

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az immunrendszer egyes elemeinek változásai
splenectomizált és lép-autotransplantált egerekben**

Dr. Sipka Sándor János



**Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Általános Orvostudományi Kar
Sebészeti Intézet
Sebészeti Műtéttani Tanszék**

**Debrecen
2007.**

Az immunrendszer egyes elemeinek változásai splenectomizált és lép-autotransplantált egerekben

Dr. Sipka Sándor János

**Témavezető:
Prof. Dr. Mikó Irén
az orvostudomány kandidátusa**

**Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Általános Orvostudományi Kar
Sebészeti Intézet
Sebészeti Műtéttani Tanszék**

**Debrecen
2007.**

1. BEVEZETÉS

Már az ókori görögök is írtak le splenectomiát a malária miatt megnagyobbodott, akár 10 kg-ot is elérő lép miatt. Az első autentikus electiv lépeltávolítás Zaccarello nevéhez fűződik 1549-ből. Később a lépeltávolítás széleskörű rutinná vált, mivel a lépet funkció nélküli szervnek tartották. Ezt a szemléletet 1952-ben döntötte meg King és Schumacher, akik leírták az „overwhelming postsplenectomy infection” syndrome-ot (OPSI-syndroma), a lépeltávolítás utáni, uralhatatlan sepsis kórképét öt gyermekben, akiknél congenitalis haemolyticus anaemia miatt végeztek lépeltávolítást életük első hat hónapján belül.

Mára a sebészek szemléletében a lép teljes vagy részleges megtartásának, illetve megmentésének igénye került előtérbe. Kis sérülések, illetve a segmentumok anatómiai határaival párhuzamos sérülések estén a konzervatív terápia is eredményes lehet. Az operációk alkalmával felfedezett kisebb sérülések esetén „nyolcas” vagy „matrac” öltést használnak a lépsérülés ellátására. Emellett szövetragasztót és bioplasztot is alkalmaznak a kis-közepes sérülésnél. Nagyobb sérülésekkor lehetőség nyílik a részleges lépresectionra, illetve a lép hálóval történő körülvarrására is.

Természetesen vannak olyan esetek is, amikor a lép nem menthető meg -a splenectomiát el kell végezni- és az ilyen helyzetek megoldására jelent meg a lépszövet visszaültetésének, a lép-autotransplantationnak az igénye. Az autotransplantatio bevezetésére az a régi felismerés adta az ötletet, hogy a súlyos, roncsoló lépsérülést követően a lépszövet spontán, heterotop autotransplantálódását figyelték meg a csepleszen, illetve a hasüregben a hashártyán. Ez a „splenosis” jelensége. Az autotransplantatióra több módszerrel is kísérleteztek, de a klinikai gyakorlatba kevés került át.

Furka és munkatársai 1989-ben írták le az autotransplantatio „lépkötény” technikáját kutyán, amivel a lép kis, vékony szeleteit (körülbelül 2-3 mm vastag 2x3cm kiterjedésű szeletkéket, az eredeti léptömeg kb. 10-15 %-át) ültették vissza a cseplesz rétegei közé. Ezáltal azok biztosan a helyükön maradtak, nagyobb felületen kaptak tápanyagot, valamint így az összenövések kialakulása is elkerülhető volt. Ezt a módszert a klinikumban Debrecenben alkalmazták először, mára közel kétszáz, országosan pedig mintegy háromszáz betegnél.

Mikó és mtsai 2001-ben sikeresen adaptálták a lép-autotransplantatio módszerét egerekre is. Így lehetőség nyílt a lép-autotransplantatiót követő morfológiai és funkcionális eltérések inbred egereken történő vizsgálatára is.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánkban célul tűztük ki, hogy a Furka-féle lép-autotransplantációs kutya modellnek, a Sebészeti Műtéttani Tanszék munkatársai által beltenyészett egerekre sikeresen adaptált módszerének alkalmazásával kísérleti adatokat gyűjtsünk a lép-autotransplantatiót követő, a peripheriás vérben kimutatható haematológiai és immunológiai változásokról.

A Balb/ c egereken végzett kísérletekben lép-autotransplantatiót követően a 2., és 8. postoperatív hónapban, megfelelő ép- és áloperált kontrollokhoz, valamint splenectomizált állatokhoz viszonyítva az alábbi laboratóriumi vizsgálatokat terveztük elvégezni:

1. A peripheriás vér alakos elemeinek számban és eloszlásban történő változásainak mérése.
2. A lymphocytá alcsoportok sejtszámainak-, és arányainak követése.
3. A szérumfehérjék -immunglobulinok, complement faktorok- szintjében történő változások mérése.
4. A peripheriás vér phagocytá aktivitásának vizsgálata.

5. Fénymikroszkópos vizsgálatokkal a lép autotransplantatumok komplex, szövettani elemzése a hagyományos haematoxylin-eosin szövettani festésmóddal és immunhistológiai reakciók által sejttípus-szelektív jelölési módok segítségével ép- és áloperált kontroll állatok lépszövetéhez viszonyítva azokat.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A kísérletek körülményei

Kísérleteinket összesen 126 darab, 23-26 gramm súlyú mindkét nemből közel egyenlő arányban származó Balb/c egéren végeztük, operáló mikroszkóp segítségével. A műtéteket két hónapos egereken hajtottuk végre. Az állatokat a tervezett mérések előtt kettő, illetve nyolc hónappal operáltuk meg, azért, hogy a laboratóriumi vizsgálatokhoz a mintavételek és a mérések egy időben, párhuzamosan történhessenek. Ez azt jelenti, hogy az összehasonlító laboratóriumi vizsgálatok idején a vizsgált állatok egyik csoportja négy, a másik pedig tíz hónapos volt.

Ezen egerekből 96 állaton történtek a haematológiai, az immunológiai- és a serológiai vizsgálatok, további 30 állatból a haematoxin-eosin festéses szövettani-, és az immunhistológiai vizsgálatok.

3.2. Sebészi beavatkozások és kísérleti állatcsoportok

Az állatokat intraperitonealisan adott, 35 mg/kg dózisú pentobarbitállal (pentobarbital-Na, Phylaxia Sanofi Ltd., Magyarország) altattuk. Operáló mikroszkóp alatt 16x-os, valamint 40x-es nagyítással történtek a beavatkozások. A műtéteket tiszta, de nem steril körülmények között végeztük, antibiotikumot nem használtunk.

Az állatokat műtétechnikai szempontból négy, közel egyenlő csoportra osztottuk:

- A) *Ép kontroll csoport (K)*: sem műtéti beavatkozás, sem altatás nem történt.
- B) „Áloperált” *kontroll csoport (ÁL)*: a hasüreg megnyitása, a lép előemelése, majd visszahelyezése, illetve két rétegű hasfalzárás történt.
- C) *Splenectomizált (lépeltávolított) csoport (SE)*: a hasüreg megnyitása után a lépét előemeltük, és a léparteriák lekötése és átvágása után eltávolítottuk a lépét, majd a hasüreget két rétegben zártuk.
- D) *Autotransplantált csoport (AU)*: a hasüreg megnyitása után a lépét előemeltük, és a léparteriák lekötése után a lépét eltávolítottuk. Az eltávolított lépből szobahőmérsékletű Ringer-laktát oldatban 5 darab, körülbelül 2x2x2 mm nagyságú lépdarabkát metszettünk, ami az eredeti léptömeg körülbelül 10-15%-át jelentette. Ezeket a darabkákat a csepleszben létrehozott „fészkekbe” helyeztük. A „fészkek” fonállal történő zárása után a hasüreget két rétegben zártuk.

A négy műtéti típust és a két postoperatív vizsgálati időpontot figyelembe véve az alábbi kísérleti csoportok jöttek létre:

A műtét utáni két hónapos csoportok és jelölésük:

- 1. csoport - ép kontroll (K-2)
- 2. csoport - áloperált kontroll (ÁL-2)
- 3. csoport - splenectomia (SE-2)
- 4. csoport - autotransplantatio (AU-2)

A műtét utáni nyolc hónapos csoportok és jelölésük:

- 5. csoport - ép kontroll (K-8)
- 6. csoport - áloperált kontroll (ÁL-8)
- 7. csoport - splenectomia (SE-8)
- 8. csoport - autotransplantatio (AU-8)

3.3. Makroszkópos vizsgálatok

A makroszkópos vizsgálatokkal célunk az autotransplantált lépdarabkák megtapadásának és az őket tápláló érrendszer kialakulásának igazolása volt. A megtapadt lép-autotransplantatumokat a hozzájuk vezető erekkel operáló mikroszkóp alatt is megvizsgáltuk.

Ha a mintavételnél mégis találtunk olyan autotransplantált állatot, amiben nem tapadt meg mind az öt lépdarabka, ezen állatokból a laboratóriumi méréseket nem végeztük el.

3.4. Laboratóriumi mérő módszerek

A laboratóriumi méréseket a műtétek után két hónappal, illetve nyolc hónappal levett friss vérmintákból végeztük el. Az autotransplantált csoportban a laboratóriumi mérések elvégzésének feltétele volt az, hogy az állatok cseplésében operációs mikroszkóppal azonosítani lehessen mind az öt beültetett lépdarabkát.

A vért pentobarbital-Na altatásban elvégzett thoracotomia után intracardiális punctioval nyertük, vagy 7 U/ml heparinnal alvadásgátoltuk a haematologiai-, a luminometriás- és az áramlási sejtfloreszimetriás vizsgálatokhoz, vagy natívan hagytuk szérumszerzés céljából a nephelometriás mérésekhez.

3.4.1. Vértkép meghatározás

Haematologiai automatával (DiaTerm, Abacus) mértük a vörös- és fehérvérsejtek továbbá vérlemezkék számát és méretét. Egy méréshez 20 µl vérre volt szükség.

3.4.2. A lymphocyta alosztályok vizsgálata

Az áramlási sejtfluoriméterben a sejteket nagyságuk és granuláltságuk alapján különítettük el lymphocytákra, monocytákra és granulocytákra.

A fő lymphocyta alosztályok vizsgálata a sejtfelszínen található marker molekulák alapján, fluoreszcens festékekkel jelölt antitestek segítségével áramlási sejtfluoriméterrel (Becton-Dickinson FACSCalibur, USA) történt.

Az 50 µl vérhez 2,5 µl 2 mg/ml ellenanyagot (PE anti-mouse CD3; PE anti-mouse CD4; PE anti-mouse-CD8a; FITC anti-mouse CD 19; PE anti-mouse NK1.1 – Pharmingen, USA) adtunk, és 20 percet szobahőn, sötétben inkubáltuk ezeket. Ezután 10 perces 0,32 %-os NH₄Cl-os haemolizálás, majd a 3 Na-azidos BSA-PBS (Bovine Serum Albumin-Phosphate Buffer in Saline) mosás után a fixálás 500 µl paraformaldehidben történt.

A B -sejtek vizsgálatára anti-CD19, az NK sejtekére anti-CD56, a T -sejtekére anti-CD3 antitesteket használtunk. A T -sejteken belül két további alcsoportot különböztettünk meg, a CD4+ „helper”, továbbá a CD8+ „citotoxikus” sejteket a specifikus, jelölő ellenanyagaik segítségével.

Meghatározásaink a lymphocyták felszínén található CD-jelzésű antigének mennyiségi eloszlásainak jellemzésére irányultak. Ötezer lymphocytát leszámolva adtuk meg, hogy a sejtek hány % -a expresszálja a felszínén az adott CD-markert.

3.4.3. Serologiai vizsgálatok

A serologiai vizsgálatok lézer nephelometerrel (Behring, Németország) történtek. A szérumokhoz a DAKO (Dánia) gyártmányú anti- IgM, IgA, C3, C4, illetve Behring (Németország) gyártmányú anti-IgG reagenseket adva -10 perc inkubálás után- került sor a minták lemerése.

3.4.4. Phagocyta aktivitás mérés

A peripheriás vér neutrophil granulocytáinak működését a zymozán (Sigma, USA) stimuláció után keletkezett szabadgyökök

kemilumineszcenciájának mérése alapján luminométerrel (Berthold, Németország) jellemeztük. A kétszeresére hígított vér 250 µl-éhez 250 µl 1 mg/ml-es zymozán oldatot adtunk. A reakciót 50 µl 2×10^{-6} M-os luminol hozzáadásával erősítettük fel. Az állatokból párhuzamos méréseket végeztünk.

3.5 Szövettani módszerek

3.5.1. Haematoxylin-eosin festés

A lépdarabkákkal együtt eltávolított csepleszeket 4%-os formalinban fixáltuk, és „felszálló” alkohol soros dehidráció után paraffinba ágyaztuk. A mikrotómmal készített, 3-5 µm vastag metszeteken ezután haematoxylin-eosin festést végeztünk.

3.5.2. Immunhistológiai reakciók

Az immunhistológiai vizsgálatok egérlép-endothel és strómasejtekkel (fibroblastok, marginalis zona macrophagok, follicularis dendritikus sejtek) reagáló patkány eredetű monoklonális antitestekkel történtek a Pécsi Tudományegyetem Immunológiai és Biotechnológiai Intézetében.

Az IBL-7/22 antitest egy közös sinusoidalis és arteriolaris endothel-membrán antigénhez kapcsolódik. Az endothelialis reaktivitás mellett a periarteriolaris lymphoid hüvely és a vörös pulpa bizonyos reticularis komponensei is jelölődnek ezen ellenanyaggal, míg a folliculus régió nem. A marginalis sinus endothelsejtjei pozitívan festődnek az IBL-7/1 antitesttel és MAdCAM-1 antigén elleni ellenanyaggal. A vizsgálatokat 8 µm-es fagyasztott és acetón-fixált metszeteken végeztük.

A T -sejtek azonosítása anti-CD3 antitestekkel, a B -sejtek jelölése anti-B220 ellenanyaggal történt, a follicularis dendritikus sejteket FDC-M1 ellenanyaggal azonosítottuk. A marginalis zóna macrophagjainak két különböző alcsoportját festettük meg, az IBL-12 elnevezésű ellenanyag a MARCO-t (Macrophage Receptor with Collagenous structure) ismerte fel, az IBL-13 jelű

pedig a marginalis zona metallophil macrophagjai által expresszált szialoadhezint (CD169) jelölte meg. A primer antitesteket biotinált egér monoklonális anti-patkány (MRK-1) másodlagos ellenanyaggal (BD Pharmingen) reagáltattuk, mely kötődését HRPO-streptavidinnal detektáltuk (Sigma Aldrich, USA), H_2O_2 -amino-etil-karbazol szubsztrát-kromogén felhasználásával 0,1 M Na-acetát pufferben (pH: 5,2). Az endogén peroxidáz-aktivitás gátlására a metszeteket előzőleg 1 mg/ml fenil-hidrazinnal kezeltük.

3.6. Adatfeldolgozás

Statisztikai analízishez SigmaStat for Windows 1.0 statisztikai programot használtunk. Az adatok normál eloszlása esetén one-way ANOVA tesztet alkalmaztunk a csoportok közti összehasonlításra. Szignifikáns változás esetén Dunett teszttel hasonlítottuk össze a párok átlagait. Nem normál eloszlás esetén Kruskal-Wallis teszttel dolgoztunk. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

Az adatok feldolgozása során a szignifikáns változásokat két csoportba osztottuk. Az egyikbe azok kerültek (pl.: haemoglobin, vérlemezke adatok) amelyeket mindhárom műtött állatcsoportban észleltünk. Ezeket „operáció specifikus” eltérésnek tekintettük, és ezek további elemzése a jelen munkánkban nem szerepel.

Ezzel szemben a változások másik csoportja csak a lépműtött állatokban volt megfigyelhető. Ezek értékelését az egészséges kontrollok adataihoz viszonyítva végeztük a teljes helyreállítódást jelentő 100% -os „restitutio ad integrum” megítélésének szempontjából.

A szövettani képek esetében ugyanakkor az összehasonlításakor felhasználtuk az áloperált csoportok adatait is, mivel a sebészi beavatkozásokat tiszta, de nem steril körülmények között végeztük, és a hasmegnyitás okozhatott átmeneti, lokális, microbiális infectiókat.

4. EREDMÉNYEK

Altatási komplikációk miatt összesen 7 kísérleti állatot veszítettünk el a műtétechnikai csoportoktól függetlenül. A lép-autotransplantált kísérleti csoportban egy állatnál három-, két állatnál pedig csak négy autotransplantatum tapadt meg a beültetett 5-5 lépszeletkéből, így ezek mérési eredményei nem kerültek be a statisztikai elemzésbe. Tehát ezen állatok nincsenek benne az utánvizsgálati egérszámban. Így összesen 126 egér adatai kerültek laboratóriumi, illetve mikroszkópos értékelésre a 133 állatból.

4.1. A makroszkópos vizsgálatok eredményei

A makroszkópos vizsgálatokkal célunk az autotransplantált lépdarabkák megtapadásának és az őket tápláló érrendszer kialakulásának igazolása volt.

A mintavételeknél mind makroszkóposan, mind az operáló mikroszkóp alatt jól láthatóak voltak a megtapadt lép-autotransplantatumok, mind a hozzájuk vezető megerősödött erek. A vérvételek után mindig ellenőriztük operációs mikroszkóp alatt azt, hogy minden visszaültetett lépdarabka fellelhető legyen.

Egereken végzett kísérleteinken megfigyeltük, hogy minden megtapadt lépdarabkához vezetett legalább mikroszkóposan látható ér. Azon állatokban, amelyekben ötnél kevesebb autotransplantatumot találtunk, a regenerálódott kis lépekhez futó erek szintén jól láthatóak voltak. Az erek megléte jelezte a lépdarabkák életképességét, és az adott terület megnövekedett vérigényét. A meg nem tapadt autotransplantatumok beültetési helyét csak a fészkek zárására szolgáló, nem felszívódó fonal maradványok bizonyították.

A lépdarabkák életképességét mutatta az is, hogy a 8. postoperatív hónapban vizsgált állatokban szemmel láthatóan nagyobbak voltak a lépdarabkák, mint a 2. postoperatív hónapban vizsgáltaké. A túlélő lépdarabka térfogata és tömege legalább másfélszeres-, esetenként kétszeres volt a

8. postoperatív hónapban, mint a 2. postoperatív hónaposban, bár erre speciális méréseket nem végeztünk.

4.2. A laboratóriumi vizsgálatok eredményei

4.2.1. A vérkép vizsgálatok eredményei

4.2.1.1. Az átlagos vörösvérsejt térfogat (MCV) változásai

A 2. *postoperatív hónapban* végzett vizsgálatok során a haematologiai automatával mért átlagos vörösvérsejt térfogat „mean corpuscular volume” -MCV- változásai azt mutatták, hogy a keringésben szignifikánsan megnőtt az átlagos vörösvérsejt térfogat a splenectomizált (SE-2) csoportban az ép kontroll (K-2) csoporthoz képest (K-2: $39,08 \pm 1,327$ fl vs. SE-2: $41,00 \pm 0,6$ fl, $p= 0,028$). Az autotransplantált (AU-2) állatokban is emelkedett vörösvérsejt térfogat volt észlelhető az ép kontrollokhoz (K-2) képest, bár ez az emelkedés csak közelítette, de nem érte el a szignifikáns különbséget.

A kettő, illetve nyolc hónappal a műtét utáni időpontban összehasonlítva az ép kontroll állatok (K-2) vörösvérsejt méretét, az idősebb (K-8) állatok javára egy szignifikáns méretnövekedést találtunk (K-2: $39,08 \pm 1,327$ fl vs. K-8: $42,00 \pm 1,414$ fl, $p= 0,009$).

A 8. *postoperatív hónapban* az MCV értékei között nem volt szignifikáns eltérés, bár az autotransplantált csoportban bizonyos mértékű filtrációs aktivitásra utalhat az, hogy a nagy átmérőjű vörösvérsejtek aránya kisebb bennük, mint a splenectomizált állatokban, s arányuk közelíti az ép- és áloperált kontroll csoportokét a 8. *postoperatív hónapban*.

4.2.1.2. A perifériás vér össz-lymphocyta számának változásai

A 2. *postoperatív hónapban* nem volt különbség az egyes csoportok között a perifériás vér össz- lymphocyta számát tekintve, bár tendenciáját nézve a splenectomizált (SE-2) csoportban enyhe emelkedés, az autotransplantált (AU-2) csoportban pedig enyhe csökkenés volt megfigyelhető.

A 8. *postoperatív hónapra* viszont mind a splenectomizált (SE-8), mind az autotransplantált (AU-8) csoportban lymphopenia volt kimutatható az azonos korú kontrollhoz (K-8) képest, és ez a lymphocytaszám csökkenés a splenectomizált (SE-8) csoportban szignifikánsnak is bizonyult (K-8: $1,75 \pm 1,222$ G/l vs. SE-8: $0,78 \pm 0,35$ G/l, $p=0,044$).

Az autotransplantált (AU-8) csoportban a lymphopenia mértéke kisebb volt.

4.2.2. A lymphocyta alosztályok vizsgálatának eredményei

4.2.2.1. A peripheriás vér CD3+ T -lymphocyta számának változásai

A 2. *postoperatív hónapban* nem volt különbség az egyes csoportok között a CD3+ T- lymphocyták számát tekintve.

A 8. *postoperatív hónapban* viszont mind a splenectomizált (SE-8), mind az autotransplantált (AU-8) csoportban szignifikánsan csökkent a CD3+ T -lymphocyták száma az azonos korú kontrollhoz képest, bár az autotransplantáltaknak kb. 20% százalékkal magasabb volt a CD3+ T -lymphocyta száma, mint a nyolchónapos splenectomizáltaknak. Ez a tendencia hasonló ahhoz, mint amit az össz-lymphocyta számra kaptunk (K-8: $1,05 \pm 0,16$ G/l vs. SE-8: $0,49 \pm 0,10$ G/l, $p<0,001$; vs. AU-8: $0,64 \pm 0,06$ G/l, $p<0,001$).

4.2.2.2. A peripheriás vér CD19+ B -lymphocyta számának változásai

A 2. *postoperatív hónapban* a splenectomizált állatokban (SE-2) szignifikánsan emelkedett, az autotransplantáltakban (AU-2) viszont lecsökkent

a CD19+ B -sejt szám található a hasonló korú ép kontrollokhoz (K-2) képest (K-2: $0,44 \pm 0,05$ G/l vs. SE-2: $0,72 \pm 0,15$ G/l, $p < 0,001$; vs. AU-2: $0,25 \pm 0,06$ G/l, $p < 0,001$).

A 8. *postoperatív hónapban* viszont csak a splenectomizált csoportban (SE-8) csökkent szignifikánsan a CD19+ B -lymphocyták száma az azonos korú ép kontrollhoz (K-8) viszonyítva. Az autotransplantáltaknak itt mintegy 20% százalékkal magasabb volt a CD19+ B -lymphocyták száma, mint a splenectomizált állatoknál, viszont így itt már az ép kontrollhoz képest kevésbé csökkent értéket kaptunk. Ez a tendencia is hasonló ahhoz, mint amit az össz-lymphocytá-, valamint a CD3+ T -sejtszámra kaptunk

4.2.3. A serologiai vizsgálatok eredményei

4.2.3.1. A szérum immunglobulin M szintjének változásai

Az OPSI-syndroma szempontjából kiemelt fontosságú szérum IgM szintjeit vizsgálva azt találtuk, hogy a 2. *postoperatív hónapban* mind a splenectomizált (SE-2), mind az autotransplantált (AU-2) állatokban lecsökken a mennyisége az ép kontrollhoz (K-2) képest.

A 8. *postoperatív hónapban* a splenectomizált állatokban (SE-8) ez a csökkenés még tovább fokozódik.

Ezzel szemben az autotransplantált egerekben (AU-8) a korábbi, a 2. *postoperatív hónapban* mért értéken maradt az IgM szintje, ami azonban már szignifikánsan magasabb, mint a splenectomizált állatokban (SE-8) mérhető ellenanyagszint (SE-8: $45 \pm 13,3$ mg/l vs. AU-8: $63 \pm 9,8$ mg/l, $p < 0,05$).

Az IgG, IgA, C3 és C4 szérumszintjeinek változásaiban nem találtunk szignifikáns különbséget a vizsgált állatcsoportokban.

4.2.4. A phagocytá aktivitás mérés eredményei

4.2.4.1. A peripheriás vér granulocytá számának változásai

Vizsgálatainkban a 2. *postoperatív hónapban* a splenectomizált állatoknál (SE-2) a neutrophil granulocyták számát szignifikánsan magasabbnak találtuk, az ép kontrollhoz viszonyítva (K-2: $0,633 \pm 0,35$ G/l vs. SE-2: $0,831 \pm 0,41$ G/l; $p=0,04$). Az autotransplantáltak (AU-2) értékei az ép kontroll csoporthoz megközelítőleg hasonló eredményt mutattak.

További szignifikáns különbség volt a két különböző korú ép kontroll csoport között is (K-2: $0,633 \pm 0,35$ G/l vs. K-8: $1,337 \pm 0,35$ G/l; $p=0,0136$).

A 8. *postoperatív hónapban* a splenectomizált állatoknál (SE-8) tovább emelkedett a neutrophil granulocyták száma az azonos korú ép kontrollokhoz képest (K-8: $1,337 \pm 0,35$ G/l vs. SE-8: $2,44 \pm 0,5$ G/l; $p=0,016$). Ez az emelkedés kisebb mértékű volt az autotransplantált csoportban (AU-8).

4.2.4.2. A peripheriás vér phagocytáinak aktivitás változásai

A zymozánnal aktivált, luminollal erősített neutrophil szabadgyökképző, kemilumineszcens aktivitás vizsgálata során a magas neutrophil granulocytaszám miatt, a nyolc hónapos splenectomizált állatokban vártuk a legnagyobb értékeket.

Mégis meglepetésünkre ezt az egyébként valóban erős aktivitást is túlszárnyalta a nyolc hónapos autotransplantáltakban talált phagocytá működés (szabadgyök-képzés, kemiluminescencia). Ez a megfigyelés a kisebb neutrophil számú rendszernek a jobb és hatékonyabb phagocytá működését mutatta.

4.3. A mikroszkópos vizsgálatok eredményei

4.3.1. Az autotransplantatumok kimutatása haematoxylin-eosin festéssel

Mind a 2. mind a 8. *postoperatív hónapban* vizsgált autotransplantatumokban a lépszövetet kötőszöveti kapszula határolta, melyből

trabeculák hatoltak be a lépszövet mélyére, ahol ezek egy kötőszövetes hálót, vázat alkottak. A trabeculákkal együtt haladtak be és le a segmentális arteriák és venák. A kötőszövetes sövények között intact vörös pulpa és fehér pulpa volt látható. A lépdarabkák körül az egér csepleszében normálisan is jelen lévő szétszórt pancreas-szövet szigetek is megtalálhatóak voltak

A beültetett lépdarabkákban a normális lépszövet elemei, és főbb struktúrái megtalálhatók. Ez a szövettani szerkezetű lép hosszú távon is életképes volt, ezt bizonyítják a beültetés utáni 8. postoperatív hónapban végzett szövettani vizsgálatok eredményei is.

4.3.2. Az immunhistológiai vizsgálatok eredményei

4.3.2.1. Érrendszeri változások az autotransplantált lépdarabkákban

A csepleszbe visszaültetett lépdarabkák keringése jelentősen módosul az eredeti tápláló arteria elvesztésével. A kívülről, újólag benövő erek veszik át a táplálást. Arra a kérdésre, hogy a lép immunológiai működésében kulcsfontosságú periarteriális lymphoid hüvelynek (PALS – Peri Arteriolar Lymphoid Sheath) és a gerincét jelentő centrális artériának a hisztológiai képében kimutatható-e változás, eddig az irodalomban nem találtunk adatokat.

Az IBL-7/22-es antitesttel, -egy pán-endothel és retikuláris fibroblast elleni markerrel- festve a metszeteket az autotransplantált állatokban a 2. és 8. postoperatív hónapban sem látszik a centrális arteriolának megfelelő képlet az áloperált kontroll állatokból származó léphez viszonyítva. Emellett kevésbé kifejezett a vörös pulpa rajzolata is.

Az emberi ép lépben a *perifollicularis* zónán keresztül kapcsolódnak össze az arteria terminálisok a venulákkal egy „nyitott” keringésen keresztül. Egerekben ez, illetve az embernél egy ezzel ekvivalens terület játszik fontos szerepet a B-sejtek „homing”-jában. A *marginalis sinus* endotheljét jelölő MAdCAM-1 antitesttel pozitívan jelölődő sejteket vizsgálva azt találtuk, hogy az áloperált kontroll (ÁL-8) egerekben a *marginalis sinus* gyengébben jelölődik

az autotransplantáltakhoz (AU-8) képest. Ezzel szemben az autotransplantált egerekben a vörös pulpában a mesenterialis nyirokcsomó HEV-jeihez (High Endothelial Venules) mérhető intenzitású festődés figyelhető meg, és a MAdCAM-1 expressio csak részleges a fehér pulpa állomány nagyobbik része mentén. Ezek a változások azt mutatják, hogy az autotransplantált állatok túlélő lépszövetében alakulnak ki olyan elváltozások, melyek eltérnek a normális lépszövetétől, és ezek befolyásolhatják a B-sejtek „homing” folyamatait és ellenanyag képző képességüket.

4.3.2.3. A T- és B -sejtek és a follicularis dendritikus sejtek vizsgálatának eredményei

A T- és B-sejteket vizsgálva az autotransplantált állatokban egy enyhe B-sejt dominanciát láttunk az áloperáltakhoz képest nyolc hónappal a beavatkozások után. Ez a B-sejtes terület körülbelül 30%-os növekedését, és a T-sejtes terület körülbelül 50%-os csökkenését jelentette. A B -sejt érésben és aktivációban részt vevő follicularis dendritikus sejtek (FDC) elhelyezkedése egybevágtott a B -sejt zónával.

4.3.2.4. A macrophagok vizsgálata az autotransplantált lépdarabkákban

A marginalis zóna macrophag alcsoportjainak eloszlása hasonló a *8. postoperatív hónapban* az autotransplantatumokban, mint a hasonló korú, áloperált egerek lépében.

A két vizsgált alcsoport közül az egyik az IBL-12-Anti-MARCO (MAcrophage Receptor with COllagenous structure) antitesttel festődő macrophag populáció, míg az IBL-13 ellenanyaggal detektált szialoadhezín (Sn-CD169) hordozó metallofil makrofág alcsoport volt. A MZ területében mindkét alcsoport megtartott megoszlást mutatott. Emellett a Sn-pozitív alcsoport esetében jelentékeny mértékű folliculáris reaktivitás is szembetűnő volt, mely T-dependens antigénnel való immunizálást követő csíracentrum-képződés során jelentkezik, feltehetőleg a hasüregi beavatkozás következtében.

5. MEGBESZÉLÉS

Értekezésemben a beltenyésztett egérmodellen kapott eredményeket kívántam összegezni. Ennek a kísérleti modellnek az az előnye, hogy a perifériás vér immunológiai és haematológiai paramétereinek vizsgálatakor ezekben az állatokban kisebb egyedi szórási eredményeket kapunk, mint a nem beltenyésztett állatokon. Emellett vizsgálataink első, új eredményének is tartható az, hogy a lép-autotransplantatumok életképesség még a műtét után nyolc hónappal is megmarad, sőt erre az időre a beültetett lépszövet tömege a korábbi értékhez képest megnő.

A szövettani vizsgálatoknak a jelentős kibővülését jelentette, hogy immunhistológiai vizsgálatokkal -egy kollaborációs munka keretében- speciális monoklonális ellenanyag birtokában adatokat tudtunk szolgáltatni a beültetett lép finomabb szerkezetéről is. Jelentősnek tartható az az új megfigyelés, hogy a csepleszbe ültetett lépdarabkákbán -bár azok életképesek, állományuk tömege növekszik- nincs centrális arteria. Ez arra utal, hogy a csepleszbe ültetés hatására megváltozik a beültetett lépdarabkákbán a vérkeringés iránya és jellege. Valószínűleg ennek a következménye az, hogy az eredeti lépszövethez képest megváltozik a folliculusok, a fehér és vöröspulpa, illetve a macrophagok elrendeződése. Ezekből kiemelhető, hogy a T -sejtek száma mind a lépben, mind a peripherián jelentősen lecsökken, míg a B -sejtek esetében a peripherián tapasztalható B -sejt csökkenéshez képest a folliculusokban B -sejtszám növekedés történik a kontrollhoz képest.

A megváltozott membrán flexibilitású vörösvérsejtek felnőttkorban fiziológiásan a lépben filtrálódnak ki a keringésből. A lép eltávolítása után ez a funkció is elvész, így a keringésben megnő a nagyobb méretű vörösvérsejtek száma és aránya. A perifériás vér haematológiai paramétereinek vizsgálatában

reprodukálni tudtuk azt a korábbi, lép eltávolítás utáni változást, hogy megnő a nagyobb átmérőjű, és a lép szűrő funkciójának elmaradása miatt a keringésben megmaradt vörösvérsejtek aránya. Ez a jelenség a műtéteket követő 2. és 8. postoperatív hónapban is megfigyelhető volt az autotransplantált csoportban, de csak a 2. postoperatív hónapban volt szignifikáns. Ehhez azt a kiegészítést kell tenni, hogy az autotransplantatit követő 8. hónapban a 2. hónaposokhoz képest általában megnőtt a vörösvérsejt átmérő és térfogat. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogyha bár nem szignifikáns mértékben is, de az autotransplantált állatcsoportokban a műtétet követően mind két mind nyolc hónap után a keringésben levő „nagy átmérőjű” vörösvérsejtek száma kisebb volt, mint a splenectomizált csoportokban. Ez a beültetett lépdarabkák bizonyos szűrő funkciójának meglétére utal.

A lymphopenia ténye a peripherián mind a splenectomizált, mind az autotransplantált állatcsoportokban érvényes a műtéteket követő 8. hónapban.

Ez a tendencia teljesen érvényes a CD3+ T -sejtekre. A CD19+ B -sejtek esetében viszont a 2. postoperatív hónap után a splenectomizált csoportban lényegesen magasabb a peripheriás sejtszám, mint az ép kontrollban vagy az autotransplantált csoportban. Az autotransplantáltakban mérhető csökkenést azzal magyarázzuk, hogy ebben az időszakban a lépfolliculusok begyűjtik a peripheriáról a csontvelő felől érkező B -sejtek egy részét. Meg kell említeni azonban, hogy a 8. postoperatív hónapra az autotransplantált állatok vérében -ha nem is szignifikáns módon- de emelkedettebb B -sejt számértéket találtunk, mint a splenectomizált állatokban. Ez a tendencia érvényes volt a T - sejtekre-, és a teljes lymphocyta számra egyaránt. Ez azt mutatja, hogy a beültetett lépdarabkák nyolc hónap után már a T - és B -sejt képzés szempontjából is a normálishoz jobban közelítő állapotot hoztak létre, mint, ami a lépeltávolítást követően kialakult.

Az OPSI-syndroma szempontjából kiemelt fontosságú a tokos baktériumokat opsonizáló szérum IgM szintje. Vizsgálataink egyik legnagyobb

értékének azt tartjuk, hogy az autotransplantált állatcsoport szérumában a splenectomizált állatok értékeihez képest szignifikánsan magasabb szérum IgM értékeket találtunk. Ez arra utal, hogy ezek az állatok egy bakteriális fertőzéssel szemben valószínűleg hatékonyabb védő ellenanyagképzést mutathatnak, mint léphiányos társaik, ami a jobb neutrophil phagocytá működésben is megnyilvánul.

A természetes immunválasz szempontjából ugyanis nagyon fontosak a védekezés első hullámát alkotó falósejtek, amelyek nagy részét (kb. 90% -át) a neutrophil granulocyták alkotják a peripheriás vérben. Megfelelő működésük esetén a fertőző ágensek vagy gyorsan eliminálódnak, vagy terjedésüket korlátozzák a megfelelő adaptív immunválasz kialakulásáig. A neutrophil granulocyták lépeltávolítás utáni -jól ismert- jelentős számemelkedését mi is megfigyeltük. A transplantált állatokban ez a szám kisebb volt.

Meglepetést jelentett ugyanakkor, hogy a zymozánnal aktivált és luminollal felerősített kemiluminescencia az autotransplantált csoportban magasabb volt, mint a splenectomizált állatokban. Ezt azzal magyarázzuk, hogy az autotransplantált csoportban meglévő magasabb IgM szintek a zymozán részecskék jobb opszonizációját eredményezhették, miáltal azok internalizálódása, phagocytalódása jobb hatásfokú lett, mint a splenectomizált állatok vérében. Meg kell jegyezni, hogy ebben a jelenségben kb. 90%-át kitevő neutrophil granulocyták aktivitása nyilvánul meg. Megfigyeléseink a kisebb neutrophil számú, autotransplantált rendszernek a fokozott phagocytá működését mutatják.

Itt említjük meg, hogy az IgM szinteken kívül még mértük az IgG, IgA, C3 és C4 szérumszinteket is az állatok szérumaiban, de ezekben semmiféle szignifikáns eltérést nem találtunk, ezért ezeket az eredményeket külön dokumentáltuk.

6. ÚJ EREDMÉNYEK

A beltenyésztett egereken kapott eredményeinket ismeretében munkánk záró következtetésit a következőkben lehet összefoglalni.

1. A lépmegettartó, Furka féle lép-autotransplantációs módszerrel a nagycsepleysz rétegei közé beültetett lép-autotransplantatumok működőképessége megmarad, amit nemcsak haematoxylin-eosinnal festett szövettani-, hanem immunhistológiai vizsgálatokkal is igazolni lehet.
2. A visszaültetett lép-autotransplantatumok megváltozott keringésének -az arteria centrális eltűnésének- és szöveti struktúrájának leírása, továbbá a lymphoid struktúrának az eredeti elrendezéshez hasonló regenerációjának bemutatása.
3. Az autotransplantatio kedvező hatásának mértéke azonban a beültetett és a beültethető ép lépszövet mennyiségétől függ, ennek következtében limitált. Ez az esetünkben 10-15 % -os hatékonyságot jelentett csupán, ami távolról sem teljes, ugyanakkor nem elhanyagolható hatású restitutio.
4. Az autotransplantált lépdarabkák beültetett tömegük arányában javítják a peripheriás vérben a vörösvérsejtek kiszűrését -tehát képesek bizonyos filtrációs funkció betöltésére. Normalizálják továbbá a T- és B - lymphocyták számát és eloszlását, javítják az IgM termelést és a neutrophil granulocyták phagocytáló képességét is beltenyésztett egerekben.

7.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Sipka S. jr.**, Bráth E., F. Tóth F., Fábián Á., Krizsán Cs., Baráth S., Sipka S., Németh N., Bálint A., Furka I., Mikó I. (2006) Distribution of peripheral blood cells in mice after splenectomy or autotransplantation.
Microsurgery 26:43-49. **IF:0,812**
2. **Sipka S. jr.**, Bráth E., F. Tóth F., Aleksza M., Kulcsár A., Fábián Á., Baráth S., Balogh P., Sipka S., Furka I., Mikó I. (2006) Cellular and serological changes in the peripheral blood of splenectomized and spleen autotransplanted mice.
Transp. Immun.16:99-104. **IF: 1,98**
3. **Sipka S. jr.**, Bráth E., F. Tóth F., Fábián Á., Furka I., Mikó I. (2005) Lép autotranszplantáció és lépeltávolítás haematologiai és immunologiai hatásainak összehasonlító vizsgálata egerekben.
Magy. Seb. 58:84-88.

7.2. Az értekezés témájával összefüggő egyéb közlemények

4. Mikó I., Bráth E., Németh N., F. Tóth F., **Sipka S. jr.**, Kovács J., Sipka S., Facht J., Furka A., Furka I., Zhong R. (2003) Hematological, hemorrheological, immunological and morphological studies of spleen autotransplantation in mice: preliminary results.
Microsurgery 23:483-488. **IF:0,812**
5. Mikó I., Németh N., **Sipka S. jr.**, Bráth E., Pető K., Gulyás A., Furka I., Zhong R. (2006) Hemorrheological follow-up after splenectomy and spleen autotransplantation in mice.
Microsurgery 26:38-42. **IF:0,812**

7.3. Egyéb közlemények

6. Kerekes L., **Sipka S. jr.**, Dezső B., Furka A., Pető K., Bráth E., Mikó I., Furka I. (2002) Glükokortikoszteroid intravenás és intraductalis alkalmazásának hatásai kutyán kísérletesen előidézett akut pancreatitisben.
Magy. Seb. 55:225-228.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Megköszönöm témavezetőm, *Dr. Mikó Irén* professzornő sokoldalú szakmai és emberi irányítását és támogatását, továbbá *Dr. Furka István* professzor úr segítségét, hogy részt vehettem az általuk elindított, nemzetközi hírűvé vált kutatócsoport munkájában. Megköszönöm, hogy munkámhoz és fejlődésemhez minden szakmai és emberi segítséget megadtak számomra.

Köszönettel tartozom a kísérleti állatok operálásához nyújtott segítségért *Dr. Bráth Endre* tanársegéd úrnak, *Dr. Németh Norbert* adjunktus úrnak, *Dr. F. Tóth Ferenc* tanársegéd úrnak és *Dr. Fábián Ákosnak*.

Hálával tartozom a *Sebészeti Műtéttani Tanszék* valamennyi munkatársának a sok segítségért. *Somlyai Jánosné Balogh Erikának* külön is köszönetet mondok a műtétekhez nyújtott asszisztensi munkáért.

A III. Belgyógyászati Klinika Regionális Immunológiai Laboratóriumából megköszönöm a sokoldalú és hathatós segítséget *Dr. Aleksza Magdolnának*, *Dr. Baráth Sándornak*, *Karcza Anikónak*, *Kulcsár Andreának*, *Krizsán Csillának*, *Szárazné Széles Mariannak*, *Kovács Ildikónak* és *Szöllősi Lászlónénak*.

A Pécsi Tudományegyetem Immunológiai és Biotechnológiai Intézetében *Dr. Balogh Péter* tanár úr támogatása nélkül nem készülhetett volna el a munkám immunhistologiai része, amit ezúttal is megköszönök.

Végül, de nem utolsó sorban, hálásan köszönöm meg *Családom* támogató szeretetét.