

ZÁRÓBESZÁMOLÓ

HYPOSPLENIÁS ÉS ASPLENIÁS ÁLLAPOTOK JELZÉSÉRE SZOLGÁLÓ KOMPLEX LABORATÓRIUMI ÉS MORPHOLÓGIAI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEINEK ÖSSZEHASONLÍTÓ ELEMZÉSE EGEREKKBEN A POSTSPLENECTOMIÁS SEPSIS IDŐBENI FELISMERÉSE CÉLJÁBÓL

OTKA T-049331

Mikó Irén, Furka István, Bráth Endre, Németh Norbert, Sipka Sándor ifj., Bálint Anita, Varga József¹, Pap Szekeres József², Benkő Ilona³, Pető Katalin, Ács Géza⁴, Fekete Károly⁴, Sajtos Erika, Furka Andrea⁵, V. Oláh Anna⁶

Debreceni Egyetem OEC ÁOK Sebészeti Intézet, Sebészeti Műtéttani Tanszék, ¹DE OEC ÁOK Nukleáris Medicina Tanszék, ²Bács-Kiskun Megyei Kórház Sebészeti Osztály, ³DE OEC ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, ⁴DE OEC Traumatológiai és Kézsebészeti Tanszék, ⁵DE OEC ÁOK Augustza Sebészeti Központ, Regionális Onkológiai Központ, ⁶DE OEC ÁOK Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézet

1. Műtéti csoportok, műtéti módszerek

A 150 *Balb/c inbred* egéren négy kísérleti csoportban a következő beavatkozásokat végeztük el: 1./ Lép autotransplantatio (AU). Splenectomia, eltávolított lép 10%-a beültetve a nagycepleszbe, 2./ Splenectomia (SE), 3./ Áloperált kontrol, a has megnyitása a lép előemelése, majd hasüregbe visszahelyezése és hasfal zárás (ÁL). 4./ Ép kontrol (ÉP).

24 *beltenyésztett beagle* kutyán hat csoportban (n=4-4) a következő műtéti csoportokat alakítottuk ki: 1./ Lép autotransplantatio 5 lép szeletkével (AU-5): az eltávolított lép 10%-a beültetve a nagycepleszbe; 2./ Lép autotransplantatio 10 lép szeletkével (AU-10), az eltávolított lép 30%-a beültetve a nagycepleszbe; 3./ 1/3-os lépresectio (R-1/3): a lép 1/3-ának eltávolítása; 4./ 2/3-os resectio (R-2/3): a lép 2/3-ának eltávolítása; 5./ splenectomia (SE); 6./ áloperáció (AL): laparotomia, majd 3 rétegű hasfalzárás.

2. Összehasonlító vizsgálatok

A műtéteket követően a következő összehasonlító vizsgálatokat végeztük: A filtrációs funkciójának követésére haematológiai, haemostasis, haemorheológiai paraméterek vizsgálata történt. A lép immunológiai funkcióinak változását luminometria, áramlási sejtfuorimetria és laser nephelometria segítségével mértük. A lép autotransplantatumok regenerációjának időbeli változásának követésére az összejt vizsgálatokat funkcionális colony assay alkalmazásával végeztük. Ezen túlmenően morfológiai vizsgálatokat terveztünk.

2.1. Az autotransplantált lép mennyiségének meghatározása

Kísérleti *egereink* esetében a lép eltávolítása után 5 darabban az eredeti lép 5-8 %-át a nagycepleszbe ültettük be. A műtétek után 8 hónappal végeztük vizsgálatainkat. Az autotranszplantált lépdarabok megtapadtak, kinézetük az egészséges lépnek megfelelő volt, súlyuk a normál lép 10-12%-a. Az eredeti vér- és nyirokkeringésből kiemelt lépdarabok az egészséges kontroll léphez hasonlóan sejtűsak voltak. Valamennyi lépdarab kimosott és meghatározott sejtszáma alapján az összesített teljes lépsejt mennyiség, a cellularitás a kontroll érték 45 %-a volt.

Beltenyésztett *beagle* kutyákon meghatároztuk a beültetésre került lép mennyiségét. 1./ Lép autotransplantatio 5 lép szeletkével (AU-5) csoportban az eltávolított lép 23,5%-a került beültetésre a nagycepleszbe; 2./ Lép autotransplantatio 10 lép szeletkével (AU-10), az eltávolított lép 29,2%-a lett beültetve; 3./ 1/3-os lépresectio (R-1/3) során lép 1/3-ának eltávolítása történt, a hasüregben maradt lép az eredeti lép 67,778%-a; 4./ 2/3-os resectio (R-2/3) során a lép 2/3-ának eltávolítása történt, a hasüregben az eredeti lép 22,8 %-a maradt.

2.2. Befertőződéses vizsgálatok kombinált vakcináció alkalmazásával beagle kutyákon

A 2005-2006-os évi beszámolóban megindokoltuk, hogy a *S. pneumoniae* és a *C. albicans* befertőzést nem tudtuk kivitelezni az Állatvédelmi Törvény és az ISO 9001: 2000 előírásainak megfelelő állatházi körülmények hiányában – forráshiány miatt nem tudtuk biztonságosan elkülöníteni a vizsgálandó állatokat, helyette más módszert alkalmaztunk.

2.2.1. Befertőződés módszere

Beagle kutyákon az eredeti célkitűzésnek megfelelően -azaz a különböző mikrobiológiai agensekkel történő befertőzés után vizsgálva az ellenanyag termelésben feltételezhetően létrejövő különbséget splenectomizált és lépautotranszplantált csoportok között- a szervezetbe kialakuló immunválasz vizsgálatára alkalmas kombinált vakcináció alkalmazásával tettünk eleget. A következő vakcinákat oltottuk a kísérleti állatokba: *Vanguard plus 5 vakcina* A.U.V., mely liofilizált komponens (VanguardDA2Pi):élő, attenuált kutya szopornyica vírus (Snyder Hill törzs) min. $10^{3,0}$ CCID₅₀, élő, attenuált kutya adenovírus (Manhattan törzs) min. $10^{3,2}$ CCID₅₀, élő, attenuált kutya parainfluenza vírus (NL-CPI-5 törzs) min. $10^{6,0}$ CCID₅₀. Folyékony komponens (Vanguard CPV): élő, attenuált kutya parvovírus (NL-35-D törzs) min. $10^{7,0}$ CCID₅₀. (Pfizer Animal Health S.A. Lincoln, USA). *Rabigen Mono vakcina* A.U.V. szövettenyészetben elszaporított, béta-propiolaktonnal inaktivált veszettség vírus (Virbac S. A., Carros, Franciaország).

2.2.2. Kombinált vakcináció hatásának vizsgálata leukocita antisedimentációs ráta (LAR) változás vizsgálatával

A keringő aktivált leukocyták eloszlása karakterisztikus lehet gyulladásosepticus kórképekben, amelyre jellemző lehet a *leukocita antisedimentációs ráta (LAR) változása*. A LAR jelző értéke klinikai vonatkozásban bizonyított, azonban alkalmazhatósága hypospleniás-aspleniás állapotokban illetve állatkísérletekben eddig kevésbé volt ismert, így vizsgáltuk a LAR alkalmazhatóságát a különböző lépmegettartó sebészi eljárások kapcsán.

10 egészséges beagle kutya vérmintájából meghatározott leukocita számot és LAR értéket tekintettük normál kontrollnak. Egy óra szedimentáció után a véroszlop felső (F) és alsó (A) felében mért leukocita számból határoztuk meg a LAR-t az alábbi képlet alkalmazásával Bogár módszere szerint: $LAR=100x(F-A)/(F+A)$.

A különböző műtéti csoportokban a 12. postoperatív hónapban alkalmaztuk a vakcina kombinációt immunválasz provokálására. A vérvételek a vakcináció előtt és egy héttel utána történtek a LAR meghatározására komplex laboratóriumi vizsgálati panel részeként. A normál kontrol csoportban a LAR 3,11 volt 12,04 G/l leukocita szám mellett. A műtéti csoportokban a LAR 2,4 és 7,3 közötti értékeket mutatott a vakcináció előtt, majd utána egy héttel valamennyi csoportban megemelkedett az alapértékhez képest 72-135%-kal. Bár a splenectomizált csoportban mutatkozott mind a legnagyobb változás (135%), mind a legmagasabb érték (15,56), a leukocita szám mindössze 12%-kal növekedett. A lép autoransplantált csoportokban a növekedés kisebb volt, mint a splenectomizált csoportban, de nagyobb, mint a csupán enyhe LAR emelkedést mutató lép-resectió csoportokban. Véleményünk szerint a módszer alkalmazható állatkísérletekben és kiegészítő paraméter lehet a hypospleniás-aspleniás állapotok haemorheológiai vizsgálata során is.

2.2.3. Immunglobulin szint meghatározások

A pályázat célkitűzésein túlmutatón sikerült kiegészíteni új, a beltenyészett kutyákra a piacon az elmúlt évben megjelent vizsgálati módszerekkel az IgG, IgM szintek mérését (Forgalmazó: Frank Diagnosztikai Kft.). a vakcináció után 1 héttel, majd 1., 2. és 3. postoperatív hónapban. Az adatfeldolgozás folyamatban van, az előzetes adatok közül kiemelnénk a fehérvérsejtszám változását. A splenectomizált és a 2/3-os lépeltávolított állatok esetében a vakcinációt követően 1 hónappal fehérvérsejtszám emelkedést nem tapasztaltunk, az 1/3-os lépeltávolítottaknál, valamint az AU-5 és AU-10 lép autotranszplantált csoportoknál eredményeink igazolják az autotranszplantatio hasznosságát, mivel az álműtött kontrollokhoz hasonló mértékű fehérvérsejtszám emelkedést tapasztaltunk. (AU-10-es csoportban, ahol a lép autotranszplantatio során a lép összmenyiségének legalább 33%-a került visszaültetésre, az alap 14,84 G/l alapérték átlaga az 1 hónapos adatok alapján 22,02 G/l-re változott.)

2.3. Haemorheológiai változások vizsgálata

2.3.1. A vörösvérsejt deformabilitás vizsgálata filtrometriás módszerrel Balb/c egerekben

Meghatároztuk a kezdeti relatív filtrációs sebesség (IRFR), valamint a relatív sejt tranzit idő (RCTT) paramétereit. Azt találtuk, hogy az IRFR értékek szignifikáns különbséget mutatnak a splenectomizált és az autotranszplantált csoportok között a műtétet követő 6. és 8. hónapban. A változások még kifejezettebbek az RCTT paramétereit vizsgálva. A splenectomizált csoport RCTT értékei minden vizsgált időpontban szignifikánsan alacsonyabb volt az áloperált és az autotranszplantált csoporthoz viszonyítva is. Ezen eredményeinkre a Magyar Haemorheológiai Társaság által készített „Útmutató a haemorheológiai mérésekhez” hivatkozik.

A *fibrinogén szintben* a postoperatív 6. héten és 8. hónapban történő vizsgálatokban szignifikáns csökkenést mértünk a splenectomizált csoportban. Eredményeink alátámasztják, hogy a lép autotranszplantatio pozitívan befolyásolja a vörösvérsejtek deformálhatóságát.

2.3.2. A vörösvérsejt deformabilitás összehasonlító vizsgálata filtrometriás- és ektacytometriás módszerrel beagle kutyákban

Korábbi vizsgálataink felvetették, hogy a vörösvérsejt deformabilitás vizsgálata informatív és jelző értékű lehet az aspleniás és hypospleniás állapotok jelzésére. Ezért a vörösvérsejtek deformabilitás jellemzésére szolgáló két különböző mérési technikát összehasonlítva folytattuk vizsgálatainkat.

A meghatározásokhoz a vérvételeket a műtétek előtt és azt követően végeztük egy évig havonta, majd kéthavonta a 2. postoperatív év végéig. A vörösvérsejt deformabilitás jellemzésére a *Carat FT-1 filtrométerrel mért relatív sejt tranzit időt (RCTT)* és a 20-24. postoperatív hónapokban a *Rheoscan D-200 slit-flow ektacytometerrel mért elongációs indexet (EI)* párhuzamosan alkalmaztuk.

Megállapíthatjuk, hogy a Carat FT-1 *filtrométer* használatával kapott RCTT értékek a splenectomizált és az autotransplantált csoportokban emelkedést mutattak a 12. postoperatív hónapig az áloperált csoporthoz képest. A 20. és 24. hónapokban szignifikáns különbségeket kaptunk: a legmagasabb RCTT értéket a splenectomizált csoport mutatta, míg az autotransplantált csoportok az áloperált csoport értékeinek szintjére csökkentek.

Az *ektacytometer* használatával a 20. és 24. hónapokban az előbbiekhöz hasonlóan az EI_{max} és a $SS_{1/2}$ legalacsonyabb értékét a splenectomizált csoport kapcsán tapasztaltuk, míg az autotransplantált csoportok értékei megközelítették az áloperált csoport értékeit.

Eredményeink azt igazolták, hogy a lép-autotransplantatio segíthet helyreállítani a normál haemorheologiai statust. Mind a filtrometria, mind a slit-flow ektacytometria alkalmas lehet a hypospleniás és aspleniás állapotok jelzésére. A változások mindkét módszerrel érzékenyen kimutathatóak.

2.3.3. A vörösvérsejt aggregatio és az azzal összefüggő faktorok vizsgálata

A vörösvérsejt aggregatio vizsgálata fontos adatokkal szolgálhat az aspleniás, illetve hypospleniás állapotok jelzésére 2 éves utánkövetés során. A 12., 18., 20. és 24. postoperatív hónapokban történt vérvételek eredményeinek elemzése során a vörösvérsejtek aggregációs tulajdonságát natív vérmintákból és a sejtek denzitása szerint szeparált -döntően „fiatal” vagy „öreg” vörösvérsejt populációkat tartalmazó- almintákból határoztuk meg *Myrenne MA-1 aggregometer segítségével*. Meghatározásra került továbbá a fibrinogén koncentráció *Sysmex CA-500 coagulometer* használatával és a vörösvérsejt süllyedés. A „fiatal” és az „öreg” vörösvérsejtek aggregációs index (AI) értékei eltértek egymástól, magasabb AI értékeket mutatva a denzebb („öreg”) sejtpopulációban. Az AI értékek „öreg”/„fiatal” arányszáma emelkedést mutatott a splenectomizált csoportban a 20. és 24. postoperatív hónapban (1,5 és 2,16) az autotransplantált (1,14 és 1,05) és az áloperált csoportokhoz képest (1,2 és 1,27). A splenectomizált csoport fibrinogén koncentrációja enyhe emelkedést mutatott, valamint a vörösvérsejt süllyedés közel kétszeresére növekedett a kontroll csoportokéhoz képest. Megállapíthatjuk, hogy a „fiatal” és az „öreg” vörösvérsejtek aggregációs tulajdonságainak összehasonlítása hasznos információt adhat a lép filtrációs funkciójáról. A „fiatal” és az „öreg” vörösvérsejtek aggregációs indexében tapasztalható nagy különbség a lép filtrációs funkciójának csökkenését jelezheti.

A jelen OTKA pályázatunkkal beszerzett műszerrel (Myrenne MA-1 vörösvérsejt aggregométer) megközelítőleg 5000 mérést végeztünk.

2.3.4. Haemorheologiai mérőmódszerek adaptálása, módosítása, méréstechnikai standardizáció

A fajspecifitás kérdése meghatározza az eredmények összehasonlító elemzését. A fajonként eltérő paraméterek sokszor méréstechnikai nehézségeket vetnek fel, melyek megoldása az adott műszer standardizáló adaptációjában talál megoldást. Tanszékünkön ezen adaptációs mérések és beállítások megtörténtek, elsősorban a haemorheologiai mérések vonatkozásában, amely vizsgálatok további elemzéseket és új beállításokat igényeltek az értékelhető összehasonlítás céljából. A vörösvérsejtek deformabilitását FT-1 típusú filtrométerrel mértük. A standard beállításon kívül (5 mikrométeres pórus átmérőjű polikarbonát filter) összehasonlító vizsgálatokat végeztünk 3 mikrométer pórus átmérőjű filter használatával is, hiszen az egerek vörösvérsejtjei akár 30-35%-kal is kisebbek lehetnek a kutyáénál. További adaptációt igényeltek a haemostaseologiai vizsgálatok során alkalmazott tesztek a reagensminta-puffer arányok pontos kititrálás tekintetében, megkeresve az optimális arányt az értékelhető vizsgálatokhoz.

2.4. Az immunológiai funkciók vizsgálata Balb/c egerekben

2.4.1. A granulocyta/lymphocyta arány változásai

Egér kísérleteinkben az immunológiai vizsgálataink során a granulocyta/lymphocyta arányban történő változásokat sikerült kimutatni. A postoperatív 8. hónapban a granulocyta/lymphocyta arány a splenectomizált csoportban volt a legmagasabb (Gr/Ly=3,55). Az autotransplantált csoportban ez az arány alacsonyabb volt (Gr/Ly=1,01) a kontroll csoporthoz képest (Gr/Ly=0,75). Ez azt sugallja, hogy splenectomia után bekövetkező kifejezett neutrophil granulocytosis a lép autotransplantatio kompenzálja.

2.4.2. A perifériás CD3+ T -sejtek arányának változása

A CD3+ T -sejteket vizsgálva azt találtuk, hogy a 2. postoperatív hónapban a splenectomizált állatokban (SE-2) szignifikánsan lecsökkent az ép kontrollhoz (ÉP-2) képest (ÉP-2: 45,35 + 4,77 vs SE-2: 37,72 + 4,25 %; $p = 0,0004$).

8 hónappal a műtétek után eltűnt a különbség a splenectomizált és az ép kontroll csoport között, viszont az autotransplantált állatokban (AU-8) szignifikáns emelkedés történt a kontrollhoz (ÉP-8) képest. (AU-8: 56,42 + 3,94 vs. ÉP-8: 48,9 + 3,48 % ; $p = 0,039$).

2.4.3. A perifériás CD4+ T -sejtek arányának változása

A 2. postoperatív hónapban a CD4+ T „helper” sejtek vonatkozásában is szignifikáns csökkenés volt a splenectomizált állatokban (SE-2) az ép kontrolléhoz (ÉP-2) képest (ÉP-2: 31,93+4,87 vs. SE-2: 28,31+3,1 %; $p = 0,041$).

2.4.4. A perifériás CD19+ -B sejtek arányának változása

A 2. postoperatív hónapban a CD19+ B -sejtek arányának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy splenectomia esetén (SE-2) szignifikánsan növekedett, az autotransplantált állatokban (AU-2) szignifikánsan csökkent az ép kontrollhoz (ÉP-2) képest (ÉP-2: 17,33 + 2,16 vs. SE-2: 19,51 + 2,32 %; $p = 0,021$; AU-2: 8,93 + 3,19 % $p < 0,001$).

Figyelemre méltó volt, hogy az idősebb (ÉP-8) állatoknak magasabb volt a B -sejt aránya, mint a fiatalabbaknak (ÉP-2) (ÉP-8: 36,35 + 3,08 vs. ÉP-2 17,33 + 2,16 %; $p < 0,001$), és ez a tendencia a többi állatsoportban is szignifikáns volt (SE-8 vs SE-2, AU-8 vs AU-2 $p < 0,001$). A 8. postoperatív hónapban a B-sejt arányának különbségei eltűntek a különböző állatok között, ami azt sugallja, hogy az állatok egy idő elteltével tudták kompenzálni a B-sejt reguláció zavarát. Ha kiszámítottuk a keringő CD19+ B -sejtek számát a vérben (a fehérvérsejt számok és az áramlási sejtfloziméter adatai alapján), hasonló tendenciát találtunk.

2.4.5. A szérumban IgM szintjének változása

A 2. postoperatív hónapban az IgM szérumban szintje szignifikánsan lecsökkent mind a splenectomizált (SE-2), mind a lép autotransplantált (AU-2) állatokban az ép kontrollhoz (ÉP-2) képest (SE-2: 68,67 + 8,43 vs. ÉP-2: 88,25 + 10,72 mg/l, $p = 0,019$; AU-2: 65,05 + 6,41 vs. ÉP-2: 88,25 + 10,72 mg/l, $p = 0,018$). 8 hónappal a műtét után azt tapasztaltuk, hogy a splenectomizáltakban (SE-8) a korábban is lecsökkent IgM szint tovább esett, ezzel szemben az autotransplantáltakban (AU-8) a korábbi szinten maradt. (SE-2: 68,67 + 8,43 vs. SE-8: 45,24 + 13,22 mg/l, $p = 0,027$).

2.5. Az őssejtek szerepének vizsgálata a lépregenerációban

Kiemelten fontosnak ítéltük meg az őssejtek regenerációban betöltött szerepének vizsgálatát. A vérképző és lymphopoetikus őssejtek jelenléte, expanziója és funkcióképessége magában rejti annak lehetőségét, hogy a kis autotransplantált lépdarabok az eredeti lép sejtes elemeinek funkcióját akár a tömegükhöz képest nagyobb arányban helyre tudják állítani. A lép speciális nyirokszervként mind a veleszületett mind a specifikus immunválasz kialakításában részt vesz. Vénás sinusoidjainak hatalmas felületén a fagocytá sejtek tömege szűri ki a baktériumokat, egyéb kórokozókat, előregedett erythrocytákat. Splenectomia esetén ezen intenzív fagocytá tevékenység kiesése miatt a kórokozók könnyen elszaporodhatnak a vérben sepsist okozva. Mivel a lépdarabok megtapadása során az említett funkciók ellátásáért felelős sejtek populációi vérképző őssejtekből regenerálódhatnak, és ezek az őssejtek a későbbiekben is folyamatos utánpótlásukat biztosíthatják, kísérleteinkben ezek jelenlétét és funkcióképességét vizsgáltuk a megtapadt lépdarabokban.

Vizsgálatainkban az autotransplantált lépdarabokban a fagocytá sejtek utánpótlásáért felelős őssejteket, a granulocytá-macrophag progenitorokat (GM-CFU) kerestük. Az ehhez szükséges kolónia assay módszerek adaptálását *kutyákra és egerekre* is kidolgoztuk, speciális összetételű táptalajokat és kolónia stimuláló faktor forrásokat, citokineket alkalmaztunk és teszteltünk kollaboráns partnerünk segítségével. A kutyák és egerek regenerálódott autotransplantált lépeiben ki tudtuk mutatni a GM-CFU kolóniákat 1 évvel a beültetés után. Műtét nélküli kontroll, áloperált kontroll csoportokban nem mutattak szignifikáns eltérést. Megállapíthatjuk, hogy a lép-autotransplantatio során a postoperatív időszakban a haemopoeticus őssejt termelése növekszik a splenectomizált és az áloperált csoporthoz viszonyítva.

Autotransplantált lépdarabok hasonló vizsgálatával nem találkozhattunk az irodalomban. Ez az első olyan megfigyelés, hogy funkcióképes őssejt populációk intenzív sejtes regenerációval próbálják helyreállítani a lép immunfunkcióit, pl. a fagocytá sejtek termelésével.

Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a visszaültetett lépdarabok súlyarányuknál nagyobb részben képesek a funkciókiesést pótolni. Ez táplálja azt a reményünket, hogy a splenectomia helyett alkalmazott autotransplantatio fokozhatja a fertőzések elleni védekezőképességet, csökkentheti a krónikus fertőzések és a rettegett OPSI kialakulásának veszélyét.

2.6. Morphológiai vizsgálatok eredményei

2.6.1. Lép-autotransplantatumok fénymikroszkópos vizsgálata Balb/c egéren

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 vénák. A kötőszövetes sövetek között intact vörös pulpa és fehér pulpa volt látható. A lépdarabkák körül az egér cseplésében normálisan is jelen lévő szétszórt pancreas-szövet szigetek is megtalálhatóak voltak.

2.6.2. Lép-autotransplantatumok immunhistológiai vizsgálata Balb/c egéren

A vizsgálatok kollaborációban készültek a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Immunológiai és Biotechnológiai Intézetével.

2.6.2.1. A Periarteriális Lymphoid Hüvely (PALS) vizsgálatának eredménye

A cseplésbe visszaültetett lépdarabkák keringése az eredeti tápláló arteria elvesztését követő újraerződés révén módosul. Az irodalomban eddig még nem ismert változást mutatunk ki a lép-autotransplantátumok szövettani képében: a kulcsfontosságú periarteriális lymphoid hüvelyben, valamint annak központját képző centrális artéria szerkezetében. Az IBL-7/22-es antitesttel, -egy pan-endothel és reticularis fibroblast elleni markerrel- festve a metszeteket az autotransplantált állatokban a 2. és 8. postoperatív hónapban sem látszott a centrális arteriolának megfelelő képlet, és csökkent a vörös pulpa rajzolata is, az áloperált kontroll állatokból származó léphez viszonyítva. A marginalis sinus endotheljét jelölő MAdCAM-1 antitesttel pozitívan jelölődő sejteket vizsgálva azt találtuk, hogy az áloperált kontroll egerekben a marginalis sinus gyengébben jelölődik az autotransplantaltakhoz képest. Ezzel szemben az autotransplantált egerekben a vörös pulpában a mesenterialis nyirokcsomó HEV-jeihez (High Endothelial Venules) mérhető intenzitású festődés figyelhető meg, és csak részleges MAdCAM-1 expressio a fehér pulpa állomány nagyobbik része mentén látható.

Ezek a változások azt mutatják, hogy az autotransplantált egerek túlélő lépszövetében kialakulnak olyan elváltozások, amelyek eltérnek a normális lépszövetétől, és ezek befolyásolhatják a B-sejtek „homing” folyamatait és ellenanyag képző képességüket, melynek további vizsgálata kívánatos lenne.

2.6.2.2. 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 8 hónappal a beavatkozások után. Ez a B-sejtes terület körülbelül 30%-os növekedését, és a T-sejtes terület hozzávetőlegesen 50%-os csökkenését jelentette. A B-sejt érésben és aktivációban részt vevő follicularis dendritikus sejtek (FDC) elhelyezkedése egyezett a B -sejt zónával.

2.6.2.3. A macrophagok vizsgálata az autotransplantált lépdarabkákban

A marginalis zóna macrophag alcsoportjainak eloszlása hasonló a 8. postoperatív hónapban az autotransplantatumokban, mint a hasonló korú, ép 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 szialoadhezin (Sn-CD169) hordozó metallofil macrophag alcsoport volt. A marginalis zóna területében mindkét alcsoport megtartott megoszlást mutatott. Emellett az Sn-pozitív alcsoport esetében jelentékeny mértékű follicularis reaktivitás is szembetűnő volt, amely T-dependens antigénnel való immunizálást követő csíracentrum-képződés során jelentkezik, feltehetőleg a hasüregi beavatkozás következtében.

2.6.3. Lép-autotransplantatumok és egyéb szervek fénymikroszkópos vizsgálata beagle kutyán

A szövettani mintavétel során a lép autotransplantatumok mellett a szívből, tüdőből, májból, veséből, vékonybélből, hasnyálmirigyből történtek biopsziák, amelyekből fény- és elektromikroszkópos vizsgálatokhoz a minták beágyazása megtörtént. Terveink szerint vizsgálni kívánjuk, hogy van-e különbség ezen szervek szövettani szerkezetében a különböző kísérleti csoportokban. A vizsgálatok elvégzése, kiértékelése pénzforrás hiánya miatt nem történt meg. Egy következő pályázat keretén belül tervezzük kísérleteink befejezését.

2.6.4. Lép-autotransplantatumok imprint cytologiai vizsgálata beagle kutyán

Cytologiai és cytokémiai vizsgálatok végzéséhez a mintákat levettük, a kenetek fixálásra kerültek. A következő technikák segítségével tervezzük a vizsgálatainkat a jövőben: Acid-foszfataz, PAS, β -glükuronidáz, α -naftil-aceát-eszteráz. A vizsgálatok elvégzése, kiértékelése pénzforrás hiánya miatt nem történt meg. Egy következő pályázat keretén belül tervezzük kísérleteink befejezését.

2.7. Lép-scintigráfias vizsgálatok beagle kutyán

Lépéseket tettünk a direkt és indirekt funkcionális lép-scintigráfias vizsgálatok beagle kutyákra történő adaptálásában, melynek további vizsgálata újabb kísérleti szériákban szükséges.

2.8. A cseplesz neovascularisatiós hatásának további vizsgálatai

A lép autotransplantatumok újraereződése a nagycseplesz felől történik, amely neovascularisatiós folyamat ma sem tisztázott teljesen. A cseplesz ezen újraerező-képességének hatékonyságát más kísérletes modellekben (nyelőcső prevascularisatio, omentonephropexia) is vizsgáltuk.

2.9. Klinikai utánvizsgálatok

Kutatási utánvizsgálataink alapján a klinikumban megvalósított lép autotransplantatiós módszer kapcsán a DE OEC Traumatológiai és Kézsebészeti Tanszéken 12 autotransplantált betegen és 24 splenectomizált betegen is utánvizsgálatok történtek, ahol haematológiai és immunológiai paraméterek (IgG, IgA, IgM, C3, C4, CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, CD3+HLA-DR+, CD4+CD25+) összehasonlítása történt 23 egészséges kontrollal.

Az összehasonlító mérések eredményeként megállapították, hogy a splenectomizált és az autotransplantált csoportban az immunrendszer elemeinek egy része aktívabb állapotban volt, mint a kontrollokban. Emelkedett értékeket találtak az IgG, IgA szintekben, továbbá a CD3+HLA-DR+ és a CD56 sejtek nagyobb számban voltak a periférián, míg a CD4+CD25+ szuppresszor sejtek aránya lecsökkent.

A lép megtartó műtétre került betegek utánvizsgálatát a jövőben is tervezzük.

2.10. Tudománymetriai mutatók összesítése

Kutatási témánkból a 2005-2009 között 12 db in extenso közlemény jelent meg, ebből idegen nyelvű: 6 db, magyar nyelvű: 6 db., idegen nyelvű könyvfejezetek száma: 1.

Rangos hazai és nemzetközi kongresszusokon 39 előadást tartottunk, ebből idegen nyelven: 18 előadás, magyar nyelven: 21 előadás hangzott el.

Az előadásokból lektorált folyóiratban, proceedingben kongresszusi absztraktként 20 db jelent meg, ebből idegen nyelven: 7 db, magyar nyelven: 13 db.

In extenso közlemények IF értéke:	7,44
Lektorált folyóiratban megjelent absztraktok IF értéke:	10,04
Összesített IF érték:	17,559

2.11. Ph.D. értekezések a kutatási témából

Eddig a kutatási témából 1 megvédett Ph.D. értekezés készült el:

Sipka Sándor János: „Az immunrendszer egyes elemeinek változásai splenectomizált és lép-autotransplantált egerekben” címmel. Védés: 2007. XII. 13.

2 Ph.D. hallgató kutatási eredményeinek feldolgozása a témakörből folyamatban van.