997. **113**(1): p. 151-9.
73. Hunninghake, G.W., et al., *Insulin-like growth factor-1 levels contribute to the development of bacterial translocation in sepsis*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**(4): p. 517-25.
74. Sullivan, A., C. Edlund, and C.E. Nord, *Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora*. Lancet Infect Dis, 2001. **1**(2): p. 101-14.
75. Krueger, W.A., G. Ruckdeschel, and K. Unertl, *Influence of intravenously administered ciprofloxacin on aerobic intestinal microflora and fecal drug levels when administered simultaneously with sucralfate*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(8): p. 1725-30.
76. Diebel, L.N., et al., *Synergistic effects of Candida and Escherichia coli on gut barrier function*. J Trauma, 1999. **47**(6): p. 1045-50; discussion 1050-1.
77. Nose, K., et al., *Glutamine prevents total parenteral nutrition-associated changes to intraepithelial lymphocyte phenotype and function: a potential mechanism for the preservation of epithelial barrier function*. J Interferon Cytokine Res, 2010. **30**(2): p. 67-80.
78. Kudsk, K.A., et al., *Glutamine-enriched total parenteral nutrition maintains intestinal interleukin-4 and mucosal immunoglobulin A levels*. JPEN J Parenter Enter Nutr, 2000. **24**(5): p. 270-4; discussion 274-5.
79. Shimizu, K., et al., *Altered gut flora and environment in patients with severe SIRS*. J Trauma, 2006. **60**(1): p. 126-33.
80. Shimizu, K., et al., *Altered gut flora are associated with septic complications and death in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome*. Dig Dis Sci, 2011. **56**(4): p. 1171-7.
81. Kendall, M.M. and V. Sperandio, *Quorum sensing by enteric pathogens*. Curr Opin Gastroenterol, 2007. **23**(1): p. 10-5.

82. Zaborina, O., et al., *Dynorphin activates quorum sensing quinolone signaling in Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Pathog, 2007. **3**(3): p. e35.
83. Souza, D.G., et al., *The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 4137-46.
84. Ferraro, F.J., et al., *A comparison of survival at different degrees of hemorrhagic shock in germ-free and germ-bearing rats*. Shock, 1995. **4**(2): p. 117-20.
85. Alverdy, J.C., R.S. Laughlin, and L. Wu, *Influence of the critically ill state on host-pathogen interactions within the intestine: gut-derived sepsis redefined*. Crit Care Med, 2003. **31**(2): p. 598-607.
86. Erdei, A., *A komplementrendszer szerepe az elsődleges felismerési mechanizmusokban és az immunválasz szabályozásában*. Magyar Immunol/Hun Immunol, 2003. **2**(4): p. 33-38.
87. Suresh, M.V., et al., *Role of the property of C-reactive protein to activate the classical pathway of complement in protecting mice from pneumococcal infection*. J Immunol, 2006. **176**(7): p. 4369-74.
88. Kunes, P., et al., *Pentraxin 3 (PTX 3): an endogenous modulator of the inflammatory response*. Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 920517.
89. Alba-Dominguez, M., et al., *Complement factor I deficiency: a not so rare immune defect: characterization of new mutations and the first large gene deletion*. Orphanet J Rare Dis. 2012. **7**: p. 42.
90. Carroll, M.C., *The complement system in B cell regulation*. Mol Immunol, 2004. **41**(2-3): p. 141-6.
91. Jozsi, M., et al., *Complement receptor type 1 (CD35) mediates inhibitory signals in human B lymphocytes*. J Immunol, 2002. **168**(6): p. 2782-8.
92. Roozendaal, R. and M.C. Carroll, *Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity*. Immunol Rev, 2007. **219**: p. 157-66.
93. Ansari, M.J. and M.H. Sayegh, *Complement dances with T cells*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1551-2.

94. Jiang, K., et al., *T cell activation by soluble C1q-bearing immune complexes: implications for the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Clin Exp Immunol, 2003. **131**(1): p. 61-7.
95. Wagner, C., et al., *The complement receptor 1, CR1 (CD35), mediates inhibitory signals in human T-lymphocytes*. Mol Immunol, 2006. **43**(6): p. 643-51.
96. Bajtay, Z., et al., *Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells*. Immunol Lett, 2006. **104**(1-2): p. 46-52.
97. Sandor, N., et al., *A novel, complement-mediated way to enhance the interplay between macrophages, dendritic cells and T lymphocytes*. Mol Immunol, 2009. **47**(2-3): p. 438-48.
98. Faivre, V., et al., *Human monocytes differentiate into dendritic cells subsets that induce anergic and regulatory T cells in sepsis*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47209.
99. Behrens, E.M., et al., *Complement receptor 3 ligation of dendritic cells suppresses their stimulatory capacity*. J Immunol, 2007. **178**(10): p. 6268-79.
100. Skoberne, M., et al., *The apoptotic-cell receptor CR3, but not alphavbeta5, is a regulator of human dendritic-cell immunostimulatory function*. Blood, 2006. **108**(3): p. 947-55.
101. Levy, M.M., Fink, M.P., Marshall, J.C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S.M., Vincent, J.L., Ramsay, G., 2001 *SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference*. Critical Care Med., 2003. **31**: p. 1250–1256.
102. Metges, C.C., et al., *Incorporation of urea and ammonia nitrogen into ileal and fecal microbial proteins and plasma free amino acids in normal men and ileostomates*. Am J Clin Nutr, 1999. **70**(6): p. 1046-58.
103. Prechtel, A.T., et al., *CD83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering RNA leads to a diminished T cell stimulation*. J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5454-64.

104. Varga, G., et al., *Active MAC-1 (CD11b/CD18) on DCs inhibits full T-cell activation*. *Blood*, 2007. **109**(2): p. 661-9.
105. Jean-Louis Vincent, Y.S., Charles L. Sprung et al., *Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study*. *Crit. Care Med.*, 2006. **34**(2): p. 344-353.
106. Kerekes, K., et al., *A further link between innate and adaptive immunity: C3 deposition on antigen-presenting cells enhances the proliferation of antigen-specific T cells*. *Int Immunol*, 1998. **10**(12): p. 1923-30.
107. Papp, K., et al., *B lymphocytes and macrophages release cell membrane deposited C3-fragments on exosomes with T cell response-enhancing capacity*. *Mol Immunol*, 2008. **45**(8): p. 2343-51.
108. Kacani, L., et al., *Dendritic cells transmit human immunodeficiency virus type 1 to monocytes and monocyte-derived macrophages*. *J Virol*, 1998. **72**(8): p. 6671-7.
109. Pickl, W.F., et al., *Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14⁺ peripheral blood monocytes*. *J Immunol*, 1996. **157**(9): p. 3850-9.
110. Sandor, N., et al., *CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells*. *Immunobiology*, 2013. **218**(4): p. 652-63.
111. Abram, C.L. and C.A. Lowell, *The ins and outs of leukocyte integrin signaling*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 339-62.
112. Turner, M.W., et al., *Evaluation of C3b/C3bi opsonization and chemiluminescence with selected yeasts and bacteria using sera of different opsonic potential*. *Immunology*, 1986. **58**(1): p. 111-5.
113. Bretscher, M.S., *Circulating integrins: alpha 5 beta 1, alpha 6 beta 4 and Mac-1, but not alpha 3 beta 1, alpha 4 beta 1 or LFA-1*. *Embo J*, 1992. **11**(2): p. 405-10.
114. Birdsall, H.H., et al., *Monocytes stimulated by 110-kDa fibronectin fragments suppress proliferation of anti-CD3-activated T cells*. *J Immunol*, 2005. **175**(5): p. 3347-53.

115. Ehrchiou, D., et al., *CD11b facilitates the development of peripheral tolerance by suppressing Th17 differentiation*. J Exp Med, 2007. **204**(7): p. 1519-24.
116. Morelli, A.E., et al., *Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production*. Blood, 2003. **101**(2): p. 611-20.
117. Schmidt, J., et al., *Release of iC3b from apoptotic tumor cells induces tolerance by binding to immature dendritic cells in vitro and in vivo*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(1): p. 31-8.
118. Veldhoen, M., *Oral tolerance: passing CD11b on the way to tolerance*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(6): p. 397-8.
119. Verbovetski, I., et al., *Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7*. J Exp Med, 2002. **196**(12): p. 1553-61.
120. Hobson, M.J. and H.R. Wong, *Finding new therapies for sepsis: the need for patient stratification and the use of genetic biomarkers*. Crit Care, 2011. **15**(6): p. 1009.
121. Chen, C.W., et al., *Adult bacteremic pneumonia: bacteriology and prognostic factors*. J Formos Med Assoc, 1992. **91**(8): p. 754-9.
122. Hedlund, J., L.O. Hansson, and A. Ortqvist, *Short- and long-term prognosis for middle-aged and elderly patients hospitalized with community-acquired pneumonia: impact of nutritional and inflammatory factors*. Scand J Infect Dis, 1995. **27**(1): p. 32-7.
123. Stapleton, R.D., et al., *The association between BMI and plasma cytokine levels in patients with acute lung injury*. Chest, 2010. **138**(3): p. 568-77.
124. Thomsen, R.W., et al., *Rising incidence and persistently high mortality of hospitalized pneumonia: a 10-year population-based study in Denmark*. J Intern Med, 2006. **259**(4): p. 410-7.
125. Angus, D.C., et al., *The PIRO concept: P is for predisposition*. Crit Care, 2003. **7**(3): p. 248-51.

126. Sohn, J.H., et al., *Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells*. Nat Med, 2003. **9**(2): p. 206-12.
127. Wagner, C., et al., *The complement receptor 3, CR3 (CD11b/CD18), on T lymphocytes: activation-dependent up-regulation and regulatory function*. Eur J Immunol, 2001. **31**(4): p. 1173-80.
128. Georgakopoulos, T., S.T. Moss, and V. Kanagasundaram, *Integrin CD11c contributes to monocyte adhesion with CD11b in a differential manner and requires Src family kinase activity*. Mol Immunol, 2008. **45**(13): p. 3671-81.
129. Erdei, A., et al., *Macrophage-bound C3 fragments as adhesion molecules modulate presentation of exogenous antigens*. Immunobiology, 1992. **185**(2-4): p. 314-26.
130. Fabry, Z., A. Erdei, and J. Gergely, *A possible self-regulating mechanism mediated by C3b-acceptor-bound C3b generated by stimulated macrophages*. Scand J Immunol, 1985. **22**(5): p. 549-55.
131. Gergely, J., et al., *Functional cooperation of C3b-acceptors, Fc gamma-receptors and cell-surface proteases on macrophages*. Immunol Lett, 1985. **11**(3-4): p. 141-6.
132. Maison, C.M., C.L. Villiers, and M.G. Colomb, *Secretion, cleavage and binding of complement component C3 by the human monocytic cell line U937*. Biochem J, 1989. **261**(2): p. 407-13.

9. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

9.1 A dolgozat alapját képező közlemények

Kristóf K, Madách K, Sándor N, Iványi Z, Király A, Erdei A, Tulassay E, Gál J, Bajtay Z
Impact of molecular mimicry on the clinical course and outcome of sepsis syndrome
MOLECULAR IMMUNOLOGY 49(3): pp. 512-517. (2011)

IF: 2.897

Sándor N, Kristóf K, Parej K, Pap D, Erdei A, Bajtay Z
CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells.
IMMUNOBIOLOGY, 218(4): pp. 652-63. (2013)

IF: 3.205

Madách K*, Kristóf K*, Tulassay E, Iványi Z, Erdei A, Király A, Gál J, Bajtay Z
Mucosal Immunity and the Intestinal Microbiome in the Development of Critical Illness
ISRN IMMUNOLOGY 2011: Paper 545729. 12 p. (2011)

* Megosztott első szerzők

Kristóf K, Erdei A, Bajtay Z
Set a thief to catch a thief: Self-reactive innate lymphocytes and self tolerance
AUTOIMMUNITY REVIEWS 7(4): pp. 278-283. (2008)

IF: 5.371

ΣIF: 11.473

9.2 A dolgozathoz közvetlenül nem kapcsolódó közlemények

Iványi Zs, Valkó L, Hauser B, Kristóf K, Hargitai Z, Lorx A, Madách K, Gál J

Experiences of the Department of Anesthesiology and Intensive Therapy of Semmelweis University during the 2009 pandemic H1N1 (pH1N1) influenza outbreak

INTERVENTIONAL MEDICINE & APPLIED SCIENCE 2:(2) pp. 59-65. (2010)

Kristof K, Madach K, Czaller I, Bajtay Z, Erdei A

Mathematical analysis of clinical data reveals a homunculus of bacterial mimotopes protecting from autoimmunity via oral tolerance in human

MOLECULAR IMMUNOLOGY 46:(8-9) pp. 1673-1678. (2009)

IF: 3.202

Varga L, Szeplaki G, Laki J, Kocsis A, Kristof K, Gal P, Bajtay Z, Wieslander J, Daha MR, Garred P, Madsen HO, Fust G, Farkas H

Depressed activation of the lectin pathway of complement in hereditary angioedema.

CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY 153:(1) pp. 68-74. (2008)

IF: 2.853

Csomor E, Bajtay Zs, Sándor N, Kristóf K, Arlaud GJ, Thiel S, Erdei A

Complement protein C1q induces maturation of human dendritic cells

MOLECULAR IMMUNOLOGY 44:(13) p. 3389. (2007)

IF: 3.742

ΣIF: 9.797

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Bajtay Zsuzsának, és az Immunológiai Tanszék vezetőjének, Prof. Dr. Erdei Annának, akik szakmai támogatásuk mellett előteremtették számomra a tudományos munka feltételeit, és lehetővé tették, hogy másodéves orvostanhallgató korom óta az Immunológiai Tanszéken tanuljak. Az elsők között illeti köszönet Dr. Sándor Noémit, a Tanszék tudományos munkatársát is nélkülözhetetlen szakmai segítségéért és mindig segítőkész, kedves emberi hozzáállásáért. Ezúton köszönöm a Sanofi cégnek, hogy ösztöndíjukkal támogatták PhD munkámat.

Szeretettel gondolok Dr. Madách Krisztinára (Semmelweis Egyetem Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Klinika) a klinikai kutatásban nyújtott pótolhatatlan segítségéért és a tanulságos közös ügyeletekért. Dr. Iványi Zsoltnak, az AITK klinikaigazgató helyettesének hálás vagyok észrevételeiért, ötleteiért és a tudományos munkában is visszaköszönő alapos klinikai képzésért. Köszönettel tartozom Dr. Király Andrásnak, aki a programozásban volt segítségemre, és középiskolai matematikatanáromnak, Arnhoffer Mihálynak (†), aki érdeklődésemet látva saját indíttatásából külön foglalkozott velem, így a kötelező anyagnál jóval mélyebb tudást adott át. Mindkettejük munkája nélkülözhetetlennek bizonyult a bioinformatikai kutatásaink során.

Végezetül, de nem utolsó sorban ezúton köszönöm családom és barátaim támogatását is, akik mellettem álltak, bátorítottak, és ideális, vidám, nyugodt környezetet biztosítottak a munka során.